

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Expressão gênica, caracterização eletroforética e análise ultraestrutural de
embriões e tecido materno de cadelas gestantes e não gestantes**

Ana Augusta Pagnano Derussi

Botucatu- SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Expressão gênica, caracterização eletroforética e análise ultraestrutural de
embriões e tecido materno de cadelas gestantes e não gestantes**

Ana Augusta Pagnano Derussi

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Titular Maria Denise Lopes

Nome da Autora: Ana Augusta Pagnano Derussi

Título: EXPRESSÃO GÊNICA, CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE EMBRIÕES E TECIDO MATERNO DE CADELAS GESTANTES E NÃO GESTANTES

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Titular Maria Denise Lopes
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Titular Fernanda da Cruz Landim
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profª Dra. Fabiana Ferreira Souza
Membro
Universidade de Franca
UNIFRAN- Franca

Profª Dra. Maria Isabel Mello Martins
Membro
Departamento de Clínicas Veterinárias
UEL- Londrina- Paraná

Profª Dra. Maria Dalva Cesáreo
Membro
Departamento de Morfologia
IBB – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 27 de agosto de 2012

Se eu pudesse deixar algum presente a você,

Deixaria aceso o sentimento

De amar a vida dos seres humanos.

A consciência de aprender

Tudo o que foi ensinado pelo tempo afora...

Lembraria os erros que foram cometidos

Para que não mais se repetissem.

A capacidade de escolher novos rumos.

Deixaria para você, se pudesse,

O respeito àquilo que é indispensável:

Além do pão, o trabalho.

Além do trabalho, a ação.

E, quando tudo mais faltasse, um segredo:

O de buscar no interior de si mesmo

A resposta e a força para encontrar a saída.

Mahatma Ghandi

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

Carl Jung

Dedicatória

Aos meus pais, Tarciso Derussi e Edith Maria Pagnano Derussi, pelo apoio, pelos valores ensinados e por todo amor dedicado.

Aos animais que enriqueceram imensamente minha vida, meus erros, meus acertos e minha profissão.

Agradecimento:

Em especial à professora e orientadora Maria Denise Lopes, por todo auxílio, exemplo, confiança e paciência durante todos esses anos. *“O Mestre faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo.”*

À minha equipe de trabalho: Rodrigo Volpato, Camila Louise Ackerman, Carlos Renato Freitas Guaitolini, Marilda Taffarel e Guilherme Schiess Cardoso, por toda ajuda, pela paciência e bom humor na realização das cirurgias “ao amanhecer”, por todo momento de descontração e seriedade, os quais foram imprescindíveis na elaboração deste nosso estudo- *“Unir-se é um bom começo, manter a união é um progresso, e trabalhar em conjunto é a vitória.” Henry Ford*

Ao pós- graduandos Rodrigo Wagner Souza e Anthony César Souza Castilho, pela extrema ajuda e paciência na realização da etapa de análise da expressão gênica.

Ao pós- graduandos Gustavo e Matheus Sudano pela amizade e auxílios estatísticos

À professora Maria Dalva Cesário, pela ótima convivência, pelo auxílio na interpretação das eletromicrografias e por todo trabalho em conjunto com o Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências.

À professora Fabiana Ferreira de Souza por todo seu auxílio, calma e paciência na arte da eletroforese.

À professora Eunice Oba e Maeli Dal Pai Silva, pelo espaço cedido para as análises necessárias.

Aos professores Frederico Ozanam Papa, Cezinande de Meira, Marco Antonio Alvarenga, Nereu Carlos Prestes e Sony Dimas Bicudo, Fernanda da Cruz Landim e João Carlos Pinheiro Ferreira pelo auxílio, amizade e bons momentos de convívio ao longo destes anos no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

Àos meus amigos desde o início desta aventura em Botucatu: Viviane Helena Chirinéa, Bethânia Vieira Lopes, Ieda Dalla Pria, Bruna De Vita, Rosiara, Mariana Machado, Ian Martin e Cely Marini por toda força, companheirismo, risadas e lágrimas nestes anos de convívio, nos momentos de trabalho e nas horas de festa... tudo é tão mais fácil com vocês por perto...

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Carla, Leda, Jorge, Fabiane, Ana Isabel, Paula, Roberta, Lucas e Luis por todo nosso bom convívio e amizade.

Aos meus amigos e residentes do Departamento de Radiologia Animal e Reprodução Veterinária pela amizade e compreensão na divisão do mesmo espaço.

À extensa família Pagnano, tios, tias, primos e primas, pelo inconfundível apoio e união em momentos tão especiais em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (bolsa de doutorado) na elaboração desta tese.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu, em especial ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

Aos funcionários da FMVZ: Cristina, Raquel, Cida, Edílson, Walter, José Luis e Edivaldo todo auxílio e ajuda fundamental.

As cadelas e seus proprietários que participaram deste experimento, pela confiança, colaboração e paciência na fase de experimentação.

À Deus, essa força maior, por todos os momentos, pessoas e animais que fizeram parte de minha vida e que de certa forma contribuem para a alegria de hoje.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição de meio TRIS/ sem glicerol (Chirinéa, 2004). Botucatu, 2012.....	28
---	----

Tabela 2- Primers para Genes candidatos (ER- β , ER- α , PR, OTR, LIFR, OPN e LIF) e de referência (GADPH, 18S HPRT) utilizados na técnica de q-PCR. Botucatu, 2012.....	38
Tabela 3- Componentes do gel de corrida na concentração de 12% de poliacrilamida para o SDS-PAGE. Botucatu, 2012.....	43
Tabela 4- Componentes do gel de empilhamento na concentração de 5% de poliacrilamida para o SDS-PAGE. Botucatu, 2012.....	43
Tabela 5- Idade embrionária determinada pela contagem de dias após o surgimento da onda pré-ovulatória de LH (dia 0), número de corpos lúteos e número de estruturas recuperadas no grupo experimental (grupo IA, IB e IC). Botucatu, 2012.....	46
Tabela 6- Determinação do provável dia do surgimento da onda pré-ovulatória de LH, número de corpos lúteos e número de estruturas coletadas no grupo controle. Botucatu, 2012.....	47
Tabela 7- Valores das Médias e desvio padrão obtidos na expressão do mRNA dos genes alvos (PR, ER- β , ER- α , OTR, LIF, LIF-R e OPN) em útero de cadelas não gestantes (grupo II), cadelas em diferentes fases da gestação (Grupo IA, IB, IC, ID) e vesícula embrionária (Grupo IC-vesícula). Botucatu, 2012.....	48
Tabela 8- Valores das Médias e desvio padrão obtidos na expressão do mRNA dos genes alvos (PR, ER- β , ER- α , OTR, LIF, LIF-R e OPN) em tuba de cadelas não gestantes (grupo II) e cadelas em diferentes fases da	

gestação (GrupolA, IB, IC, ID). Botucatu, 2012.....	48
---	----

Tabela 9- Valores das médias e desvio padrão obtidos na expressão do mRNA dos genes alvos (PR, ER- β , ER- α , OTR, LIF, LIF-R e OPN) em mórulas e blastocistos. Botucatu, 2012.....	49
---	----

Tabela 10- Valores da dosagem de proteína total dos pools dos lavados tubáricos e uterinos dos grupos I (GIA, GIB e GIC) e grupo II, anterior ao processo de concentração (pool inicial) e após o processo de concentração (pool final). Botucatu, 2012.....	70
--	----

Tabela 11- Média e desvio padrão da massa molar das proteínas encontradas no lavado do útero dos grupos I (subgrupos A,B e C) e grupo II. Botucatu, 2012.....	72
---	----

Tabela 12- Média e desvio padrão da massa molar das proteínas encontradas no lavado de tuba dos grupos I (subgrupos A,B e C) e grupo II. Botucatu, 2012.....	73
--	----

Tabela 13- Média e desvio padrão do índice de densidade óptica (IOD) das proteínas encontradas no lavado do útero dos grupos I (subgrupos A,B e C) e grupo II. Botucatu, 2012.....	74
--	----

Tabela 14- Média e desvio padrão do índice de densidade óptica (IOD) das proteínas encontradas no lavado da tuba dos grupos I (subgrupos A,B e C) e grupo II. Botucatu, 2012.....	74
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Média dos valores de progesterona obtidos em relação ao surgimento da onda pré-ovulatória de LH (dia 0) nas cadelas do grupo experimental e controle.	45
Gráfico 2- Expressão de mRNA ER alpha em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).....	50
Gráfico 3- Expressão de mRNA ER beta em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).....	50
Gráfico 4- Expressão de mRNA PR em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).....	51
Gráfico 5- Expressão de mRNA OTR em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).....	51
Gráfico 6- Expressão de mRNA LIF em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).....	52
Gráfico 7- Expressão de mRNA LIFR em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura dos receptores de esteroídes.....	11
Figura 2-	Citologia vaginal da fêmea 5 (foto 1) , aumento de 400 x. Presença de células parabasais (a) e intermediárias (b), indicando proestro no aumento de 1000 x (foto 2).....	26
Figura 3-	Citologia vaginal da fêmea 5, aumento de 400 x (foto 3). Presença de células superficiais (c) e escamas (d), indicando estro, no aumento de 1000 x (foto 4).....	26
Figura 4-	Citologia vaginal da fêmea 5, aumento de 400 x (foto 5). Presença de células parabasais (e) intermediárias (F), indicando diestro, no aumento de 1000 x (foto 6).....	26
Figura 5-	Esquema utilizado para realização das inseminações artificiais.....	30
Figura 6-	Técnica de OHE realizada na fêmea 36.....	31
Figura 7-	Identificação da tuba uterina na fêmea 36.....	31
Figura 8-	Separação de cornos, tubas e ovários na fêmea 22.....	31
Figura 9-	Identificação o corno uterino, em destaque vesícula embrionária com 22 dias na fêmea 09.....	32
Figura 10-	Lavagem de tuba uterina da fêmea 22.....	39

Figura 11- Lavagem de corno uterino da fêmea 22.....	39
Figura 12- Mórulas recuperadas da fêmea 36.....	39
Figura 13- Blastocistos expandidos recuperados da fêmea 22	39
Figura 14- Vesícula embrionária da fêmea 24.....	39
Figura 15a- Cortes transversais da tuba evidenciando a mucosa com epitélio cúbico simples que se invagina ao longo do seu trajeto, contendo células ciliadas, apresentando núcleo arredondado (n), com grande cromatina difusa e região citoplasmática elétron-lúcida (ct) e cílios na superfície luminal.....	53
Figura 15b- Cortes transversais da tuba evidenciando a mucosa com epitélio cúbico simples que se invagina ao longo do seu trajeto, contendo dois tipos celulares evidentes: células ciliadas (cl) entremeadas com células secretoras (cs). As células secretoras se apresentam também com núcleo grande arredondado (n), cromatina difusa e citoplasma repleto de vacúolos elétron-lúcidos (seta).....	54
Figura 16a- Cortes transversais da tuba evidenciando a mucosa com epitélio cúbico simples que se invagina ao longo do seu trajeto, contendo dois tipos celulares evidentes: células ciliadas (CL) entremeadas com células secretoras(CS). As células secretoras se apresentam também com núcleo grande arredondado (n2), cromatina difusa e citoplasma repleto de vacúolos elétron-lúcidos (seta). As células ciliadas, apresentando núcleo arredondado (n1), com grande cromatina difusa.....	55

Figura 16b- Células ciliadas (CL) entremeadas com células secretoras(CS). As células secretoras se apresentam também com núcleo grande arredondado (n2), cromatina difusa e citoplasma repleto de vacúolos elétron-lúcidos (seta). As células ciliadas, apresentando núcleo arredondado (n1), com grande cromatina difusa.....56

Figura 17- Cortes transversais da tuba uterina. Observa-se um grande aumento de grânulos elétron-lúcidos (nos citoplasmas de ambos os tipos celulares já descritos (seta.....57

Figura 18a- Epitélio cúbico pseudoestratificado com células ciliadas(CL) apresentando núcleo grande arredondado (n) próximo à superfície luminal com cromatina granulosa (seta cg) em alguns pontos, citoplasma elétron-denso com algumas mitocôndrias (seta mt).....58

Figura 18b-As células secretoras possuem núcleo (n2) situado mais na superfície adluminal com as mesmas características do núcleo (n1) das células ciliadas, mas o citoplasma (ct), em algumas se projeta parcialmente para a luz da tuba (foto b,c).Observa-se vacúolos de secreção (seta) na luz da tuba e uma exocitose de um vacúolo por uma célula secretora.....59

Figura 19- Endométrio uterino contendo glândulas tubulares (GL) com epitélio cilíndrico pseudoestratificado, com dois tipos celulares: célula com núcleo ovalado elétron-denso (n), (foto a), cromatina condensada em alguns pontos evidenciando a membrana nuclear e células com núcleo arredondados, menos elétron-densos que as observadas em tuba uterina, apresentando também cromatina condensada (seta, cc) em alguns pontos que evidenciam a membrana nuclear. Em ambos os tipos se observam abundantes e minúsculos vacúolos elétron-densos (seta)

no citoplasma. A submucosa (SB) apresenta tecido conjuntivo frouxo.....60

Figura 20- Região de submucosa (SB) apenas, com tecido conjuntivo frouxo, presença de fibroblastos (FB) e alguns macrófagos.....61

Figura 21a- Glândulas endometriais (GLE) apresentam as células repletas com vacúolos elétron-lúcidos (seta) em seus citoplasmas, provavelmente grânulos contendo secreção (foto a).....62

Figura 21b- Glândulas endometriais (GLE) apresentam as células repletas com vacúolos elétron-lúcidos (seta) em seus citoplasmas, provavelmente grânulos contendo secreção (foto a), núcleo (n), cromatina condensada (seta cc).....63

Figura 22a- Endométrio uterino contendo glândulas tubulares com epitélio cilíndrico pseudoestratificado, célula com núcleo ora ovalado elétron-denso (n), cromatina condensada (cc) em alguns pontos evidenciando a membrana nuclear e ora com núcleo arredondados, alguns com nucléolo conspícuo (foto a). Citoplasma elétron-denso (ct) com a presença de mitocôndrias (seta)64

Figura 23 a: A zona pelúcida (ZP) se apresenta com um aspecto integro, homogêneo e com eletrondensidade média (foto a). Apresentam os blastômeros (B) repletos de dois tipos de grânulos (seta).....65

Figura 23 b: Presença de grânulos (seta): um tipo menor muito elétron-denso e um outro maior, menos elétron-denso, provavelmente grânulos de vitelo (foto b). O núcleo de um blastômero apresentando formato arredondado, cromatina dispersa (cd) e em alguns pontos condensada (cc), membrana nuclear (mn) bem evidente (foto c).....66

Figura 24: Organelas presentes em blastocistos: complexos de golgi (CG) (foto a) e mitocôndrias (M) (foto b).....	67
Figura 25: Células trofoblásticas com núcleo arredondado, cromatina difusa e nucléolo evidente. Citoplasma (ct) elétron-lúcido contendo material fibrinoso, mitocôndrias (mt) e grânulos elétron-densos (vitelo). Estas células apresentam duas faces diferentes com relação ao contorno celular (foto a e foto b) uma face com contorno regular, supostamente a face voltada para a blastocela (ou cavidade blastocística) e outra face contendo microvilosidades (seta) na superfície da membrana, provavelmente a face externa, voltada para a Zona Pelúcida.....	68
Figura 26: As células estão aderidas umas às outras através de “tight junctions” (seta) (junções adesivas) (foto a e foto b).....	69
Figura 27: Primeira eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados.....	71
Figura 28: Segunda eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados.....	71
Figura 29: Terceira eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados.....	71
Figura 30: Quarta eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados.....	71
Figura 31: Quinta eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados.....	71

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Desenvolvimento embrionário no período peri-implantação.....	03
2.2. Aspectos ultraestruturais de embriões, tubas e útero durante o período peri-implantação.....	05
2.3. Aspectos relacionados às secreções tubáricas e uterinas no período peri-implantação.....	07
2.4. Interação da progesterona e estrógeno no período peri-implantação.....	09
2.5. Atuação dos receptores hormonais no período peri-implantação da gestação canina.....	10
2.5.1. Receptores estrogênicos (ER- α e ER- β).....	11
2.5.2. Receptor de progesterona (PR).....	13
2.5.3. Receptor de ocitocina.....	15
2.6. Atuação do fator inibidor de leucemia (LIF e LIF-R) e da OPN no período peri-implantação da gestação canina.....	17
2.6.1. LIF e LIFR.....	18
2.6.2. OPN.....	19
Objetivos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Seleção dos animais.....	24
3.2. Verificação do estado clínico e acompanhamento do ciclo estral.....	25
3.3. Inseminação Artificial.....	27
3.4. Divisão dos grupos experimentais e controle.....	28
3.5. Ovariohisterectomia.....	29
3.6. Coleta, quantificação e classificação das estruturas embrionárias.....	30
3.7 Separação das amostras de acordo com a atividade experimental.....	32
3.8 Análise Estatística.....	44

4. RESULTADO.....	45
4.1.1. Dosagem de progesterona sérica.....	45
4.1.2. Recuperação de estruturas embrionárias.....	45
4.1.3. Avaliação da expressão gênica	47
4.1.4. Avaliação ultraestruturais de embriões, tubas e útero durante o período peri-implantação.....	53
4.1.5. Avaliação do perfil protéico de secreção tubárica e uterina durante o período peri-implantação.....	70
5. DISCUSSÃO.....	75
5.1. Dosagem de progesterona sérica.....	75
5.2. Recuperação de estruturas embrionárias.....	77
5.3. Avaliação da expressão gênica embrionária.....	78
5.4. Avaliação da expressão gênica nos tecidos maternos (tuba uterina e útero).....	81
5.5. Avaliação ultraestruturais de embriões, tubas e útero durante o período peri implantação.....	89
5.6. Avaliação do perfil protéico de secreção tubárica e uterina durante o período peri-implantação.....	93
6. CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	98
Trabalho científico.....	111
ANEXOS	125

DERUSSI, A.A.P. **Expressão gênica, caracterização eletroforética e análise ultra-estrutural de embriões e tecido materno de cadelas no período peri-implantação**. Botucatu, 2012. 132 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo investigar a expressão dos receptores hormonais: estrógeno beta (ER- β), estrógeno alpha (ER- α), progesterona (PR), ocitocina (OTR) e também do fator inibidor de leucemia (LIF) e seu receptor (LIFR) e da osteopontina (OPN) em embriões e tecido materno durante diestro gestacional e cíclico, realizar a análise ultra-estrutural de embriões e tecido materno e avaliar o perfil protéico de lavados uterinos e tubáricos de fêmeas gestantes e não gestantes. Foram utilizadas 24 fêmeas separadas em – **GRUPO I**- subdividido em: **Grupo IA** - 05 fêmeas submetidas à OSH aos 8 dias de gestação; **Grupo IB** - 05 cadelas submetidas à OSH aos 12 dias de gestação e **Grupo IC** - 05 cadelas submetidas à OSH 21 dias de gestação e **Grupo ID**- 4 cadelas submetidas a cesariana 60 dias de gestação. O **GRUPO II**- 05 cadelas, não inseminadas, que foram submetidas a OSH, 12 dias após a onda pré-ovulatória de LH. Para a expressão gênica foi usada a técnica de qRT- PCR, em tecido materno e em embriões dos Grupos I e II. Para a caracterização eletroforética das proteínas do lavado uterino e tubárico foi utilizada a técnica de eletroforese unidimensional. Na avaliação ultraestrutural dos embriões e tecido materno foi realizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Os genes ER- α , PR, LIF-R foram expressos somente em blastocistos; não houve expressão de ER- β , OPN e LIF e o gene OTR esteve presente tanto em mórulas quanto em blastocistos caninos. Os genes ER- α , ER- β , PR, OTR, LIFR, OPN e LIF foram expressos em tubas e útero de cadelas gestantes e não gestantes, sendo que somente o LIF-R foi mais expresso em útero e tuba de cadelas não gestantes. Somente a expressão do gene ER- β foi significativamente superior em tubas de animais não gestantes e com gene OPN ocorreu o oposto. Foram evidenciadas alterações ultraestruturais ao longo do desenvolvimento embrionário. A secreção uterina variou durante o período implantacional e o perfil protéico da secreção uterina sofreu pouca variação durante a gestação e diestro inicial, porém

existiram proteínas que foram detectadas somente durante a fase implantacional e diestro fisiológico inicial. A maioria dos genes candidatos não apresentaram diferenças na expressão quando comparado diestro cíclico e gestacional, tanto em tuba quanto em útero, com exceção de LIF-R, ER- β e OPN. O conteúdo dos grânulos secretados pela tuba entre cadelas gestantes e não gestantes parece variar, no entanto, pesquisas sobre a natureza deste material deverão ser realizadas, bem como análises mais específicas sobre as proteínas dos lavados em tuba, que foram detectadas exclusivamente em cadelas gestantes.

Palavras- chaves:gênica, cadelas, embriões, peri-implantação

DERUSSI, A.A.P. **Gene expression, electrophoretic characterization and ultrastructural analysis of bitches embryos and maternal tissue at peri-implantation period** Botucatu, 2012. 132 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

We aimed to investigate the gene expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and its receptor (LIFR), osteopontin (OPN) and hormonal receptors: estrogen beta (ER- β), estrogen alpha (ER- α), progesterone (PR) and oxytocin (OTR) in bitches embryos and maternal tissue during cyclic and gestational diestrus. We also aimed to perform the ultrastructural analysis of bitches embryos and maternal tissue and evaluate the protein profile of uterine and oviduct washes in pregnant and non pregnant bitches. Twenty-four bitches were placed in: **GROUP I** subdivided in: **Group IA** – 05 females submitted to OVH at day 8 of pregnancy; **GROUP IB** – 05 females submitted to OVH at day 12 of pregnancy; **GROUP IC** – 05 females submitted to OVH at day 21 of pregnancy and **GROUP ID** – 05 females submitted to OVH at day 60 of pregnancy. And **GROUP II** – 05 females, not inseminated submitted to OVH 12 after the LH surge. For gene expression the qRT-PCR was used in embryos and maternal tissue at group I and II. For electrophoretic characterization of protein flushes from uterus and oviduct the unidimensional electrophoresis was used. The transmission electron microscopy technique was performed for the ultrastructural evaluation of embryos and maternal tissue. The ER- α , PR, LIF-R genes were expressed only in blastocysts; there were no ER- β , OPN e LIF expression and the OTR gene was present in both morula and blastocysts. The ER- α , ER- β , PR, OTR, LIFR, OPN and LIF genes were expressed in oviduct and uterus of pregnant and non pregnant bitches, however the LIF-R was more expressed in non pregnant females. Only the ER- β was more expressed in the oviduct of non pregnant females as opposite to the OPN expression. Ultrastructural changes were observed during the embryo development. The uterine environment modified during the implantation period and the protein profile of uterus flush had little variation during pregnancy and initial diestrus however some proteins were detected only during the implantation period

and initial diestrus. Most genes showed no differences in expression when compared cyclic and gestational diestrus in both tube and in the uterus, with the exception of LIF-R, ER- β and OPN. The content of granules secreted by the tube of pregnant and non pregnant bitches seems to vary, however, research on the nature of this material should be performed, as well as more specific analyzes of the proteins in the washed tube, which were detected exclusively in pregnant bitches

Keyword: gene expression, bitches, embryos, peri-implantation

1. INTRODUÇÃO

Na fêmea canina a manifestação dos eventos endócrinos durante a fase lútea não apresenta variações entre o diestro cíclico e o diestro gestacional (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008). O conhecimento sobre as particularidades do diestro gestacional e cíclico na cadela são escassos, o que dificulta a compreensão das interações responsáveis pelo reconhecimento materno da gestação e sobre o desenvolvimento do concepto. A resposta do tecido tubárico e uterino à ação hormonal é determinada tanto pela presença de receptores específicos quanto por sua concentração local, sendo assim, apesar de não existir uma variação hormonal evidente, provavelmente há modificações na expressão de receptores hormonais nesses tecidos (SPENCER et al., 2007).

Durante o período de peri-implantação a interação concepto/ endométrio é influenciada pela progesterona (P_4) e hormônios placentários necessários à manutenção da gestação. A P_4 regula tanto positivamente com negativamente a expressão de genes no endométrio e co-estimula um número de genes particularmente no epitélio endometrial (GRAY et al., 2006; KLEIN et al., 2006). A secreção de estrógeno ovariano na fase pre-implantacional é necessária para aumentar a permeabilidade do endométrio no local de implantação do blastocisto, um pré-requisito no início da implantação e na decidualização subsequente de células estromais (TAN et al., 1999).

O desenvolvimento embrionário em mamíferos é marcado por processos biológicos distintos que ocorrem durante o período de pré e pós-implantação. (WATSON et al., 1999; CUI et al., 2007). Estudos sistemáticos da expressão gênica durante esse período podem esclarecer mecanismos que regulam e controlam processos biológicos envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial, podendo também auxiliar no entendimento da diferenciação das células tronco embrionárias e transferência nuclear de células somáticas.

A sobrevivência embrionária durante o período peri-implantação é dependente da disponibilidade de substratos presentes no ambiente circundante (THOMPSON, 1996), como também de modificações ultraestruturais das tubas

uterinas e do útero, as quais possibilitam um ambiente adequado à fertilização e ao desenvolvimento do conceito, tornando o útero receptivo ao processo de implantação, garantindo dessa forma o sucesso gestacional.

Em vista do exposto, o período peri-implantação é complexo e dependente de várias interações hormonais, metabólicas, modificações morfológicas, síntese proteíca, muitas das quais espécies-específicas. As cadelas apresentam particularidades reprodutivas únicas que as diferenciam de outras fêmeas domésticas principalmente no que tange a similaridades entre as fases do diestro ciclico e gestacional. O fato das cadelas não apresentarem um mecanismo de reconhecimento materno de gestação coloca essa espécie como exceção estimulando o estudo desse período.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nas cadelas, o desenvolvimento embrionário pré-natal é dividido em três períodos: período de desenvolvimento do oócito fertilizado ou período peri-implantação (2 a 17 dias após a fertilização), caracterizado pela presença do zigoto até a formação do blastocisto; período de desenvolvimento embrionário propriamente dito (19 a 35 dias após a fertilização), iniciado pelo processo de implantação do blastocisto até a completa organogênese e período de desenvolvimento fetal (35 dias após a fertilização até o nascimento), no qual, as características fetais são evidenciadas e com um rápido crescimento fetal (PRETZER, 2008).

2.1. Desenvolvimento embrionário no período peri-implantação

Os zigotos são formados, cerca de 60 horas após o surgimento da onda pré-ovulatória de LH (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008), na porção distal da tuba uterina. Originam-se após a fusão do pró-núcleo masculino, oriundo do espermatozóide ao pró-núcleo feminino, proveniente do oócito (CONCANNON, 2000; REYNAUD et al., 2005) e medem cerca de 118 a 145 µm incluindo a zona pelúcida (ZP).

Essas estruturas são mantidas no interior das tubas uterinas por 9 a 10 dias e nesse período sofrem divisões ou clivagens (TSUTSUI, 1989; SONGSASEN e WILDT, 2007), que se iniciam por volta de 72 a 96 horas após as ovulações. Apresentam-se bipartidos na porção média distal da tuba uterina, após 120 horas das ovulações e possuem diâmetro variando de 110 a 170 µm. Nesta fase, permanecem por um longo período na junção útero-tubárica (7 a 10 dias), quando comparados a demais espécies (3 a 4 dias) (PRETZER, 2008).

De acordo com Reynaud et al. (2005), as clivagens prosseguem atingindo o estágio de oito células embrionárias, de 124 a 288 horas após as ovulações e essa fase corresponde à ativação do genoma embrionário.

A divisão subsequente em 16 células ocorre ainda na porção distal da tuba uterina e o embrião possui diâmetro variando de 188 a 200 μm , incluindo a ZP; alguns embriões podem ainda estar envolvido por uma camada de células do *cumulus*. Os embriões iniciam a entrada nos cornos uterinos, em estágio de 16 células porém, mórulas ou blastocistos iniciais são as estruturas mais comumente encontrados adentrando ao útero (PRETZER, 2008).

Aparentemente, a clivagem embrionária de duas a 16 células ocorre mais rapidamente após a fertilização de oócitos maduros, quando comparada a de oócitos em estágio de maturação menos avançada e segundo Concannon et al. (2001), este achado pode explicar, em parte, porque a duração da gestação é similar entre acasalamentos que ocorrem antes ou dias após a maturação oocitária.

Com 10 a 12 dias após as ovulações, uma cavidade se desenvolve rapidamente no centro da mórula, denominada de blastocelo, originando o blastocisto, caracterizado por conter em média 32 a 64 células. O blastocisto expandido pode ser encontrado no 12º dia após as ovulações (REYNAUD et al., 2006).

Na maioria das espécies a migração uterina ocorre em 40% ou mais nas fêmeas gestantes, principalmente quando o número de ovulações entre o ovário direito e esquerdo são diferentes. A migração embrionária uterina considera a distribuição embrionária igualitária entre os cornos direito e esquerdo, possibilitando um espaço, possível ao desenvolvimento embrionário normal (TSUTSUI et al., 2001). Diferenças entre o número de ovulações, substâncias estimulatórias secretadas pelos embriões e a ocorrência de contrações uterinas são fatores que podem explicar a ocorrência da migração uterina nos cães (TSUTSUI et al., 2002).

A fase posterior do desenvolvimento embrionário é caracterizada pelo processo de gastrulação, ou formação das camadas germinativas. Nesse estágio, a simples camada formadora da blástula, é convertida em uma estrutura trilaminar constituída externamente pelo ectoderma, camada média pelo mesoderma e uma camada interna denominada de endoderma (PRETZER, 2008). O diâmetro

do blastocisto inicial é de 215 a 350 μm , chegando a 500 a 750 μm na fase de blastocisto expandido, porém podem atingir 1000 μm no estágio de blastocisto tardio (REYNAUD et al., 2005).

Entre os estágios de blastocisto inicial e expandido, ocorre uma diminuição da espessura da zona pelúcida, provavelmente por consequência de ação enzimática e movimentos embrionários. Os embriões entram no lúmen uterino e permanecem livres por um período variável de 12 a 17 dias após as ovulações; nesta fase, os embriões atingem um diâmetro de 2300 μm com ocorrência de migração trans-cornual (REYNAUD et al., 2005).

O blastocisto atinge 2500 μm , com 16 a 20 dias e adquire conformação expandida. Posteriormente a essa fase, o blastocisto pode se apresentar sem a ZP, porém, a existência de uma ruptura da zona devido à ação de enzimas proteolíticas que degradam essa estrutura ainda é pouco conhecida nos cães (REYNAUD et al., 2005).

A fase de ocorrência da implantação nas cadelas é discordante entre os autores. Segundo Reynaud et al., (2006), Pretzer (2008) e Verstegen-Oclin e Verstegen (2008) a implantação ocorre 18 a 21 dias após as ovulações, já de acordo com Allen (1995), Concannon (2000) e Gunzel-Apel (2008), a implantação ocorre por volta do 24º dia após as ovulações.

2.2. Aspectos ultraestruturais de embriões, tubas e útero durante o período peri-implantação

A segmentação ou clivagem na cadela é considerada um processo holoblástico ou total, possibilitando a formação de zigotos com pequena quantidade de vitelo. No início das divisões embrionárias, ocorre a formação dos blastômeros, ou seja, as células indiferenciadas originárias de cada processo de clivagem (TSUTSUI, 1989; SONGSASEN e WILDT, 2007).

Os blastômeros em estágio de clivagem inicial estão pouco aderidos uns aos outros, chegando a sofrer dispersão em caso de remoção da zona pelúcida (GARDNER, 1997). Com o decorrer das divisões, os blastômeros vão se tornando

progressivamente menores e alinhados, passando a absorver o líquido do meio extracelular, elevando a pressão intracelular e aumentando o contato entre as células. Este contato ocorre até o desaparecimento total dos limites celulares individuais (WATSON e BARCROFT, 2001; STANTON et al., 2003).

A constituição celular do embrião canino durante essa fase mostra-se semelhante a dos demais mamíferos com espaço perivitelínico e superfície apical das células trofoblásticas ainda coberta por microvilosidades, podendo ser notadas as junções do tipo *tight*, as quais originam-se provavelmente, de uma superfície apical livre presente nas células externas, durante a determinação das linhagens celulares (JOHNSON e ZIOMEK, 1981; YAMANAKA et al., 2006).

O processo de diferenciação celular é o primeiro passo na comunicação intracelular, a compactação (BIGGERS et al., 1988). Este fato dá origem às mórulas que permanecem acumuladas no segmento distal das tubas uterinas (SONGSASEN e WILDT, 2007).

O início da transformação da mórula em blastocisto gera a determinação das linhagens celulares, que darão origem ao trofoderma embrionário (TE) e a massa celular interna (MCI), a qual é desprovida de microvilosidades (PRATT, 1985). Essa condição dá origem a uma grande cavidade repleta de fluido que se acumula nos espaços intercelulares chamada de blastocelo enquanto as células polares permanecem na periferia para formar o trofoectoderma, com uma superfície apical dotada de microvilosidades e uma superfície basolateral relativamente lisa que circunda o fluido da blastocelo (WATSON e BARCROFT, 2001).

Nesta fase correspondente ao diestro inicial, o útero que é constituído por três camadas: perimétrio (externa), miométrio (intermediária) e endométrio (interna), apresenta modificações (BARRAU et al., 1975).

Na fase inicial do diestro, o endométrio e miométrio atingem uma maior espessura e densidade celular. As glândulas basais têm uma aparência enovelada e as criptas endometriais luminiais mostram-se com morfologia distinta das glândulas basais. As modificações uterinas são iniciadas durante a 3^a semana de

diestro e são marcadas por apoptose endometrial generalizada e achatamento do epitélio glandular basal (REHM et al., 2007).

No final do diestro e anestro ocorre involução do endométrio. Com a diminuição nos níveis de P_4 , a altura da camada mucosa e a profundidade das criptas são reduzidas (BARRAU et al., 1975). As células no epitélio de superfície e em regiões superficiais das criptas, são caracterizadas por núcleos picnóticos pleomórficos (BARRAU et al., 1975).

As tubas uterinas apresentam um pregueado da mucosa, principalmente na região da ampola. A mucosa é revestida por epitélio cilíndrico simples secretor contendo células produtoras de muco intercaladas com células cilíndricas ciliadas. A lâmina própria é unida diretamente na túnica muscular que apresenta uma camada circular interna e uma longitudinal externa (LEESE et al., 1988).

2.3. Aspectos relacionados às secreções tubáricas e uterinas no período peri-implantação:

O desenvolvimento embrionário no período pré-implantatação é direcionado à formação de uma estrutura capaz de se implantar e interagir metabolicamente com o útero, para que desta forma a gestação evolua e o desenvolvimento fetal possa ser sustentado (WATSON e BARCROFT, 2001). Desta maneira, tanto as mórulas que permanecem acumuladas no segmento distal das tubas uterinas, como os blastocistos, durante a permanência livre no lúmen uterino, são dependentes da secreção local para garantir sua nutrição (BYSTED et al., 2001; REYNAUD et al., 2005).

Muitos constituintes do fluido tubárico tem se mostrado importante para a fertilização e início do desenvolvimento embrionário e são conhecidos por variar, tanto entre as espécies, como também entre os diferentes estágios do ciclo estral dentro da mesma espécie (BYSTED et al., 2001).

Na cadela, no entanto, há um papel adicional da tuba uterina, que é proporcionar o ambiente em que maturação do oócito ocorre. O uso de co-cultura de oócitos e aplicação da técnica de fertilização *in vitro* (FIV) nessa espécie

encontra sérias barreiras, já que não se conhece todos os componentes presentes na tuba uterina da cadela na fase pós-ovulatória. A identificação de produtos de secreção da tuba uterina ainda é motivo de estudo, principalmente quanto aos elementos proteicos secretados durante o período pré-ovulatório (ENGLAND, 2000).

A influência dos aminoácidos é bastante investigada na reprodução de espécies domésticas, já que se apresentam em abundância no trato reprodutivo e são considerados componentes-chave no metabolismo celular, atuando como substratos energéticos, como precursores da síntese protéica ou osmólitos e ajudando a manter o pH intracelular. Os aminoácidos mais abundantes no trato reprodutivo são glutamina, taurina, glicina e alanina, enquanto nos oócitos e embriões são alanina, aspartato, glutamato, taurina e glicina (MOSES et al., 1997).

Durante o período de migração uterina os conceitos são nutridos apenas por secreções presentes na luz do útero, um fenômeno comumente conhecido como nutrição histotrófica. A nutrição histotrófica corresponde à primeira fonte nutricional disponível para o desenvolvimento do embrião e parece ser essencial para sua sobrevivência e crescimento durante a gestação em animais domésticos (SPENCER et al., 2004), já que qualquer tratamento que cause modificação na composição desta substância, potencialmente nutritiva (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008), pode ser extremamente prejudicial ao embrião.

A composição proteica tanto das secreções uterinas como da síntese de proteínas específicas sintetizadas pelo endométrio em muitas espécies são conhecidas, incluindo cabras, ovelhas e ratas nas fases cíclicas e iniciais de gestação. No entanto, há poucas informações sobre as semelhanças e/ ou diferenças entre a secreção protéica uterina de cadelas gestantes e não gestantes (BUHI et al., 1992).

O trofotoderma parece atuar como um local de intensa atividade pinocítica, a qual aumenta à medida que o blastocisto se desenvolve (WINTENBERGER-TORRES e FLECHON, 1974). Deste modo, tem-se hipotetizado que importantes metabólitos necessários para o crescimento do conceito são obtidos a partir dos

histiotrofos uterinos (SPENCER et al., 2004), no entanto, mais pesquisas referentes à espécie canina são necessárias, para elucidar esse processo.

2.4. Interação da P₄ e estrógeno no período peri-implantação:

Nas cadelas, a P₄ desempenha um papel relevante no estabelecimento e manutenção da gestação. O término da secreção de P₄ provoca o fim da gestação em qualquer estágio da prenhez (CONCANNON, 1990). Também desempenha um papel crítico durante a gestação inicial na preparação do epitélio uterino para receptividade e diferenciação de células estromais endometriais para que o desenvolvimento da implantação embrionária seja suportado (MULAC-JERICEVIC e CONNEELY, 2004).

A P₄ também é responsável por inibir a contratilidade do miométrio (AMSO et al., 1994), reduzir a sensibilidade a ocitocina (CONCANNON, 1986) e diminuir a formação de junções comunicantes em células musculares do útero (PURI e GARFIEL, 1982).

Estudos realizados em cadelas de raças mistas e Beagle demonstraram que a concentração de P₄ no período gestacional ou diestro pode variar de 14,8 a 50,2 ng/mL (ONCLIN e VERSTEGEN, 1997; LUZ et al., 2006). Durante a implantação e desenvolvimento embrionário observa-se um aumento específico dos níveis de P₄ (CONCANNON et al., 1975, 1977). No período correspondente aos dias 15 até 30 após o pico de LH, os níveis de P₄ podem alcançar valores máximos de 15 ng/mL a 85 ng/mL (CONCANNON et al., 1983). Todavia, durante o terço final da gestação, os níveis de P₄ declinam para 4 ng/mL a 16 ng/mL, valores que são mantidos por uma a duas semanas, para, em seguida, atingirem níveis de 1 ng/mL a 2 ng/mL no período de 1 a 2 dias que precedem o momento do parto.

A secreção de estrógeno ovariano na fase pre-implantacional é necessária para aumentar a permeabilidade do endométrio no local de implantação do blastocisto, um pré-requisito na iniciação de implantação e decidualização subsequente de células estromais (TAN et al., 1999).

Os níveis de estrógeno aumentam lentamente durante a gestação, alcançando valores de 20 pg/mL até 30 pg/mL momentos antes do parto (CONCANNON et al., 1975). A partir do 40º dia após o pico de LH, as concentrações plasmáticas de estrógeno alcançam valores médios de 21 ± 6 e 27 ± 7 pg/mL em cadelas não gestantes e gestantes, respectivamente (LUZ et al., 2006).

2.5. Atuação dos receptores hormonais no período peri-implantação da gestação canina

Os receptores hormonais são proteínas que contêm sítios específicos de ligação. Essas ligações modificam a conformação do receptor, iniciando a síntese de RNA mensageiro específico, que é translocado ao citoplasma, onde há síntese de uma proteína específica, a qual promove uma resposta celular (GONÇALVES et al, 2007).

Os hormônios esteroídes são produzidos por células presentes no ovário, sendo o estrógeno de origem folicular e a P_4 produzida pelo corpo lúteo (CL) (SCHANS e BERESKA, 2002). Enquanto, os hormônios esteroídes são classificadamente descritos como estimuladores da expressão gênica por atuarem na regulação dos genes endometriais há indícios que esses podem também inibir genes específicos (LESSEY et al., 2006).

Os receptores nucleares possuem 6 regiões distintas (A-B-C-D-E-F). A região C corresponde ao domínio ligante ao DNA e a região E é a região de domínio de ligação, que é conservada evolutivamente. Os receptores de hormônios esteroídes são distintos de outros receptores hormonais, incluindo a natureza de suas ligações e suas associações com proteínas, sendo um dos fatores importantes na ação hormonal (MOSELMAN, 1996).

Os receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) apresentam localização nuclear, possuindo, portanto, arquitetura semelhante. Os receptores possuem 03 domínios independentes que apresentam diferentes funções. A terminação NH₂ ou domínio A/B é a região envolvida em integração proteína/

proteína e atuação transcricional dos genes-alvo, sendo ativado independentemente do ligante (A-F1). O domínio de ligação PBD ou C, desempenha um importante papel na dimerização e ligação dos receptores a sequências de DNA específicas e o domínio DEF ou de acoplamento ao ligante, dimeriza o receptor, realiza translocação nuclear e a transativação da expressão gene-alvo. Possui função ativa dependente do ligante AF-2. (Fig. 1) (SERAFINI, 2007).

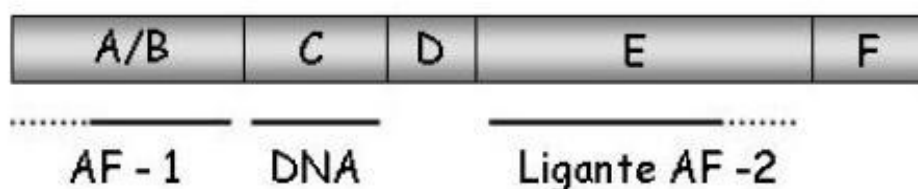


Figura 1: Estrutura dos receptores de esteróides. Fonte: Gonçalves, 2007.

2.5.1.- Receptores estrogênicos (ER- α e ER- β)

Em animais adultos, os receptores estrogênicos (ER) são expressos em células epiteliais e estroma de útero e vagina, sendo um hormônio obrigatório para a morfogênese epitelial normal, a citodiferenciação e atividade secretória desses órgãos (COKE, 1998), como também é considerado um indutor da proliferação da glândula mamária, através da mitogênese epitelial mediada indiretamente.

Os receptores estrogênicos atuam via dois tipos de receptores (alpha e beta) e influenciam diretamente a proliferação, diferenciação e desenvolvimento folicular. Esses 02 tipos são codificados por genes diferentes e possuem grande homologia na região de ligação ao DNA, mas diferem na região D-E-F e na região A-B (GONÇALVES, 2007).

A presença de ER- α e ER- β em um mesmo tipo celular pode gerar homodimerização ou heterodimerização, já em tipos celulares diferentes formam apenas homodímeros, sendo assim uma ação moduladora entre os 2 receptores não é possível, logo agentes parácrinos podem estar envolvidos (GONÇALVES, 2007).

O ER- α e ER- β medeiam as ações do estrógeno, regulando a transcrição dos genes alvo, sendo que a maioria dos tecidos do trato reprodutor feminino expressam tanto ER- α quanto ER- β e o nível de expressão destes receptores podem desempenhar um papel importante na mediação da ação do estrogênio (GONÇALVES, 2007).

Receptores de estrógeno foram identificados em tubas uterinas de macacas, sendo demonstrados em maior quantidade na fase folicular do que na fase lútea. Na fase folicular, provavelmente estão associados com a proliferação e diferenciação das células da tuba uterina, já durante a fase lútea, os níveis baixos foram correlacionados com atrofia na tuba uterina (WEST e BRENNER, 1983).

Em cadelas, a expressão nuclear de ER e PR no epitélio, estroma e células musculares lisas dos cornos uterinos é maior durante proestro, correlacionando-se positivamente com o 17-beta- estradiol e P₄ (VERMEIRSCH et al., 1999).

Lessey et al. (2006) observaram em seu estudo que o estrógeno parece inibir a expressão de proteínas específicas, sendo que o ER- α excessivamente expresso na fase lútea, pode ser prejudicial ao desenvolvimento da receptividade uterina relacionando-se à infertilidade em humanos. Também foi observado que o ER- α aumenta em resposta ao estrógeno durante a fase proliferativa e diminui em resposta a P₄ durante a fase secretória.

Estudos realizados com ratas *knockout* para ER- α , foram observados ciclos irregulares, infertilidade (GONÇALVES, 2007), *déficit* na estratificação do epitélio vaginal, maior agressividade, alteração no comportamento de cópula, modificação no comportamento materno, diminuição no número de filhotes e aumento no número de infanticídio (OGAWA et al., 1998), evidenciando a importância desse receptor no ciclo reprodutivo e mais especificamente como mediador de respostas no epitélio vaginal e uterino.

O papel de ER- α no desenvolvimento do trato reprodutivo tem sido documentado por vários anos, enquanto a presença de ER- β é um achado mais recente (OGAWA et al., 1998). Embora múltiplas isoformas do mRNA para ER- β terem sido detectadas e caracterizadas, pouco se sabe sobre a regulação da expressão da isoforma β e sua significância funcional.

O ER- β parece ser importante na função ovariana de várias espécies. A detecção da presença de ER- β em células endoteliais, pode ser um indicativo da importância deste receptor na intensa vascularização que ocorre durante a formação do CL (CARDENAS et al., 2001).

Kuiper et al. (1998) observaram em ratos que os subtipos de ER são expressos em diferentes tipos celulares, suportando a hipótese de que o ER pode ter diferentes funções biológicas. Em estudos realizados com ratas *knockout* para ER- β foram observados ovários pequenos, desenvolvimento folicular deficiente, número de corpos lúteos reduzidos e fertilidade comprometida (GONÇALVES, 2007).

Em estudo realizado por Hou et al. (1993) a expressão de ER em embriões de ratos diminuiu, sendo indetectáveis na fase de mórula. Baseado nisso, o estrógeno aparentemente é um importante regulador no processo do desenvolvimento embrionário. Esse receptor inibe as enzimas aromatases, fato que pode bloquear o desenvolvimento embrionário. Dessa forma, a função do estrogênio no embrião pode ser o de estimular não só o desenvolvimento inicial (HOU et al., 1996) como também prepará-lo para a implantação, desde que também já foi detectado em trofoblasto.

2.5.2. Receptor de progesterona (PR)

Na maioria dos mamíferos a P_4 age tanto de forma direta como indireta na manutenção do CL. A concentração de P_4 no soro de cadela gestante e não gestante não diferem de forma significativa; entretanto, a expressão dos receptores uterinos para P_4 provavelmente diferem (SPENCER et al., 2007). Os efeitos biológicos da P_4 são dependentes da expressão dos receptores de P_4 e esses receptores variam durante a gestação de uma forma espécie-específica.

Nas fêmeas ovinas prenhes e cíclicas, a expressão do PR no endotélio luminal e no epitélio glandular superficial provou-se correlacionar negativamente com as concentrações de P_4 em mulheres a diminuição dos receptores de P_4 é simultânea ao desenvolvimento dos pinópodes, ou seja, dos microvilos utilizados

na fixação do blastocisto. De maneira semelhante, uma influencia negativa da P_4 nos respectivos receptores tem sido descrita em cães e em outras espécies (LI et al., 1992).

Vermeish et al. (1999) avaliou a presença de PR em cadelas gestantes e no período pós parto. Esses receptores foram localizados no núcleo das células do estroma e do miométrio uterino, estando ausente nas células epiteliais. O autor sugeriu uma ação indireta desses receptores nas células epiteliais via células do estroma. Neste estudo, não foi observadas diferença na expressão de PR em tecido uterino de cadelas gestantes e no pós parto, acreditando-se que o aumento na proporção sérica de estrógeno e P_4 seja mais importante do que o declínio dos receptores.

A queda acentuada na concentração de P_4 , durante o parto nas cadelas, resulta no aumento da proporção E_2/P_4 o que provavelmente é a maior causa do deslocamento placentário, dilatação cervical e aumento da motilidade uterina. É conhecido que a proporção E_2/P_4 produz diferentes efeitos nos receptores glandulares em comparação as células do estroma. As células epiteliais provavelmente são mais sensíveis a *down regulation* de seus receptores do que as células do estroma.

Em ratas *knouckout* para PR foi observado desenvolvimento folicular normal, porém sem ocorrência da ovulação (GONÇALVES, 2007). No útero foi notada ausência da implantação devido à inibição ao estímulo decidual (LYDON et al., 1995) e hiperplasia uterina pela ação estrogênica proliferativa.

A menor expressão de ER e PR em tecido uterinos ocorreu no início do diestro, correlacionando-se com o pico de P_4 sérica (DE COCK et al., 1997; VERMEIRSCH et al., 2000). Em geral, as concentrações de PR são baixos durante o anestro, provavelmente devido ao baixos níveis de estradiol no plasma (REHM et al., 2007).

A intensa coloração nuclear para PR em células da decídua reflete a importância da P_4 no processo de decidualização, porém ER- α e PR nunca foram observados na parte fetal da placenta canina, o que implica que tanto o estrógeno quanto a P_4 não regulem diretamente os tecidos fetais placentárias. Do dia 23 a 41

de gestação, os níveis séricos de estrógeno e P_4 são relativamente constantes (ENGLAND, 1998) e nenhuma alteração na expressão desses receptores no útero de cadela foi observada.

Receptores de P_4 foram expressos em embriões de suínos na fase de duas células, estando ausente na fase entre cinco a oito células e não sendo detectados em mórula e blastocisto. Estes resultados indicam que os efeitos da RP sobre a embriogênese parecem ser indiretos, talvez através da regulação desses receptores por fatores de crescimento produzidos pelo trato reprodutivo materno (YING et al., 2000)

Em estudo realizado por Hou et al. (1997), a expressão de PR não foi detectado nos estágios iniciais do embrião de ratos, sendo somente detectados no estágio de blastocisto. A transição da fase de mórula para blastocisto exige alterações na expressão gênica, e na formação de blastocistos tardios há alterações na síntese e secreção de proteínas específicas.

2.5.3. Receptor de ocitocina

A liberação e o equilíbrio participativo entre diferentes hormônios, incluindo-se P_4 , prolactina, relaxina e estrógeno garantem a manutenção e a progressão da prenhez nas cadelas. Já o desencadeamento do parto ocorre pela ação conjunta da P_4 , do estrógeno, bem como da ocitocina (MITCHELL et al., 1997).

A ocitocina quando liberada na circulação causa contração do miométrio durante o parto e liberação do leite na lactação (MITCHELL et al., 1997). A sensibilidade miometrial à ocitocina é importante na contração uterina, pois tal hormônio é liberado em resposta à pressão fetal na cérvix ou vagina (CONCANNON, 1986). Vários estudos demonstram que a sensibilidade do miométrio à ocitocina aumenta durante o parto, como resultado do aumento da concentração do receptor de ocitocina e da concentração local deste hormônio (FUCHS et al., 1983; WU et al., 1992).

A ocitocina estimula a contração do miométrio por dois mecanismos paralelos. O primeiro envolve a ação direta do receptor de ocitocina nas células do

miométrio, resultando na mudança da concentração de cálcio intracelular e no aumento da contratilidade uterina (CHALLIS e LYE., 1994). O segundo mecanismo envolve a estimulação indireta da contração uterina por meio da síntese de prostaglandina pelo endométrio (FUCHS et al., 1983; RIEMER et al., 1986).

Klarenbeek et al (2007) demonstraram que as concentrações de ocitocina em cadelas no final da gestação permanecem baixas podendo oscilar e aumentar somente no estágio expulsivo do parto, mas não necessariamente no momento da expulsão fetal, o que sugere que a ocitocina circulante apresenta influência mínima para o início do parto em cadelas.

A liberação de prostaglandina é regulada principalmente pelo estrógeno, P_4 e ocitocina (OT) (SPENCER et al., 1996). Para modular as respostas uterinas para OT, os hormônios esteróides ovarianos, estrogênio e P_4 , regulam o receptor de ocitocina (OTR) e a expressão do gene no epitélio do endométrio (MCCRACKEN et al., 1984). A P_4 inibe a síntese OTR no endométrio por 10 a 12 dias, um fenômeno denominado "bloqueio de P_4 ". No entanto, a exposição contínua do endométrio à P_4 gera *down-regulation* na expressão de receptor de progesterona (PR).

Na ausência de PR suficiente, o epitélio do endométrio expressa receptor de estrógeno (ER), o que aumenta a expressão de OTR em resposta ao estrogênio (SPENCER et al., 1995). Os aumentos de OTR ocorrem em ovelhas cíclicas quando os níveis de ER estão aumentados e os níveis de PR diminuídos no epitélio do endométrio.

Ocorre um rápido aumento de OTR quando a P_4 circulante diminui a níveis basais no diestro final e o estrógeno folicular aumenta durante o proestro e estro (WATHES e HAMON, 1993). Logo, o estrógeno regula a expressão de OTR, enquanto a ocitocina, agindo através de seus receptores, induz a liberação pulsátil de prostaglandina ($PGF2\alpha$) (HIXON e FLINT, 1987). O estrógeno também estimula os eventos mediados pela OT, pois assegura um pulso frequente de $PGF2\alpha$, necessário para luteólise.

A expressão diferencial de OTR durante invasão embrionária / placentação no útero sugere um potencial papel da OT no processo de implantação . (BERETSOS et al., 2006).

Em estudo sobre a detecção de OTR em embriões de ratos, observou-se que a expressão desse receptor diminuiu gradualmente após a fase de quatro células. De acordo com este estudo, o desenvolvimento embrionário parece estar relacionado com a baixa expressão de OTR. Este receptor seria produzido pelo blastocisto durante a sua presença no útero, o que pode representar um mecanismo acessório em potencial para o embrião controlar a receptividade do endométrio, como também para prevenir o desenvolvimento do mecanismo luteolítico endometrial exercida pelo sistema OT-OTR (BERETSOS et al., 2006).

2.6. Atuação do fator inibidor de leucemia (LIF e LIF-R) e da OPN no período peri-implantação da gestação canina

As citocinas interagem com a esteridogênese de uma maneira sistêmica e complexa. Evidências sugerem que a citocina produzida pelo endométrio e blastocistos participariam do mecanismo de interação entre embrião e útero, juntamente com várias outras citocinas, fatores de crescimento transformante (TGF) e moléculas de aderência que iniciam o processo de implantação, logo a interação materno fetal seria composto de complexas interações de citocinas que modulam seletivamente o diálogo imunológico (CHAOUAT et al., 2004).

Além desses, diversos elementos ainda estão associados à sinalização uterina para que a gestação seja reconhecida. As integrinas são fatores responsáveis pela interação entre a matriz extracelular (ECM) promovendo a sinalização celular às células epiteliais uterinas e trofoderma, sendo que algumas delas em humanos são consideradas marcadores da receptividade uterina para a implantação quando o endométrio encontra-se sobre a influência da P₄. A expressão de componentes da ECMs, como as osteopontinas (OPN) também parece estar ligada à implantação (SPENCER e BAZER, 2004).

2.6.1. LIF e LIFR

A citocina “fator inibitório da leucemia - LIF” foi inicialmente reconhecida, como um fator capaz de induzir a diferenciação de macrófagos da linhagem de células leucêmicas mieloídes. Entretanto, sabe-se atualmente que o LIF tem atuação pleiotrópica relacionada à proliferação, diferenciação e sobrevivência celular em diversos sistemas, como imunológico, nervoso, cardíaco e reprodutivo (OZAKI e LEONARDI, 2002).

O receptor LIF (LIF-R) está expresso tanto no endométrio como no oócito humano, e também é secretado pelas células do oviducto. Durante a fase lútea inicial ocorre o aumento da síntese e de secreção de LIF pelos pinopódios (KABIR- SALMANI et al., 2005), sendo proposto que o LIF é essencial para o sucesso da implantação no homem, suíno, ovinos, e primatas (MODRIC et al., 2000), desempenhando um importante papel na fase peri-implantação (CULLINAN et al., 1996). Estudos em ratos e humanos sugerem que o LIF está no topo das moléculas que expressam a resposta materna à implantação (RED-HORSE et al., 2004).

O LIF tem sido detectado no fluido folicular, correlacionando-se positivamente com 17 β -estradiol, o que gera a hipótese de que esta citocina não só participe dos processos de diferenciação celular, mas também na maturação do oócito e nos primeiros estágios da gestação. É provável que LIF promova a expressão de proteínas celulares superficiais em embriões as quais facilitariam a sua ligação às integrinas endometriais no momento da penetração do trofoblasto (REINHART et al., 1998)

O papel do LIF na interface materno-fetal após a implantação ainda não é esclarecido, sabe-se que ele regula o crescimento e diferenciação do trofoblasto e proliferação endometrial (KOJIMA et al., 1994; REN et al., 1997), o que leva a resultados contraditórios da participação do LIF na continuação da gestação. No entanto, em vista da significativa expressão e possível função de LIF relacionados a placenta durante a gestação, continua ser prematuro concluir que a ação LIF é totalmente desnecessária após a implantação.

De acordo com Chen et al. (1999), o LIF é essencial para a implantação do embrião de ratos e humanos, podendo também exercer uma função previa à implantação, uma vez que as transcrições LIF e LIF-R foram detectáveis em embriões de camundongos e humanos nas fases iniciais de desenvolvimento (CHEN et al., 1999) e ratas Knouckout para LIF são férteis, mas seus blastocistos não implantam a menos que sejam tratados com LIF (STEWART et al., 1992).

A transcrição de LIF-R se evidencia durante as fases de mórula e de blastocisto indicando que o LIF embrionário pode agir de maneira parácrina no desenvolvimento do blastocisto (LEI et al., 2004). Nos trabalhos de Schafer-Somi et al., (2008) foi detectado RNAm para LIF em embriões caninos de 10 e 12 dias; um importante efeito do LIF foi verificado na promoção do crescimento e desenvolvimento embrionário. O LIF provavelmente exerce um papel importante durante a invasão e implantação de embriões mamíferos e sua expressão pode ser direta ou indiretamente dependente do efeito biológico da ligação da P_4 e seu receptor.

2.6.2. OPN

Osteopontina (OPN) é uma glicoproteína da matriz extracelular (ECM) que é secretada pelo epitélio glandular no momento da implantação. A OPN se liga a vários heterodímeros das integrinas, promovendo adesão, difusão e migração celular. Algumas hipóteses correlacionam a ligação entre OPN e integrinas como responsável pela estimulação de mudanças morfológicas das membranas extra-embrionárias do conceito, induzindo a adesão entre epitélio luminal e trofoectoderme essencial para a implantação e placentação (APPARAO, 2003).

Os estudos iniciais relacionados à OPN foram realizados com intuito de identificar essa glicoproteína na matriz mineral óssea bovina (FRANZEN e HEINEGARD, 1985). Posteriormente foi descrita em uma variedade de órgãos e secreções de diversos tecidos: trato gastro intestinal, tireoide e rim (YOUNG et al., 1990, GABLER et al., 1999).

Em um extenso estudo realizado por Brown et al. (1992), relacionado à expressão de OPN em tecidos humanos, outros órgãos também apresentaram essa glicoproteína como um constituinte majoritário da superfície luminal das células epiteliais, tais como: pâncreas, trato urinário, trato respiratório, testículo, ovários, tuba uterina, útero e placenta humana.

Em ovinos, as OPNs interagem com receptores da superfície celular, sendo identificadas no lavado uterino (JOHNSON et al., 2003), sugerindo que há um papel importante desse fator na regulação da implantação do conceito (SPENCER e BAZER, 2004).

Transcrições específicas de osteopontina foram detectadas em células da tuba uterina bovina pela técnica de RT-PCR e foi observado a presença desta glicoproteína durante todas as fases do ciclo estral bovino, de forma não significativa, porém, com tendência estatística em ser maior no início da fase lútea e inferior antes da ovulação, revelando novamente a tuba uterina como um local de síntese de osteopontina e integrinas. Gabler et al. (2003) confirmaram que a presença tanto de isoformas de osteopontina, como de integrinas na tuba uterina bovina e que a interação entre elas exerce um papel funcional na fisiologia normal da tuba uterina, afetando as interações entre os gametas, embriões e epitélio uterino.

A presença de osteopontina na zona pelúcida (ZP) de ambos os oócitos bovinos imaturos e maduros sugerem que *in vivo*, há acúmulo de OPN no embrião é possível, tanto pela sua presença no fluido da tuba uterina, como pela sua presença no endométrio (GABLER et al., 2003).

Glicoproteínas específicas têm sido purificadas a partir da tuba uterina e demonstram *in vitro* que possuem efeitos positivos sobre capacitação espermática, penetração do espermatozóide no oócito e desenvolvimento do embrião. O cenário atual revela que alguns componentes da tuba uterina fornecem um sistema à prova de falhas para assegurar a fertilidade *in vivo*, ressaltando que o sucesso deste processo não depende apenas de um único componente (KILLIAN et al., 2004).

Estudos em primatas, porcos, ovelhas e roedores têm revelado que OPN é um constituinte importante do microambiente uterino e placentário, atuando como um componente do histiotrofoblasto, sendo necessária a adesão e transdução de sinal na interface utero-placentária durante a gestação. Também sendo um gene expresso pelo estroma uterino contribuindo para uma decidualização e regulando a produção de citocinas. (JONHSON et al., 2003)

Em coelhos a OPN é expressa de uma forma fase específica pelo endométrio correlacionando-se com o período peri-implantação, com a invasão do blastocisto e placentação. Estudos em humanos evidenciaram a expressão de OPN no epitélio glandular da fase luteal sendo esta regulada pela P₄.

Em embriões de ratos, a OPN é expressa na massa celular interna de blastocistos iniciais, onde pode ser regulada por fatores de transcrição mas é indetectável no embrião após 5 dias de fertilização. Em contraste com os resultados obtidos em ratos e humanos, a OPN não é expressa em embriões de suínos e ovinos (JONHSON et al., 2003).

Objetivos Gerais:

- ❖ Investigar a expressão gênica dos genes candidatos (ER- α , ER- β , PR, OTR, LIFR, OPN e LIF) em tecido materno e embriões durante a gestação canina e diestro cíclico inicial
- ❖ Avaliar o perfil proteico do lavado tubarico e uterino durante a gestação da cadela e diestro cíclico inicial
- ❖ Avaliar a ultraestrutura de tubas, utero e embriões durante a gestação da cadela e diestro cíclico inicial

Objetivos Específicos:

- ❖ investigar a expressão gênica dos genes candidatos (ER- α , ER- β , PR, OTR, LIFR, OPN e LIF) em três diferentes fases embrionárias: mórula, blastocisto e embriões recém-implantados
- ❖ investigar a expressão gênica dos genes candidatos (ER- α , ER- β , PR, OTR, LIFR, OPN e LIF) em tecido uterino e tubas uterina no período peri-implantação.
- ❖ Comparar os resultados obtidos na expressão gênica de genes candidatos em tecidos uterinos e tubas uterinas de cadelas gestantes (grupo experimental) e cadelas não gestantes (grupo controle).
- ❖ Realizar a caracterização eletroforética do perfil protéico de lavados de secreções tubárica e uterinas em cadelas não gestantes no período de diestro inicial (grupo controle), em cadelas gestantes no período peri-implantação.

- ❖ Analisar a ultra-estrutura de embriões nas fases de mórula e blastocistos
- ❖ Analisar a ultra-estrutura de útero (endométrio) e tuba uterina de cadelas não gestantes no diestro inicial (grupo controle) e em cadelas gestantes no período peri – implantação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizada no Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), e no Laboratório de Endocrinologia da Reprodução do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Botucatu e no Laboratório de Rotina em Histologia do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu. Esta pesquisa foi aprovada pelo comite de ética da faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Botucatu em 31/03/2009, tendo como numero de processo 16/2009-CEEA.

3.1. Seleção dos animais:

Foram utilizadas 24 cadelas, sem raça definida, médio porte, com idade entre 01 e 6 anos, pesos equivalentes, boa condição de saúde, com histórico de fertilidade comprovada, atendidas no Ambulatório de Reprodução de Pequenos Animais ou pertencentes à Associação de Proteção aos Animais (APA) da cidade de Botucatu, cujos proprietários tinham interesse em realizar a ovariectomia (OHE) eletiva.

As cadelas foram submetidas a um exame clínico geral para averiguação do estado de saúde, ao exame ginecológico completo e ao exame de citologia vaginal para a determinação da fase do ciclo estral. Após esses procedimentos foi coletada amostra sanguínea para realização de hemograma completo e dosagem de P₄ sérica.

Foi selecionado também um macho adulto saudável, médio porte, sem raça definida, com aproximadamente 5 anos, com teste negativo para Brucelose e Leptospirose, como doador de sêmen.

3.2. Verificação do estado clínico e acompanhamento do ciclo estral:

3.2.1. Análise hematológica:

As amostras sanguíneas foram colhidas pela de punção da veia jugular. Cerca de 1 a 2 mL de sangue foram colocados em tubos com EDTA, para a realização de hemograma completo, utilizando método automatizado com estudo morfológico em esfregaços corados. Foi realizada contagem leucocitária, diferencial e plaquetária. Os valores de referência foram os adotados pelo Laboratório Clínico do Hospital Veterinário-Unesp/ Botucatu. As amostras de sangue para os hemogramas foram coletados no dia do exame clínico e no dia anterior a OHE. Após este procedimento, as fêmeas foram desvermifugadas e realizou-se o controle de parasitas externos (carrapatos e pulgas) quando necessário.

3.2.2. Estimativa do momento de ovulação:

A ovulação foi estimada baseando-se na concentração sérica de P_4 e no exame de citologia vaginal. No momento em que a porcentagem de células superficiais foi igual ou superior a 90% na citologia vaginal e a concentração de P_4 estava entre 4 a 10 ng/mL, foi considerado o momento correspondente à ovulação (dia +2 da onda pré-ovulatória de LH), segundo preconizado por Hase et al. (2000) e Johnston et al. (2001).

3.2.3. Citologia vaginal:

Os exames citológicos foram realizados com o uso de escova ginecológica. As lâminas foram coradas pelo método Panótico (Pánótico Rápido[®], Laborclin, Pinhais, Paraná, São Paulo) e a identificação dos tipos celulares foram baseadas nos critérios adotados por Johnston et al. (2001), ou seja, na porcentagem de células superficiais sob microscopia de luz (aumento de 200x) para animais em fase folicular e na ausência desse tipo celular para animais em diestro e anestro.

(Figura 4). A citologia vaginal foi realizada em dias alternados do início do proestro/ estro (Figura 2 e 3) até o a detecção do primeiro dia de diestro.

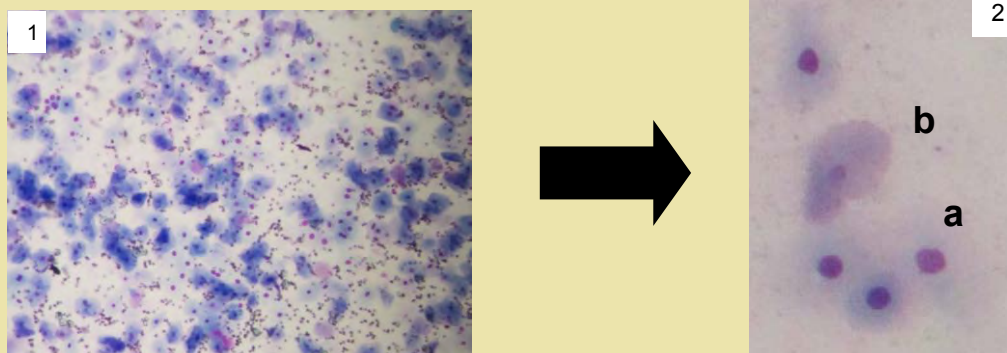


Figura 2: Citologia vaginal da fêmea 5 (foto 1) , aumento de 400 x. Presença de células parabasais (a) e intermediárias (b), indicando proestro no aumento de 1000 x (foto 2).

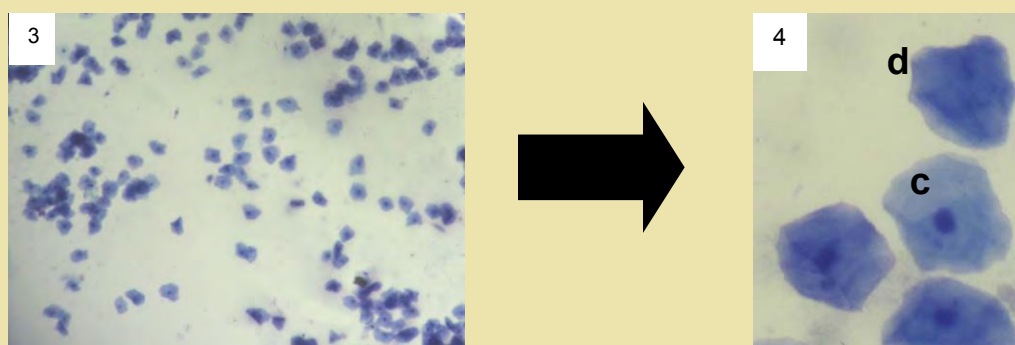


Figura 3: Citologia vaginal da fêmea 5, aumento de 400 x (foto 3). Presença de células superficiais (c) e escamas (d), indicando estro, no aumento de 1000 x (foto 4).

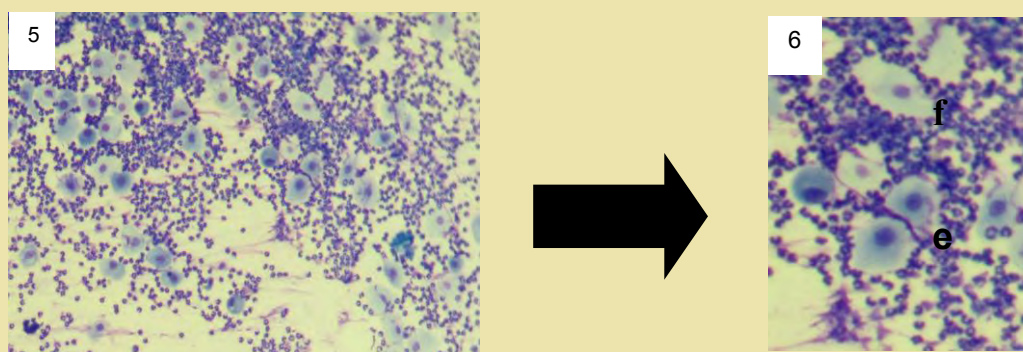


Figura 4: Citologia vaginal da fêmea 5, aumento de 400 x (foto 5). Presença de células parabasais (e) intermediárias (F), indicando diestro, no aumento de 1000 x (foto 6)

3.2.4. Dosagem de P₄ sérica:

Foram retirados em média de 5,0 mL de sangue com seringas de 10,0 mL e agulhas 30x 8 através de punção da veia jugular. O sangue foi centrifugado (Centrífuga Excelsa Baby II- Modelo 206-R[®], Fanen, São Paulo, Brasil) por 10 minutos para obtenção do soro. Foi realizada uma primeira dosagem de P₄ sérica em um laboratório particular (Laboratório Álvét Cascavel- PR) com intuito de prever o momento das ovulações através da técnica de quimioluminescência. Dosagens posteriores de P₄ foram realizadas pela técnica do radioimunoensaio (RIE) em fase sólida, sem extração química ou processo de purificação, através da utilização de *Kits* comerciais (Coat- Count Kit, Diagnosis Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

A dosagem de P₄ foi realizada, em dias alternados, a partir do momento em que as células superficiais atingiram 80% no exame de citologia vaginal, até a realização da OHE. Valores de P₄ sérica de cadelas em relação ao surgimento da onda pré-ovulatória de LH foram os mesmos adotados por Jonhston et al. (2001).

3.3. Inseminação Artificial:

Foram realizadas duas inseminações artificiais (I.A) em dias alternados (Figura 5). A primeira inseminação foi realizada entre os dias +1 e +2 do surgimento da onda pré-ovulatória de LH e a segunda inseminação entre os dias +3 e +4 da onda pré-ovulatória de LH, estimada pela dosagem de progesterona.

O sêmen utilizado foi coletado por manipulação digital do pênis, utilizando tubo de plástico de 15 ml e funil coletor. A concentração espermática total foi realizada após diluição adequada e contagem em câmara de “Neubauer”, uma concentração mínima de 200×10^6 espermatozoides totais e volume compatível ao porte da fêmea foi considerado. O sêmen foi diluído em meio composto por TRIS/ sem glicerol (Tabela 1) de acordo com Norton modificado por Chirinéa et al. (2004).

Tabela 1- Composição de meio TRIS/ sem glicerol (Chirinéa, 2004). Botucatu, 2012.

Composição do meio utilizado	Medida
TRIS	3g
Ácido Cítrico	1,7g
Frutose,	1,25g
Sulfato de Amicacina	0,020g
Gema de Ovo	20mL
Água Destilada	80mL

3.4. Divisão dos grupos experimental e controle:

As cadelas foram divididas em 02 grupos:

GRUPO I (Experimental) – 19 cadelas inseminadas, via vaginal, com sêmen fresco, sendo:

- ❖ **Grupo IA:** constituído de 05 fêmeas inseminadas e submetidas a OHE no 12º dia após a onda pré-ovulatória de LH, ou no 8º dia após a primeira inseminação, com a finalidade de coletar embriões em estágio de mórula.
- ❖ **Grupo IB:** 05 cadelas inseminadas e submetidas a OHE no 16º dia da onda pré-ovulatória de LH ou 12 dias após a primeira inseminação, com a finalidade de obter embriões em estágio de blastocisto (inicial, expandido e eclodido).
- ❖ **Grupo IC:** 05 cadelas inseminadas e submetidas a OHE no 25º dia da onda pré-ovulatória de LH, ou 21 dias após a primeira inseminação, com a finalidade de obter embriões recém-implantados.

- ❖ **Grupo ID:** 04 cadelas submetidas à cesariana e em seguida castradas. O material coletado dessas fêmeas foram utilizados somente para a avaliação do estudo da expressão gênica dos genes alvos em tecido tubárico e uterino.

GRUPO II (Controle) - 05 cadelas, não inseminadas e submetidas a OHE na fase inicial do diestro - 12 dias após a onda pré ovulatória de LH.

3.5 Ovariohisterectomia (OHE):

As medidas pré-operatórias adotadas incluíram: jejum sólido de 12 horas e jejum hídrico de 3 horas. O procedimento anestésico consistiu em: 0,05 mg/Kg acepromazina e 0,5 mg/Kg morfina, por via intramuscular como medicação pré-anestésica e após 10 minutos foi realizada aplicação de 5 mg/kg cetamina e 0,25 mg/Kg de diazepam, por via intravenosa e manutenção da anestesia inalatória com isoflurano.

Como terapia pós-operatória foi recomendado 0,1 mg/Kg de meloxicam durante 2 dias e antibioticoterapia convencional. A técnica de castração sem pinças foi utilizada, no intuito de preservar ao máximo os ovários, tubas uterinas e útero, para a lavagem cuidadosa e a recuperação de estruturas embrionárias. Para a realização da OHE, foram utilizados os mesmos protocolos anestésicos, tratamento pós-operatório, antibioticoterapia e tratamento da ferida cirúrgica padrão, a menos que ocorresse alguma intercorrência que indicasse outro procedimento.

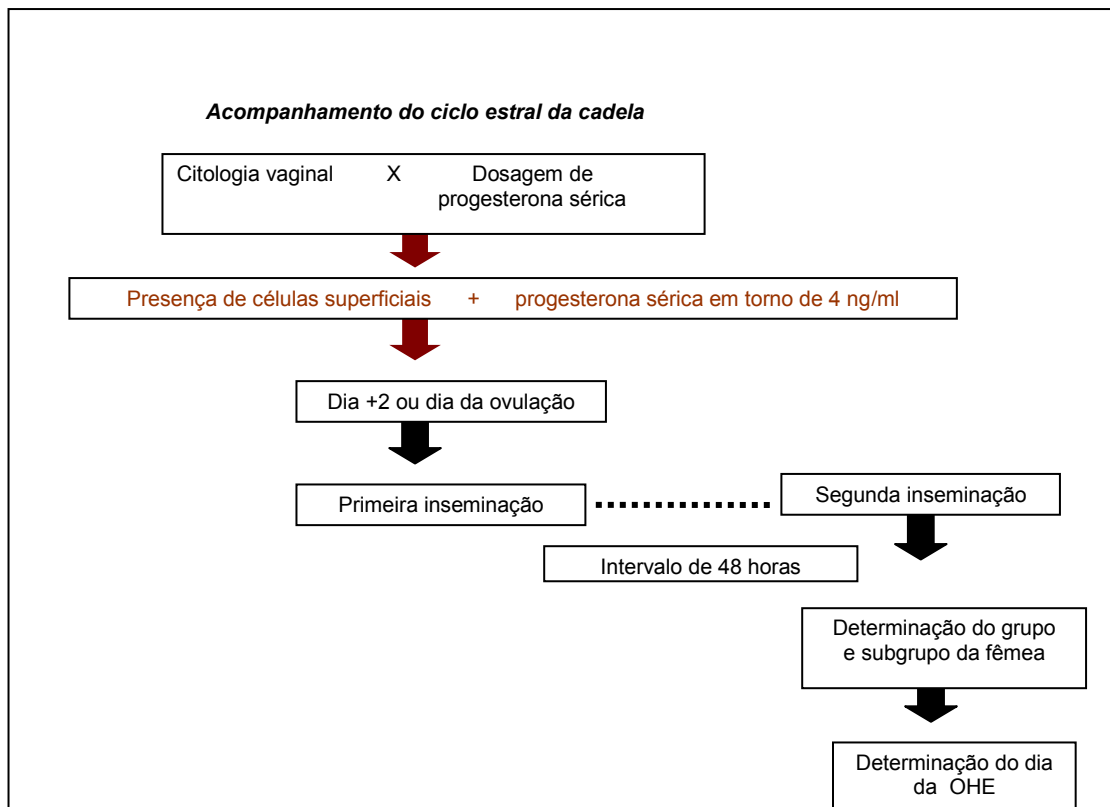


Figura 5: Esquema utilizado para realização das inseminações artificiais

3.6 Coleta, quantificação e classificação das estruturas embrionárias:

Após a OHE, as tubas uterinas e útero (Figura 6, 7, 8 e 9) foram devidamente isolados e os lavados foram realizados nas tubas uterinas (Figura 10), cornos e corpo uterino (Figura 11) nos dois grupos (GI e GII) pelo método de *flushing* uterino (DERUSSI et al., 2008).

As tubas e útero foram lavados cuidadosamente para a recuperação de embriões com solução PBS (DMPBS- Flush[®], Nutricell, Campinas, São Paulo), acrescida de heparina. Foram realizadas duas lavagens, uma em cada um dos cornos uterinos, uma em sentido crânio-caudal e outra caudal-cranial. Após esse procedimento foi realizada a abertura cuidadosa do corpo e cornos uterinos, que

foram novamente lavados, utilizando uma seringa de 10 mL adaptada a uma sonda uretral felina (Tomcat®, Provar, São Paulo, Brasil). Após delicada dissecação da porção do infundíbulo das tubas uterinas, com a preservação da junção útero-tubárica e a porção inicial dos cornos, foi realizada a lavagem das tubas uterinas também em ambos os sentidos

Em seguida os lavados foram transferidos para placas de Petri contendo meio PBS (Nutricell) e as placas foram previamente identificadas com o nome da porção correspondente, sendo observados em estereomicroscópio (Leica MZ 12,5®, Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha) para a contagem, avaliação morfológica das estruturas e classificação dos embriões quanto ao estágio de desenvolvimento em: mórula compacta (Mc) (Figura 12), blastocisto inicial (Bi), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be) (Figura 13). O índice de recuperação embrionário foi calculado através do valor total de embriões obtidos em todos os grupos, dividido pelo número total de copos lúteos x 100).



Figura 6: Técnica de OHE realizada na fêmea 36



Figura 8: Separação de cornos, tubas e ovários na fêmea 22



Figura 7: Identificação da tuba uterina na fêmea 36



Figura 9: Identificação o corno uterino, em destaque vesícula embrionária com 22 dias na fêmea 09

3.7 Separação das amostras de acordo com a atividade experimental:

3.7.1. Expressão Gênica:

3.7.1.1. Obtenção e armazenamento das amostras para avaliação de expressão gênica de embriões e tecido materno, através da avaliação quantitativa da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real após Transcrição Reversa (qRT-PCR).

Após o procedimento de coleta embrionária, foram seccionados fragmentos da parte média do corno uterino, vesículas embrionárias (Figura 14) e tuba uterina direita de todos os grupos (grupo IA, IB, IC, ID e II) e uma amostra de 100 mg de cada, foi armazenada em tubos criogênicos de 7,5 mL. (TPP, techno plastic products AG, Zollstr, Suíça). Esses criotubos após identificação foram armazenados em *racks* e congelados a -80°C.

Os embriões de cada animal, após o processo de identificação e classificação do estágio de desenvolvimento, foram lavados em PBS. Em seguida foi formado um pool de embriões por fêmea (cada fêmea produziu pelo menos 5 embriões). Cada pool foi considerado uma unidade experimental perfazendo um total de 15 unidades experimentais no grupo I. Os embriões coletados foram agrupados em 0,5 mL de solução de RNA later[®] (RNA stabilization Reagent, Qiagen, UK) e acondicionados em tubos criogênicos de 7,5 mL previamente identificados e congelados a -80C.

3.7.1.2. Extração do RNA de cornos uterinos, vesículas embrionárias e tubas uterinas:

No momento da extração de RNA, tanto a alíquota do corno uterino direito quanto da tuba uterina direita de cada fêmea, previamente congelada em nitrogênio líquido, foram homogeneizadas separadamente com homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O material insolúvel resultante da homogeneização foi

retirado por centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4 °C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante cinco minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleos/protéicos.

Após esse período, foi acrescentado 0,2 mL de clorofórmio, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente e incubando novamente, desta vez, por três minutos a temperatura ambiente. Após essa segunda incubação o material foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 4°C.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada, após a centrifugação do material, foi separada e precipitada por intermédio da incubação em 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em 30 µl de água ultrapura, incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C e, finalmente, armazenado a -80°C.

3.7.1.3. Extração do RNA de embriões (mórulas e blastocistos):

Todos os embriões foram descongelados no mesmo dia e submetidos às análises. Os embriões foram observados novamente em lupa estereomicroscópica para a realização da lavagem com PBS livre de cálcio associado a PVP, com intuito da retirada da solução de RNA later.

O processo de extração do RNA embrionário foi realizado utilizando o RNeasy micro Kit-Quigen (Hildesheim, Alemanha) seguindo os processos recomendados pelo fabricante, que consistiam em adição de 350 µl de tampão RLT, seguindo etapa de vertes, adição de etanol, centrifugação por 15 segundos, descarte do conteúdo, adição de 350 µl de tampão RW1, seguido

por centrifugação por 15 segundos e descarte novamente. Após esta etapa foi adicionado 10 ul de dnase I a 70 ul de tampão RDD e incubação de 80 ul desta solução por 15 minutos a 30 C. Com etapas finais seguidas pela adição de 350 ul de tampão RW1 e centrifugação por 15 segundos com descarte do conteúdo, adição de 500 ul de tampão RPE, centrifugação por 15 segundos e descarte do conteúdo. Adição de 500 ul de etanol com centrifugação por 2 minutos, colocação em novo tubo de descarte e adição e 14 ul de água livre de RNA, que corresponde ao volume final da amostra.

3.7.1.4. Quantificação do RNA obtido:

Foi obtida uma alíquota de 2 ul do RNA total extraído para a realização da quantificação de RNA. O RNA obtido da tuba, vesículas embrionárias e útero de todos os grupos foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, usando-se o fator de correção próprio para o RNA (40) e aparelho NanoVue Plus® (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). Foi também determinada a razão entre as medidas espectrofotométricas a 260/230 nm e 260/280 nm (razão entre a quantidade de RNA e proteínas), o que forneceu uma estimativa da qualidade da extração. O RNA embrionário não foi quantificado, pois o valor foi extremamente baixo para a capacidade de leitura adotada pelo aparelho.

3.7.1.5. Avaliação da qualidade (integridade) do RNA:

Para se obter informações quantitativas da integridade das amostras de RNA, foi utilizado o sistema 2100 Bioanalyzer ® (Agilent, EUA), que a partir da análise dos RNAs ribossomais baseadas em microfluidos, foi obtido o número da integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN). As amostras consideradas com RNA integro (FLEIGE e PFAFFL et al., 2006; BECKER et al., 2010), são aquelas que apresentam RIN acima ou igual a 7,0.

3.7.1.6. Tratamento do RNA com DNase:

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), o RNA total das amostras analisadas (fragmentos uterinos e tubáricos, vesículas embrionárias e pools embrionários) destinado à reação de transcrição reversa (2ug/ul) foram transferidos para microtubo estéril, onde foi acrescentado 2 µL de tampão DNase, 2µL de DNase I (1unidade/mL) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 22µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 min e, em seguida, foi acrescida de 2 µL de EDTA (25mM) e incubada a 65° C/10min.

3.7.1.7. Reação de Transcrição Reversa (RT):

A transcrição reversa do RNA total obtida dos fragmentos uterinos, tubáricos e de vesícula embrionárias foram realizadas usando o kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Alíquotas contendo 2 µg de RNA total ao qual foram adicionado 10 µl de Randon Primers (50 ng/µl), 4 µl de dNTP (100mM), 10 µl de tampão de transcriptase reversa (10X RT Buffer), 5 µl de enzima de transcriptase reversa MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µL), 5 µl do inibidor de RNase (20 U/µL) e o volume ajustado para 50 µl com água livre de nucleases. Cada amostra foi incubada a 25°C por 10 min e 37°C por 120 min, seguido, da inativação da transcriptase reversa a 85 °C por 5 min e o produto da reação armazenado a -20°C.

Para a reação de transcrição reversa (RT) em embriões, foi utilizado o “kit” SuperScript III (Invitrogen®), cujo protocolo inicia-se pela adição em tubo estéril de 8µl da solução de RNA total tratada com DNase, 1µl de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500 µg/mL), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 ul de água estéril. Essa solução foi incubada à 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minuto. Após essas etapas, foi adicionado à solução 4µl de tampão “First Strand” 5X, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de “RNase OUT Inhibitor”

(40unidades/ μ l). Na seqüência, foi acrescentado 1 μ l (200 U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. As amostras foram mantidas em gelo para utilização imediata na PCR ou armazenadas (-20° C).

3.7.1.8. Quantificação em tempo real pela Reação em Cadeia da Polimerase (RT-qPCR):

A PCR em Tempo Real foi realizada com o *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando-se 1 μ L do produto da RT (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 μ L de *Power SYBR® Green Mix* (2,5X), primers “sense” e “anti-sense” (nas concentrações ótimas previamente testadas) e água-DEPC suficiente para um volume final de 25 μ L de solução. Os primers para os genes analisados (Tabela 2) foram desenhados através do software *Primer Express®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e obtidos a partir de seqüências publicadas no GenBank (www.pubmed.com) para garantir a especificidade das seqüências-alvo, e evitar a formação de estruturas secundárias dos primers e a dimerização dentro de cada primer e entre os primers sense e anti-sense. Os primers foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA) e os fragmentos dos produtos de qPCR que tinham de 80-250 pares de bases e o tamanho dos produtos do PCR foram confirmados em gel de agarose 1% em tampão TAE (1x) corado com SYBR safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Foi testada a concentração ótima dos primers (100 a 500 nM), e a análise da curva de anelamento para identificar a formação de dímeros dos primers e a especificidade da reação. As condições dos ciclos da reação do qPCR foram padronizadas de acordo com as instruções do fabricante do equipamento adquirido

As reações para cada gene foram realizadas em duplicatas, no Sistema *Real Time PCR 7300* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão

gênica referente à tuba uterina e útero foram realizadas em um mesma placa e no mesmo dia e o material referente aos embriões e vesículas embrionária também foram realizadas em um mesma placa e no mesmo dia. Ao término de cada PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. Os valores obtidos foram normalizados pelos valores obtidos para o gene constitutivo. Foram testados vários genes de referência: GAPDH, HPRT e 18S de acordo com metodologia descrita por Vandesompele et al. (2002). Os valores obtidos foram normalizados pelo fator de normalização dos genes constitutivos mais estáveis. O número ótimo e a escolha dos genes de referência foram experimentalmente determinados (BUSTIN et al., 2009).

Tabela 2: Primers para genes candidatos (ER- β , ER- α , PR, OTR, OPN, LIF, LIFR) e de referência (HPRT, GADPH, 18S) utilizados na técnica de q-PCR. Botucatu, 2012.

Genes	Sequência (5' – 3')
ERα	F: AACGCCTCTGTCTCGTCTGT R: GTACTCAATGCTCCCCTGGA
ERβ	F: TCCCAGCAGTGCCAATAACTCAGA R: TGCATACAGAAGTGACGACTGGCA
PR	F: CAAACATGTCAGTGGGCAGATGC R: CTGCCACATGGTGAGGCATAATGA
OTR	F: TCATCGTGTGCTGGACGCCG R: AAAGCCGAGGCTTCCTTGGGC
OPN	F: AGCTGAGAGCAAGTGATGAGAGCA R: TGGCTGACAAGTTCACTGCTGACT
LIF	F: CAGCGCCAATGCCCTCTTTATTCT R: AATGGTGGGAAGTCTGTCACGTTG
LIF-R	F: GGGGTTTGGAGTCAGGTCGGTC R: GGCCCATCCCACCGTCTGTA
HPRT	F: TGGAGATGACCTCTCAACTTTAACTG R: TTGGATTATACTGCGCGACCAAGG
GADPH	F: GGAGAAAGCTGCCAAATATG R: ACCAGGAAATGAGCTTGACA
18S	F: TCAACTTTTCGATGGTAGTGGCCGT R: 5TCCTTCCTTAGATGTGGTAGCCGT



Figura 10: Lavagem de tuba uterina da fêmea 22



Figura 11: Lavagem de corno uterino da fêmea 22



Figura 12: Mórulas recuperadas da fêmea 36

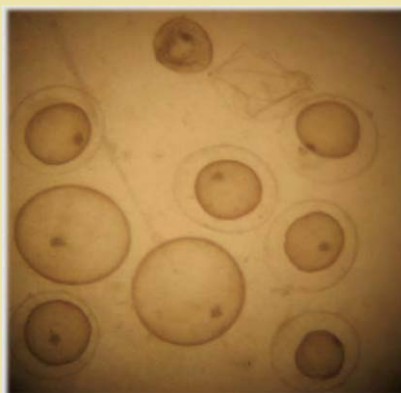


Figura 13: Blastocistos expandidos recuperados da fêmea 22



Figura 14: Vesícula embrionária da fêmea 24

3.7.2. Análise ultraestrutural:

3.7.2.1. Obtenção e armazenamento das amostras para realização da análise ultra-estrutural de embriões e tecido materno através da microscopia eletrônica de transmissão:

Foram selecionadas amostras uterinas e tubáricas dos grupos: GIA, GIB, GIC e grupo controle. Duas fêmeas foram selecionadas aleatoriamente de cada grupo. Para estas fêmeas selecionadas, foi sorteado um embrião de cada, sem prévia seleção de sua morfologia, para a utilização no preparo de espécimes para microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Segmentos da porção média da tuba uterina direito e corno uterino direito foram retirados das mesmas fêmeas sorteadas, inclusive as do grupo controle. No grupo IC (Implantado) foram retirados tanto fragmentos da porção direta do útero com e sem implantação. Foi realizado corte fino através de navalha até a obtenção de fragmento com 1 mm de espessura. Esses fragmentos foram armazenados em frascos de vidro esterilizados, contendo solução de glutaraldeído 2,5% para a fixação do material. Esses frascos permaneceram em temperatura ambiente por 3 horas e posteriormente foram acondicionados a 5°C, por 24 horas.

Os embriões foram armazenados íntegros em tubos plásticos TPP, de 1,5 mL contendo também solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato a 0,1M (pH 7,4) e, posteriormente, em 1% de tetróxido de ósmio utilizando o mesmo tampão, desidratação em séries crescentes de acetona e embebição Epon 812.

Os cortes ultrafinos embrionários, uterinos e tubáricos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grade de cobre e corados com acetato de urânio e citrato de chumbo. As amostras após inclusão, polimerização, ultramicrotomia e coloração foram examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Philips (modelo EM 301, Philips AG – Holanda), no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu-SP.

3.7.3. Caracterização eletroforética:

3.7.3.1. Obtenção e armazenamento das amostras para realização da caracterização eletroforética através da técnica de eletroforese unidimensional:

Após o *flushing* uterino e tubárico dos grupos I e II, foi realizado o acondicionamento deste lavado em tubos plásticos de 1,5 ml com tampa, devidamente identificados e congelados a -20°C, sendo a análise realizada apenas dos lavados da porção direita de cada fêmea.

3.7.3.2. Preparo do pool dos grupos analisados:

As amostras foram descongeladas lentamente em ambiente refrigerado a 18°C e acondicionadas em gelo triturado. Após isto, as amostras foram centrifugadas utilizando centrífuga refrigerada (Modelo 5417 R, Eppendorf) a 1500 x g, durante 5 minutos, a 4°C, para remoção de sujidades contida no lavado. Foram preparados os pools dos lavados, cada um, contendo 5 amostras, sendo no total 8 pools (4 pools de útero: Grupo IA, IB, IC e II e 4 pools de tuba: IA, IB, IC e II).

Foram coletados 700 µl de cada amostra, totalizando 3500 µl para formar cada pool. Este foi microfiltrado utilizando Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices-10K- Millipore, com intuito de concentrar as proteínas existentes. O concentrado pré-filtrado e pós filtrado foram quantificados utilizando o método do Ácido Bicinconínico (BCA) de acordo com Smith et al. (1985).

A eletroforese unidimensional foi realizada conforme descrito por Bollag adaptado por Souza et al (2003) utilizando gel 12% poliacrilamida (Tabela 3) e gel de empilhamento de 5% (Tabela 4).

As corridas eletroforéticas foram realizadas em mini cubas verticais (Hoefer MiniVE Vertical Electrophoresis System - Amersham Biosciences). Após a limpeza das placas de vidro com álcool etílico 96°, as mesmas foram montadas sobre o suporte da cuba.

Os géis de separação a 12% foram preparados, conforme descrito na tabela 3 e depositados entre as placas de vidro, com auxílio de uma pipeta plástica descartável de 10 mL. Cerca de 2 ml de água MilliQ foi depositada sobre o gel para impedir o contato com o ar, possibilitando uma superfície mais homogênea. Um período de 15 a 30 minutos foi aguardado para que a polimerização do gel ocorresse. Durante este intervalo, as amostras foram diluídas em PBS, numa concentração final de 5,52 µg/µl de proteína total e misturadas ao tampão da amostra (TRIS-HCl 60 mM, pH 6,8, glicerol 50%, SDS 2% mercapetanol 23 mM, 0,1% bromofenol azul em água MilliQ), na proporção de 1 de tampão para 4 de amostra e homogeneizadas no agitador de tubos (Multimixer, Biomixer, modelo MVS-1, Brasil). Então, foram fervidas, em torno de 100°C, durante 7 minutos.

O gel de empilhamento a 5 % (tabela 4) e colocado sobre os géis de separação já polimerizados, após a absorção da água com um papel de filtro. Um molde de polietileno em forma de pente foi acomodado sobre o gel de empilhamento de modo a formar canaletas para permitir a aplicação das amostras. Após a polimerização do gel de empilhamento, o molde foi retirado e os suportes contendo as placas foram colocados na cuba de corrida. O tampão de corrida (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% em água MilliQ), já diluído na proporção de 1 de tampão para 4 de água, foi adicionado às cubas.

Um padrão de massa molar (Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, 10 a 250 KDaa, Amersham Biosciences) foi corrido juntamente com as amostras. Foram realizadas 5 repetições de cada pool sob as mesmas condições.

A cuba foi acoplada a uma Fonte Elétrica Bipolar (EPS 300 Power Supply, Amersham Biosciences), numa corrente elétrica constante de 25 mA. A corrida ocorreu em média a uma velocidade de 289,5 V / 1 hora e 31 minutos.

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com prata utilizando o protocolo de coloração com prata descrito por Wray et al., (1981). Após a coloração, as imagens dos géis foram digitalizadas (VDS, Amersham Biosciences) e lidas no programa Image Master,(Amersham Biosciences), do Departamento de

Física e Biofísica, Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP, o que possibilitou a determinação da massa molar e a densidade óptica integrada (IOD) para cada banda, de cada amostra no gel.

Tabela 3: Componentes do gel de empilhamento numa concentração de 12% de poliacrilamida para o SDS-PAGE. Botucatu, 2012.

Concentração de Poliacrilamida	12%
Solução A (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida)	6 mL
Solução C (TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8, 0,4% SDS em água MilliQ)	3,75 mL
Água MilliQ	4,75 mL
Persulfato de amônia 10%	100 µL
TEMED	15 µL
VOLUME TOTAL	15,0 mL

Tabela 4: Componentes do gel de empilhamento numa concentração de 5% de poliacrilamida para o SDS-PAGE. Botucatu, 2012.

Concentração de Poliacrilamida	5%
Solução A (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida)	0,67 mL
Solução C (TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8, 0,4% SDS em água MilliQ)	1,0 mL
Água MilliQ	2,3 mL
Persulfato de amônia 10%	30 µL
TEMED	5 µL
VOLUME TOTAL	4,0 mL

3.8. Análise estatística:

Em relação aos dados obtidos na avaliação da expressão gênica de tecidos tubáricos e uterinos, a expressão do gene alvo foi normalizada pelo gene GAPDH e os resultados foram avaliados através do sistema Graphpad Prisma 5 Project. Utilizou-se teste t pareado para analisar os resultados obtidos entre os diferentes tipos de tecido e Anova para analisar os resultados com o mesmo tipo de tecido entre os diferentes grupos. Foram adotados níveis de significância superiores a 5 % ($P \leq 0.05$). Em relação aos dados obtidos na análise da expressão em embriões, a expressão do gene alvo foi normalizada pelo gene HPRT e a quantidade relativa de mRNA foi determinada pelo método $\Delta\Delta Ct$ corrigido pela eficiência de amplificação utilizando a equação de Pfaffl. As quantidades relativas de mRNA foram comparados pelo teste t.

Na análise da microscopia eletrônica de tecidos uterinos, tubáricos e de embriões foram realizadas interpretações das eletromicrografias e análise descritiva dos resultados observados. Na avaliação do perfil protéico do lavado de tubas e útero dos grupos I (GIA, GIB, GIC) e grupo II, a metodologia estatística usada para se comparar as análises de eletroforese unidirecional foi o teste de Fisher para comparar a presença/ausência das bandas com diferentes massas molares nas cinco replicatas realizadas com o pool nos diferentes momentos da tuba e do útero.

4. RESULTADOS

4.1.1. Dosagem de P₄ sérica:

As concentrações de P₄ observadas no acompanhamento do ciclo estral das cadelas do grupo I (subgrupo IA, IB e IC), apresentaram valores entre 0,09 a 1,9 ng/mL durante o proestro citológico, enquanto no grupo controle ou diestro cíclico esses valores variaram de 0,62 a 1,93 ng/mL (Anexo).

O gráfico 1 contém os valores médios de P₄ observados nas fêmeas dos grupos experimental e controle em relação aos valores de referência adotados:

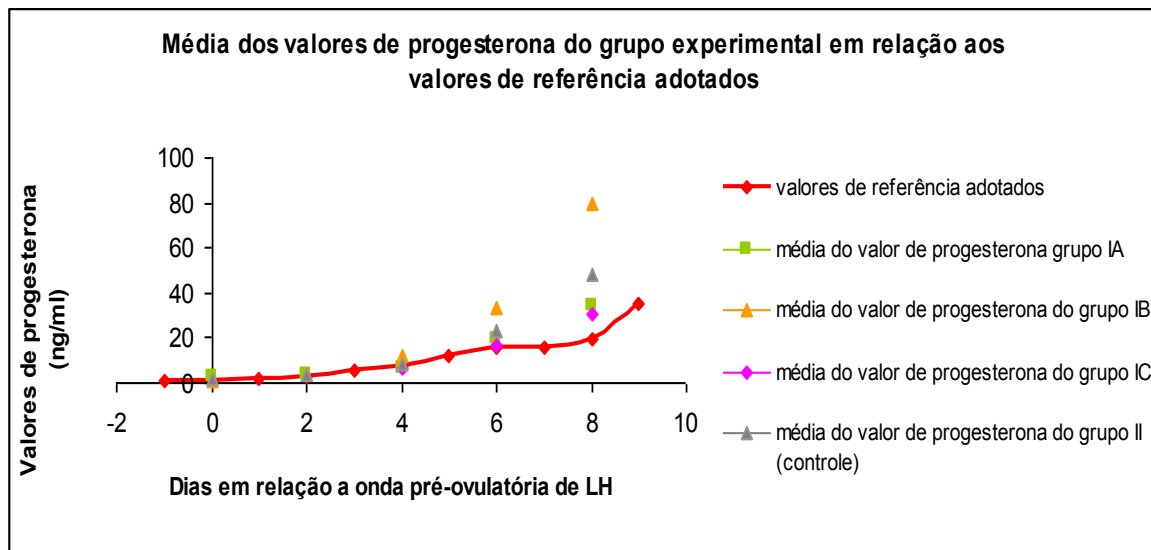


Gráfico 1: Média dos valores de P₄ obtidos em relação ao surgimento da onda pré-ovulatória de LH (dia 0) nas cadelas do grupo experimental e controle.

4.1.2. Recuperação de estruturas embrionárias:

Posteriormente a processo de inseminação, foi realizado a OHE, no intuito de realizar a coleta de estruturas embrionárias e fragmentos de tecido tubárico e uterino. As estruturas coletadas e corpos lúteos quantificados encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5- Idade embrionária determinada pela contagem de dias após o surgimento da onda pré-ovulatória de LH (dia 0), número de corpos lúteos e número de estruturas recuperadas no grupo experimental (Grupos IA, IB e IC). Botucatu, 2012.

GRUPO	FÊMEA	DIA EM RELAÇÃO AO DIA 0	PROVÁVEL IDADE EMBRIONÁRIA	NÚMERO DE CORPOS LÚTEOS	NÚMERO DE ESTRUTURAS RECUPERADAS
GRUPO IA	11	+9	5 dias	10	10 mórulas
	20	+9	5 dias	6	05 mórulas
	36	+10	6 dias	8	06 mórulas
	39	+8	4 dias	9	07 mórulas
	38	+9	5 dias	9	09 mórulas
GRUPO IB	05	+15	11 dias	12	12 blastocistos
	15	+15	11 dias	6	06 blastocistos
	16	+15	11 dias	6	06 blastocistos
	22	+16	12 dias	14	14 blastocistos
	37	+19	15 dias	9	09 blastocistos
GRUPO IC	06	+23	19 dias	5	02 vesículas
	07	+25	21 dias	3	03 vesículas
	24	+25	21 dias	7	03 vesículas
	23	+25	21 dias	4	04 vesículas
	34	+23	19 dias	6	03 vesículas

O índice de recuperação embrionário foi de 94,38% quando considerados a recuperação somente de mórula e blastocistos. Em média foram recuperados $8,4 \pm 2,95$ embriões/ fêmea. A recuperação de blastocistos foi de 100%, a de mórulas foi de 88% e a de vesículas implantadas foi de 60%.

Tabela 6- Determinação do provável dia do surgimento da onda pré-ovulatória de LH, número de corpos lúteos e número de estruturas coletadas no grupo controle. Botucatu, 2012.

Grupo	Fêmea	Provável dia em relação ao Dia O	Número de corpos lúteos	Número de estruturas recuperadas
Grupo II	01	+ 12	2	-
	02	+ 12	10	4 oócitos
	09	+ 12	3	-
	10	+ 12	4	4 oócitos
	13	+ 12	3	3 oócitos

A recuperação de oócitos foi de 50 %, dado pelo número de oócitos recuperados/número de corpos lúteos.

4.1.3. Avaliação da expressão gênica

Após o processo de coleta das estruturas foi realizada a extração do RNA dos tecidos tubáricos, uterinos e dos embriões. As amostras de tecido materno foram quantificadas para determinação do valor de RNA total e foi realizada a análise qualitativa deste RNA. As amostras utilizadas neste experimento apresentaram média de RNA em torno de $7,0 \pm 0,61$, sendo consideradas com RNA integro (FLEIGE e PFAFFL et al., 2006; BECKER et al., 2010). Os resultados do qRT-PCR em útero, tuba e vesículas encontram-se nas Tabelas 7,8 e 9. e graficos de 2, 3, 4, 5, 6 e 7

Tabela 7- Valores das Médias e desvio padrão obtidos na expressão do mRNA dos genes alvos (PR, ER- β , ER- α , OTR, LIF, LIF-R e OPN) em útero de cadelas não gestantes (grupo II), cadelas em diferentes fases da gestação (Grupo IA, IB, IC, ID) e vesícula embrionária (Grupo IC- vesícula). Botucatu, 2012.

	Grupo IA	Grupo IB	Grupo IC	Grupo IC- vesículas	Grupo ID	Grupo II
PR	1,82 $\pm$ 0,31 ^{AF}	1,1 $\pm$ 0,15 ^B	1,05 $\pm$ 0,29 ^C	0,426 $\pm$ 0,435 ^{EF}	0,07 $\pm$ 0,05 ^{ADE}	2,12 $\pm$ 0,17 ^{BCD}
ER- β	3,24 $\pm$ 0,24	5,26 $\pm$ 0,31 ^{AC}	3,4 $\pm$ 0,89	0,196 $\pm$ 0,30 ^{CD}	0,01 $\pm$ 0,001 ^{ABD}	5,2 $\pm$ 1,2 ^B
ER- α	0,33 $\pm$ 0,12 ^A	0,33 $\pm$ 0,12 ^B	0,55 $\pm$ 0,16 ^C	0,274 $\pm$ 0,116 ^E	0,94 $\pm$ 0,18 ^{ABCDE}	0,41 $\pm$ 0,13 ^D
OTR	0,12 $\pm$ 0,07 ^{AE}	0,14 $\pm$ 0,06 ^{BF}	0,41 $\pm$ 0,29 ^C	1,26 $\pm$ 0,64 ^{EF}	1,41 $\pm$ 0,22 ^{ABCD}	0,17 $\pm$ 0,08 ^{UG}
LIF	0,0064 $\pm$ 0,0039	0,0022 $\pm$ 0,0018 ^A	0,0093 $\pm$ 0,0029 ^C	0,10 $\pm$ 0,007 ^D	1,26 $\pm$ 0,099 ^{ABCD}	0,0054 $\pm$ 0,0019 ^B
LIF-R	0,67 $\pm$ 0,24 ^C	0,24 $\pm$ 0,15 ^A	0,37 $\pm$ 0,22 ^B	0,22 $\pm$ 0,24 ^E	0,37 $\pm$ 0,23 ^D	1,20 $\pm$ 0,19 ^{ABCDE}
OPN	0,52 $\pm$ 0,54 ^A	0,065 $\pm$ 0,061	0,14 $\pm$ 0,031	0,084 $\pm$ 0,059 ^{AB}	0,14 $\pm$ 0,03 ^B	0,02 $\pm$ 0,16

Letras iguais na mesma linha indicam diferença estatística, p <0,05

Tabela 8- Valores das Médias e desvio padrão obtidos na expressão do mRNA dos genes alvos (PR, ER- β , ER- α , OTR, LIF, LIF-R e OPN) em tuba de cadelas não gestantes (grupo II) e cadelas em diferentes fases da gestação (Grupo IA, IB, IC, ID). Botucatu, 2012.

	Grupo IA	Grupo IB	Grupo IC	Grupo ID	Grupo II
PR	0,55 $\pm$ 0,29	1,14 $\pm$ 0,73	0,84 $\pm$ 0,26	0,59 $\pm$ 0,08	0,83 $\pm$ 0,32
ER- β	0,07 $\pm$ 0,028 ^A	0,21 $\pm$ 0,096	0,13 $\pm$ 0,051	0,01 $\pm$ 0,002 ^B	0,29 $\pm$ 0,051 ^{AB}
ER- α	0,13 $\pm$ 0,10 ^A	0,19 $\pm$ 0,03 ^B	0,24 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,09 ^{ABC}	0,13 $\pm$ 0,05 ^C
OTR	0,16 $\pm$ 0,19	0,22 $\pm$ 0,09	0,38 $\pm$ 0,36	0,49 $\pm$ 0,18 ^A	0,02 $\pm$ 0,01 ^A
LIF	0,0064 $\pm$ 0,004 ^D	0,0047 $\pm$ 0,0041 ^A	0,0066 $\pm$ 0,006 ^C	0,12 $\pm$ 0,13 ^{ABCD}	0,0059 $\pm$ 0,0023 ^B
LIF-R	0,12 $\pm$ 0,18 ^C	0,23 $\pm$ 0,04 ^A	0,22 $\pm$ 0,19 ^B	0,27 $\pm$ 0,074 ^D	0,74 $\pm$ 0,09 ^{ABCD}
OPN	0,52 $\pm$ 0,32 ^C	0,36 $\pm$ 0,04 ^A	0,16 $\pm$ 0,049	0,16 $\pm$ 0,09 ^{ABC}	0,02 $\pm$ 0,016 ^B

Letras iguais na mesma linha indicam diferença estatística, p <0,05

Tabela 9- Valores das médias e desvio padrão obtidos na expressão do mRNA dos genes alvos (PR, ER- β , ER- α , OTR, LIF, LIF-R e OPN) em mórulas e blastocistos. Botucatu, 2012.

	Mórulas	Blastocistos
PR	-	0.62 $\pm$ 0.26
ER- β	-	-
ER- α	-	0.57 $\pm$ 0.25
OTR	24.68 $\pm$ 7.8 ^a	0.61 $\pm$ 0.13 ^a
LIF	-	-
LIF-R	-	4.20 $\pm$ 0,02
OPN	-	-

Letras iguais na mesma linha indicam diferença estatística, p <0,05

As diferenças de expressão dos genes analisados em útero, vesículas embrionárias e tubas encontram-se demonstrados nos gráficos 2, 3, 4,5,6,7 e 8.

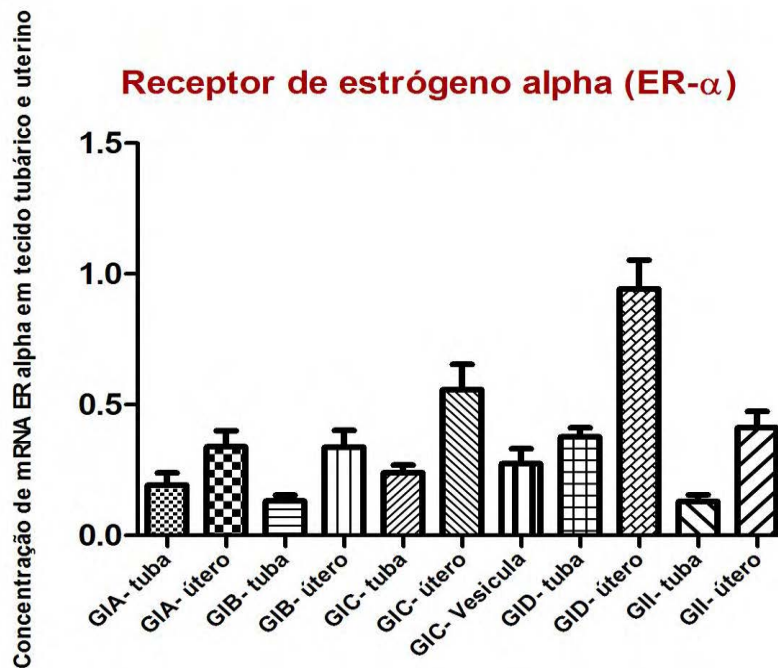


Gráfico 2: Expressão de mRNA ER alpha em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC-vesícula).

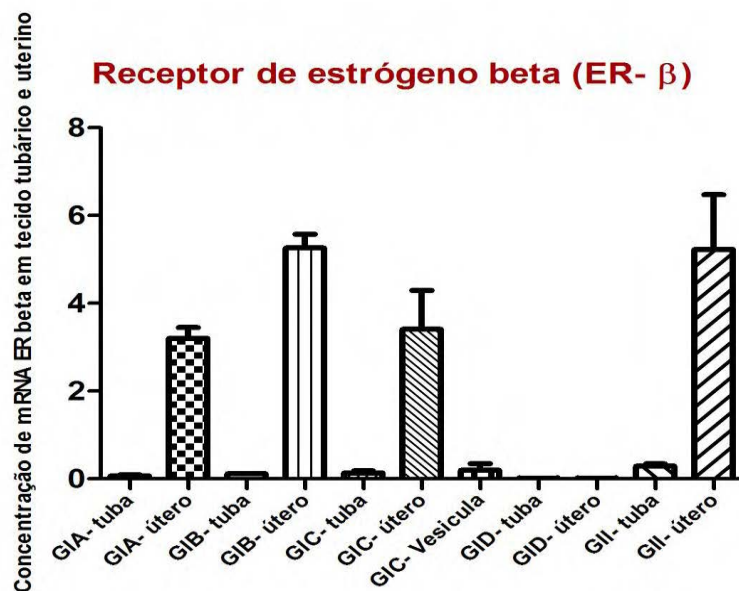


Gráfico 3: Expressão de mRNA ER beta em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC-vesícula).

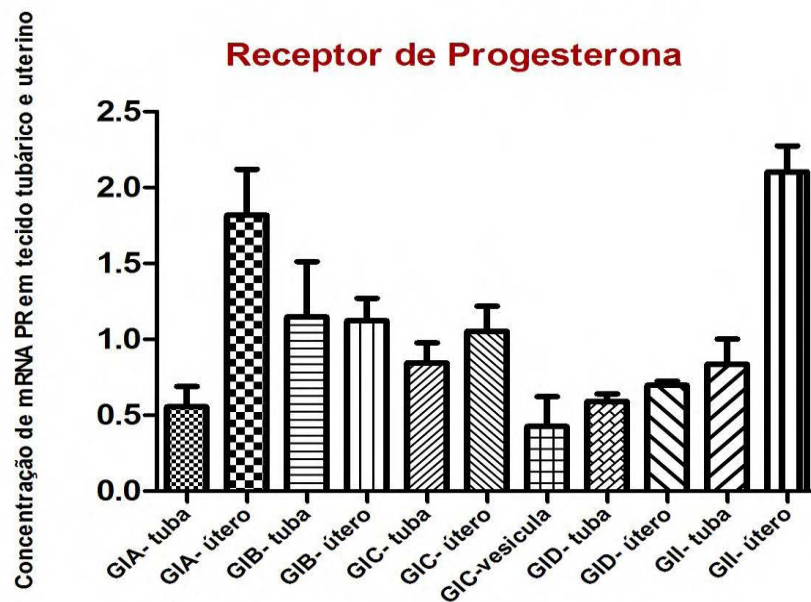


Gráfico 4: Expressão de mRNA PR em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).

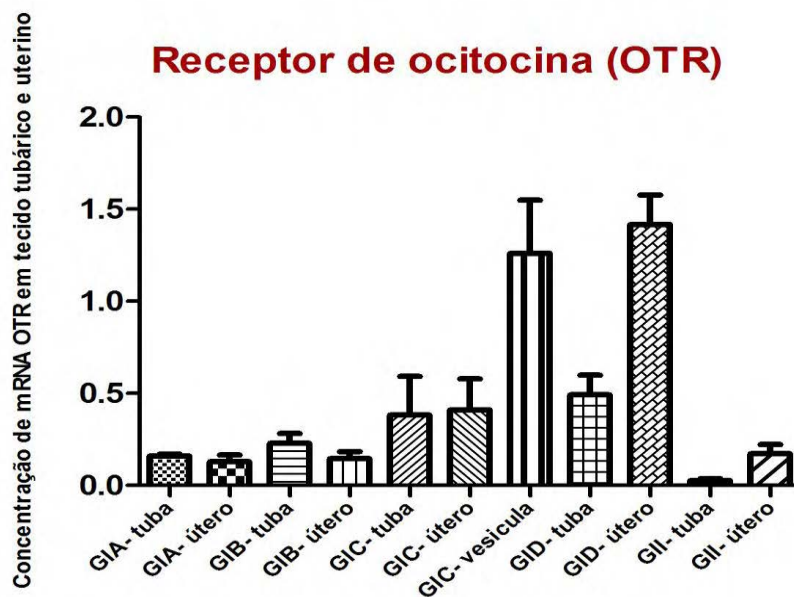


Gráfico 5: Expressão de mRNA OTR em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).

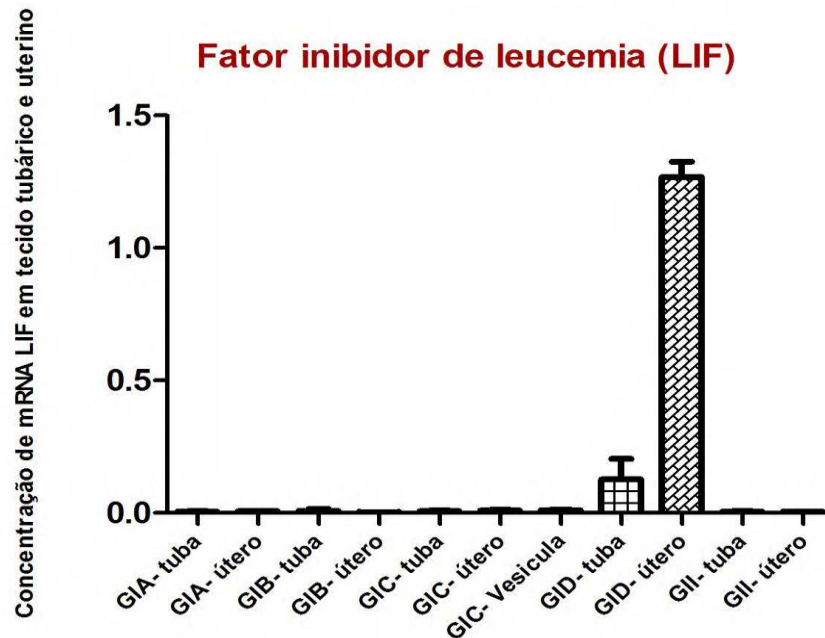


Gráfico 6: Expressão de mRNA LIF em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).

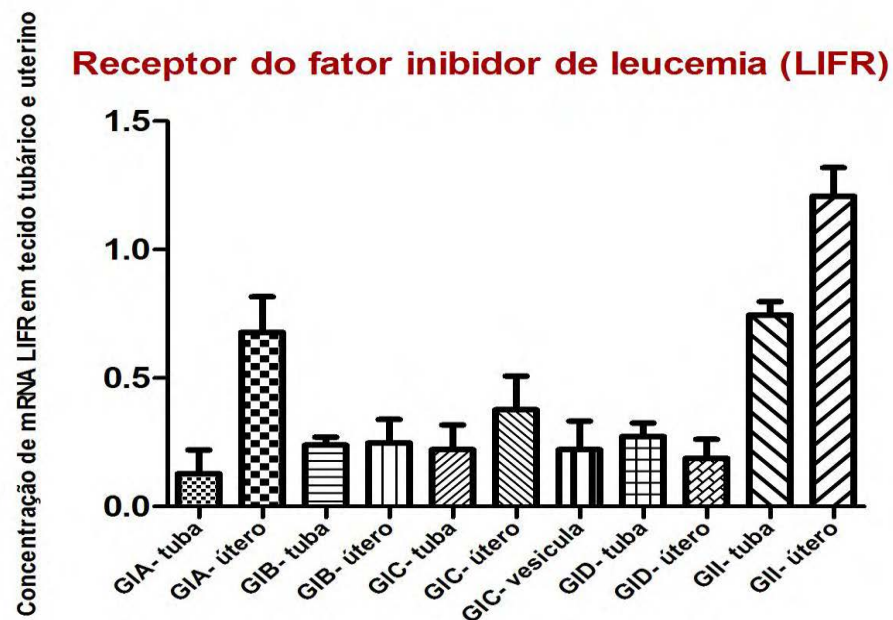


Gráfico 7: Expressão de mRNA LIFR em tuba e útero (GIA, GIB, GIC, GID) e vesícula embrionária (GIC- vesícula).

4.1.4. Avaliação ultraestruturais de embriões, tubas e útero durante o período peri-implantação

A análise ultra-estrutural de fragmentos tubaricos e uterinos, foram realizadas em todos os grupos (figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26). Foram utilizadas o segmento médio da tuba uterina, que corresponde a região da ampola uterina e a parte média do corno uterino, em todas as fêmeas analisadas. A região correspondente ao sítio de implantação (Grupo IC), também foi analisada, porém não foi detectada sinais que indicassem presença embrionária no corte analisado.

4.1.4.1. Análise ultraestrutural do segmento médio das tubas uterinas

Grupo IA (8 dias de gestação)

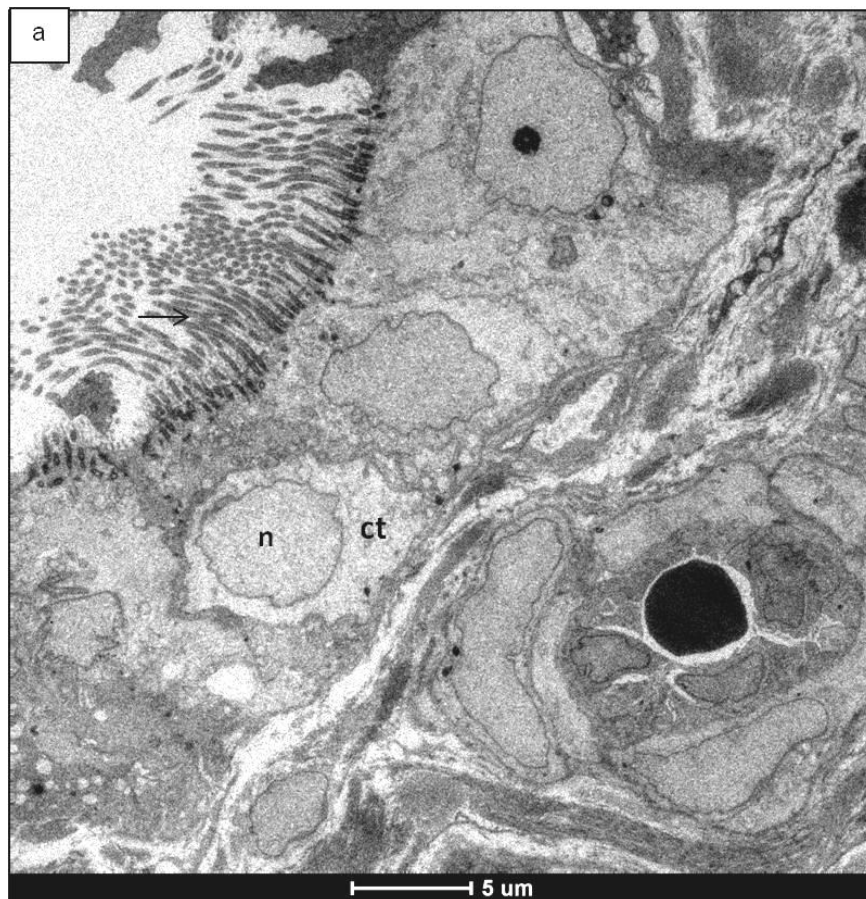


Figura 15a: Cortes transversais da tuba evidenciando a mucosa com epitélio cúbico simples que se invagina ao longo do seu trajeto, contendo células ciliadas, apresentando núcleo arredondado (n), com grande cromatina difusa e região citoplasmática eletrônica-lúcida (ct) e cílios na superfície luminal (seta).

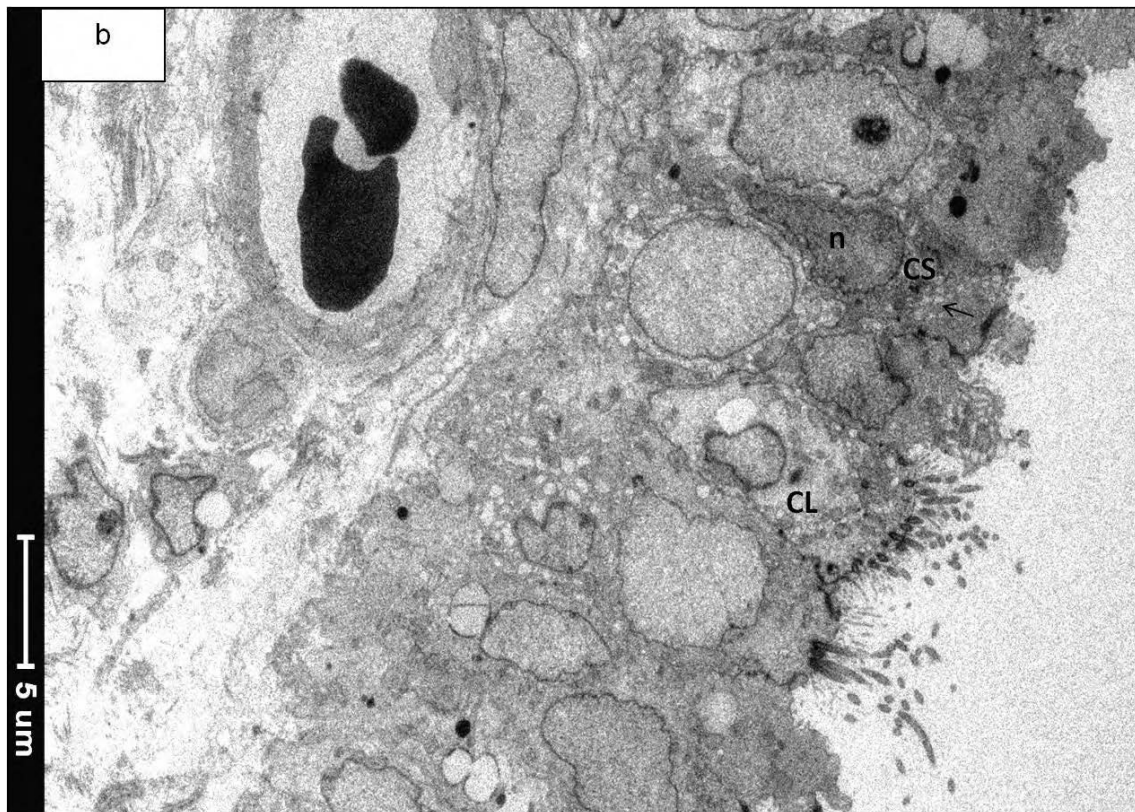


Figura 15b: Cortes transversais da tuba evidenciando a mucosa com epitélio cúbico simples que se invagina ao longo do seu trajeto, contendo dois tipos celulares evidentes: células ciliadas (cl) entremeadas com células secretoras (cs). As células secretoras se apresentam também com núcleo grande arredondado (n), cromatina difusa e citoplasma repleto de vacúolos elétron-lúcidos (seta).

Grupo IB (12 dias de gestação)



Figura 16a: Cortes transversais da tuba evidenciando a mucosa com epitélio cúbico simples que se invagina ao longo do seu trajeto, contendo dois tipos celulares evidentes: células ciliadas (CL) entremeadas com células secretoras (CS). As células secretoras se apresentam também com núcleo grande arredondado (n2), cromatina difusa e citoplasma repleto de vacúolos elétricos-lúcidos (seta). As células ciliadas, apresentando núcleo arredondado (n1), com grande cromatina difusa.

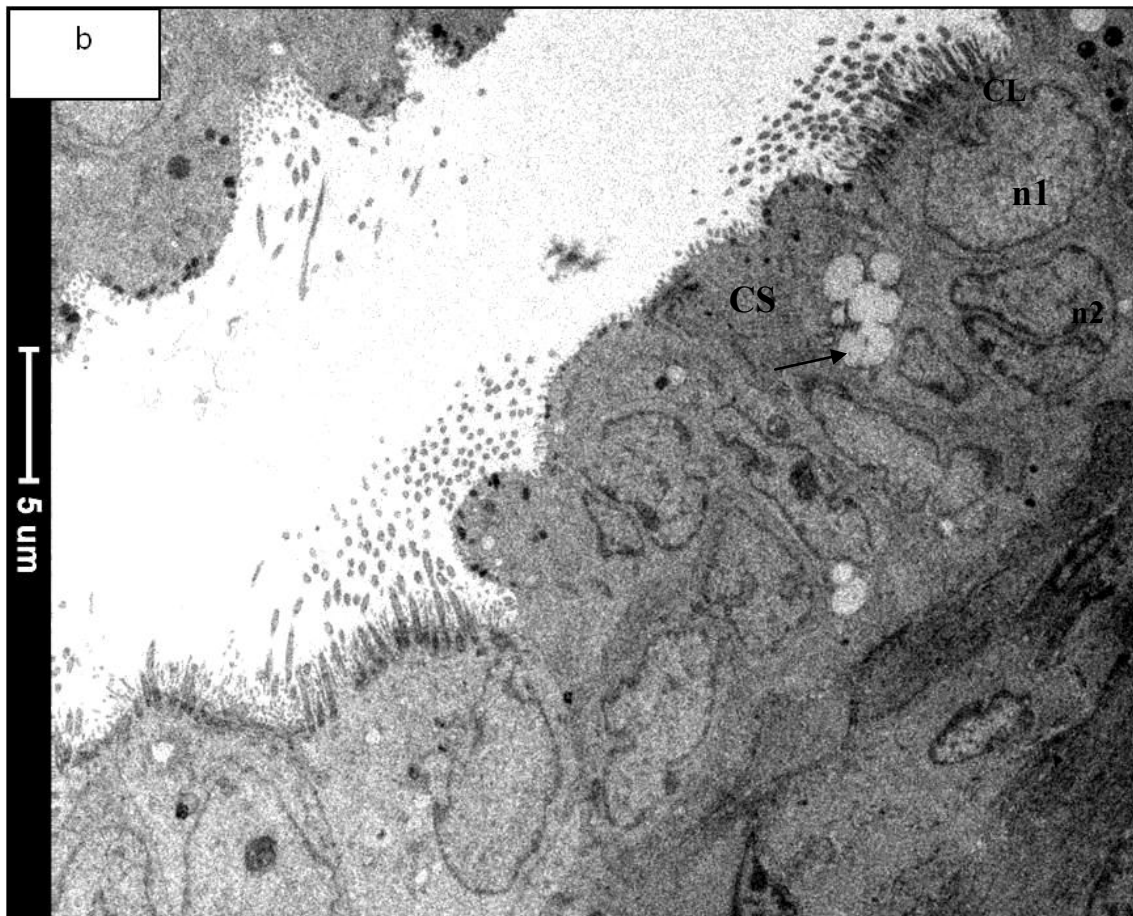


Figura 16b: Células ciliadas (CL) entremeadas com células secretoras (CS). As células secretoras se apresentam também com núcleo grande arredondado (n2), cromatina difusa e citoplasma repleto de vacúolos elétron-lúcidos (seta). As células ciliadas, apresentando núcleo arredondado (n1), com grande cromatina difusa.

Grupo IC (21 dias de gestação)

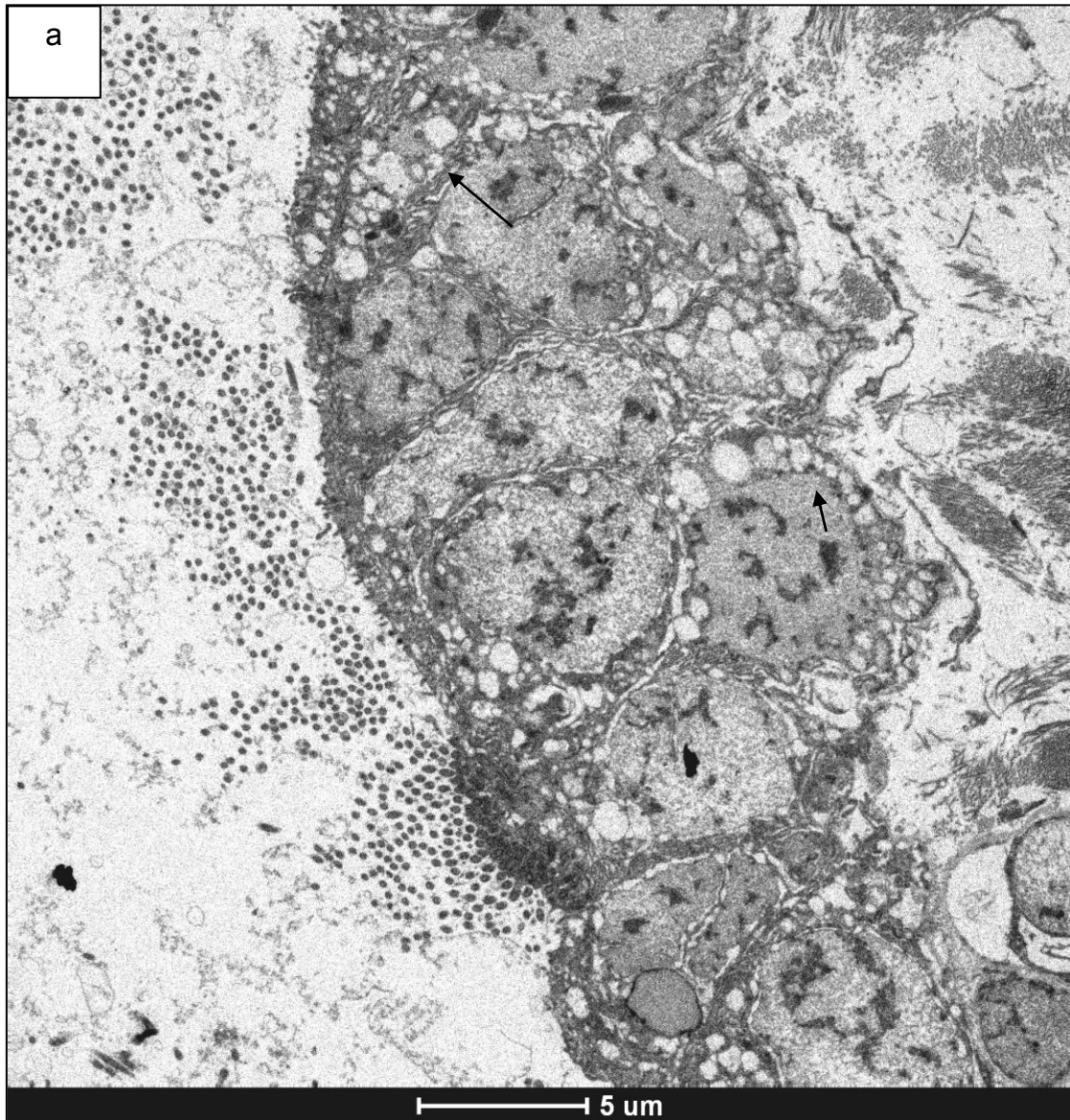


Figura 17: Cortes transversais da tuba uterina. Observa-se um grande aumento de grânulos elétronicamente claros (nos citoplasmas de ambos os tipos celulares já descritos (seta))

Grupo II (12 dias de diestro não gestacional)



Figura 18a: Epitélio cúbico pseudoestratificado com células ciliadas (CL) apresentando núcleo grande arredondado (n) próximo à superfície luminal com cromatina granulosa (seta cg) em alguns pontos, citoplasma elétron-denso com algumas mitocôndrias (seta mt)).

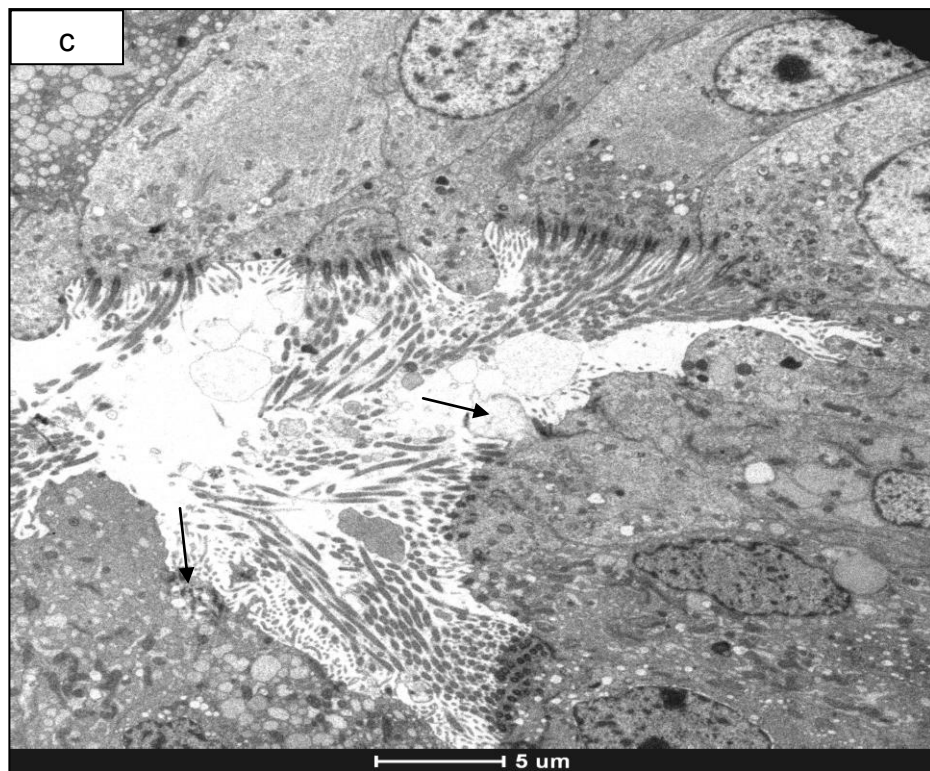
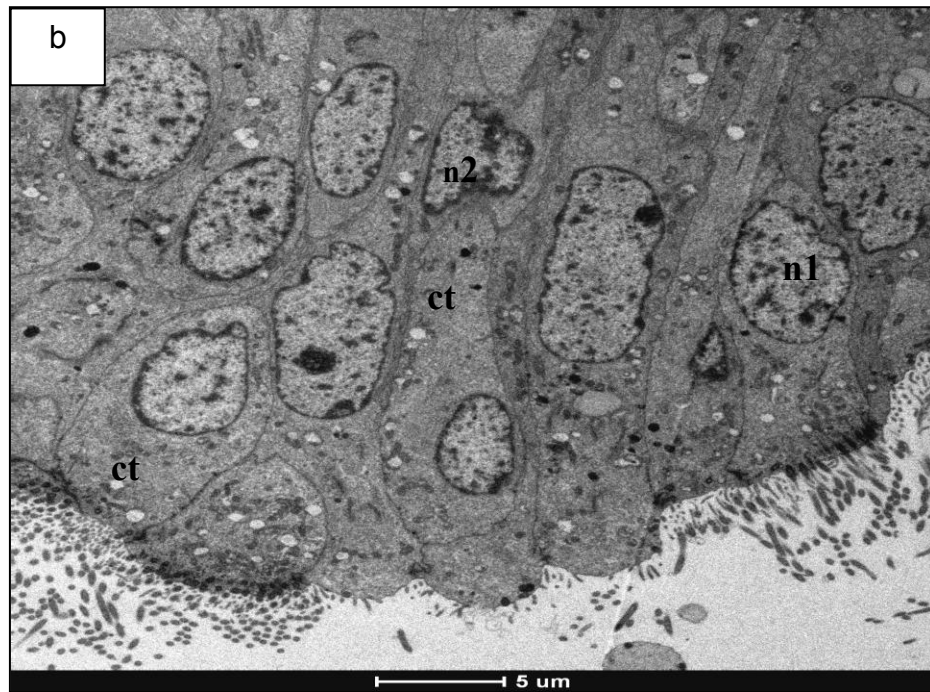


Figura 18b: As células secretoras possuem núcleo (n2) situado mais na superfície adluminal com as mesmas características do núcleo (n1) das células ciliadas, mas o citoplasma (ct), em algumas se projeta parcialmente para a luz da tuba (foto b,c). Observa-se vacúolos de secreção (seta) na luz da tuba e uma exocitose de um vacúolo por uma célula secretora.

4.1.4.2. Análise ultraestrutural do segmento médio dos cornos uterinos

Grupo IA (8 dias de gestação)

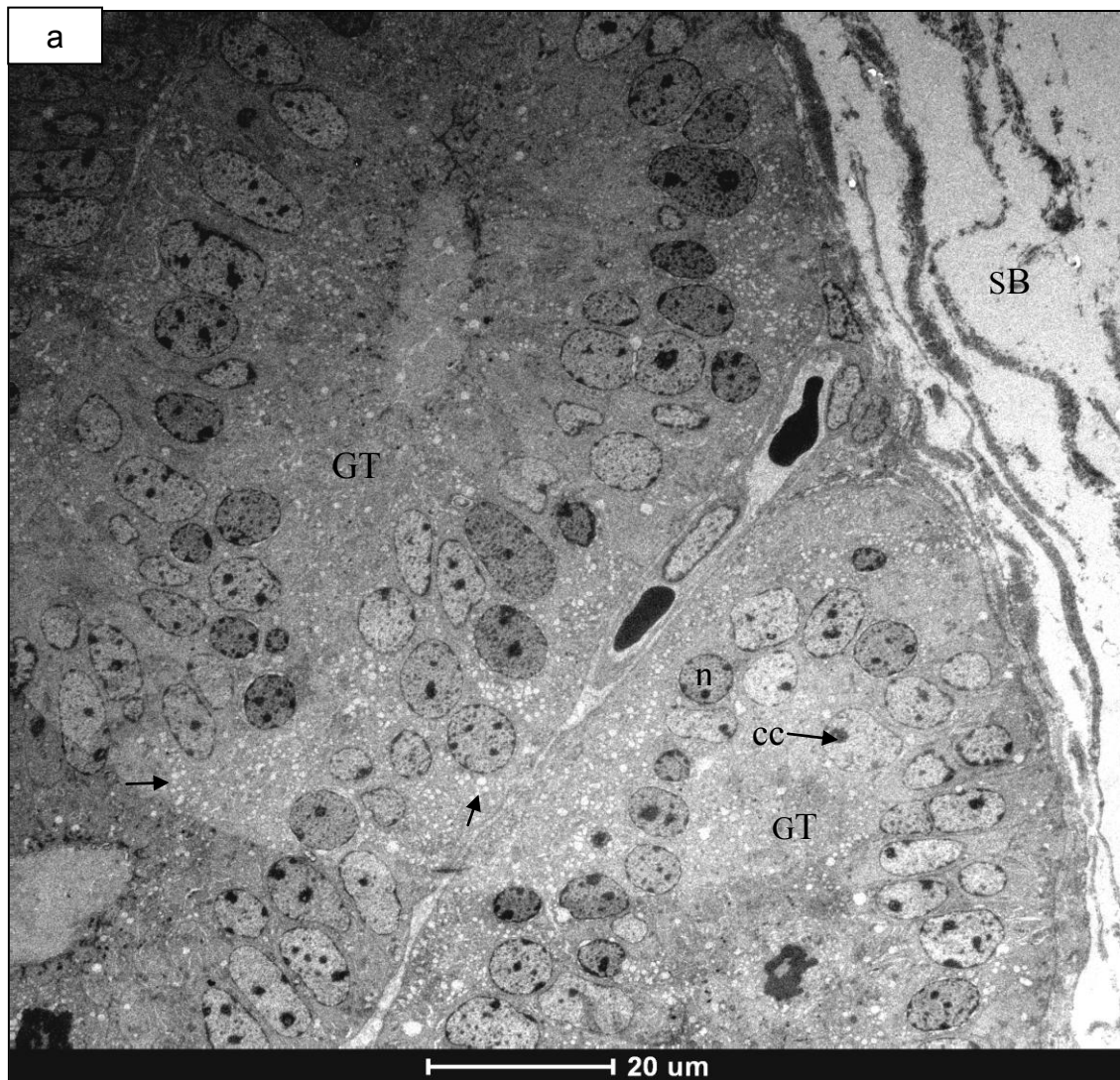


Figura 19: Endométrio uterino contendo glândulas tubulares (GL) com epitélio cilíndrico pseudoestratificado, com dois tipos celulares: célula com núcleo ovalado elétron-denso (n), (foto a), cromatina condensada em alguns pontos evidenciando a membrana nuclear e células com núcleo arredondados, menos elétron-densos que as observadas em tuba uterina, apresentando também cromatina condensada (seta, cc) em alguns pontos que evidenciam a membrana nuclear. Em ambos os tipos se observam abundantes e minúsculos vacúolos elétron-densos (seta) no citoplasma. A submucosa (SB) apresenta tecido conjuntivo frouxo.

Grupo IB (12 dias de gestação)



Figura 20: Região de submucosa (SB) apenas, com tecido conjuntivo frouxo, presença de fibroblastos (FB) e alguns macrófagos (MC).

Grupo IC (21 dias de gestação)

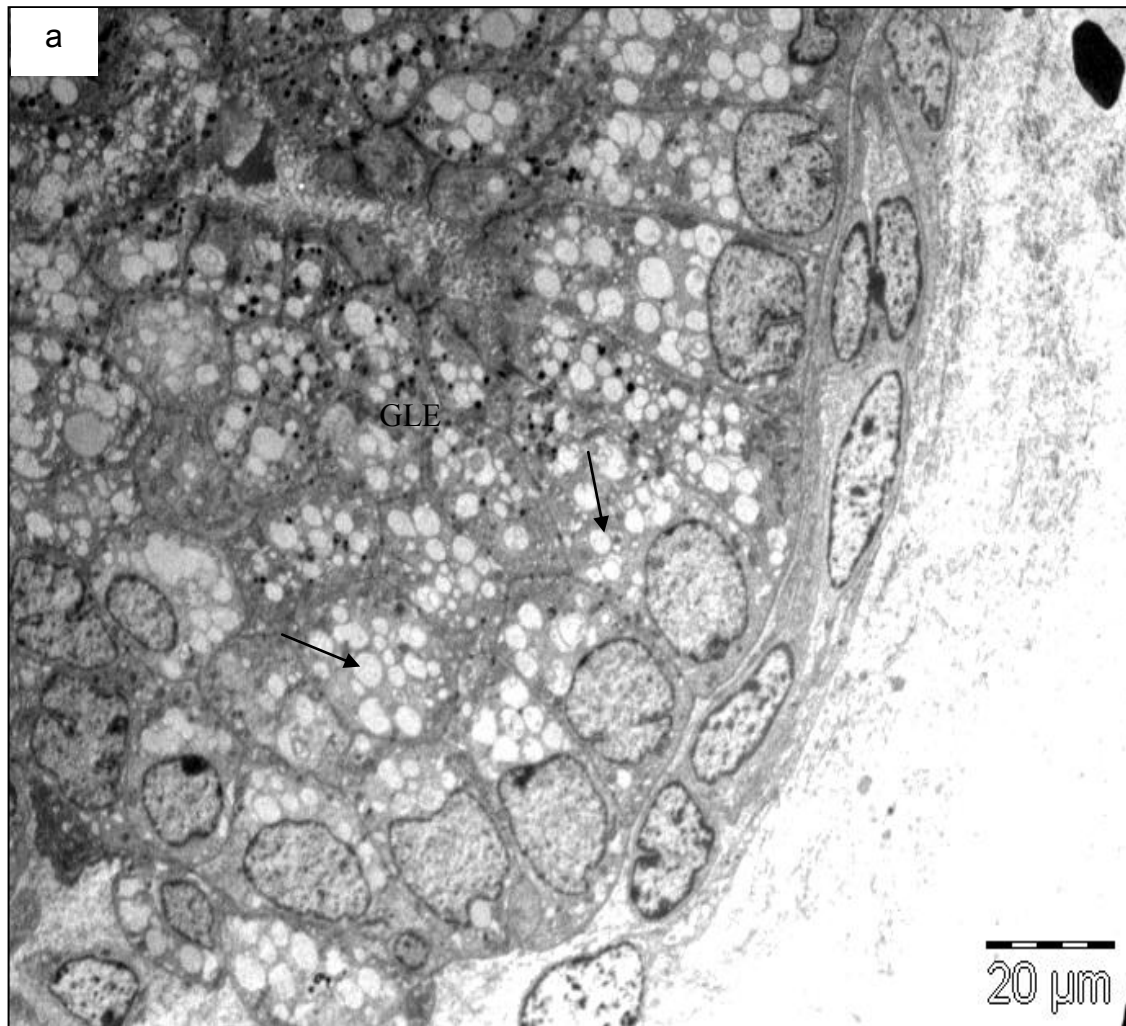


Figura 21a: Glândulas endometriais (GLE) apresentam as células repletas com vacúolos elétron-lúcidos (seta) em seus citoplasmas, provavelmente grânulos contendo secreção (foto a).

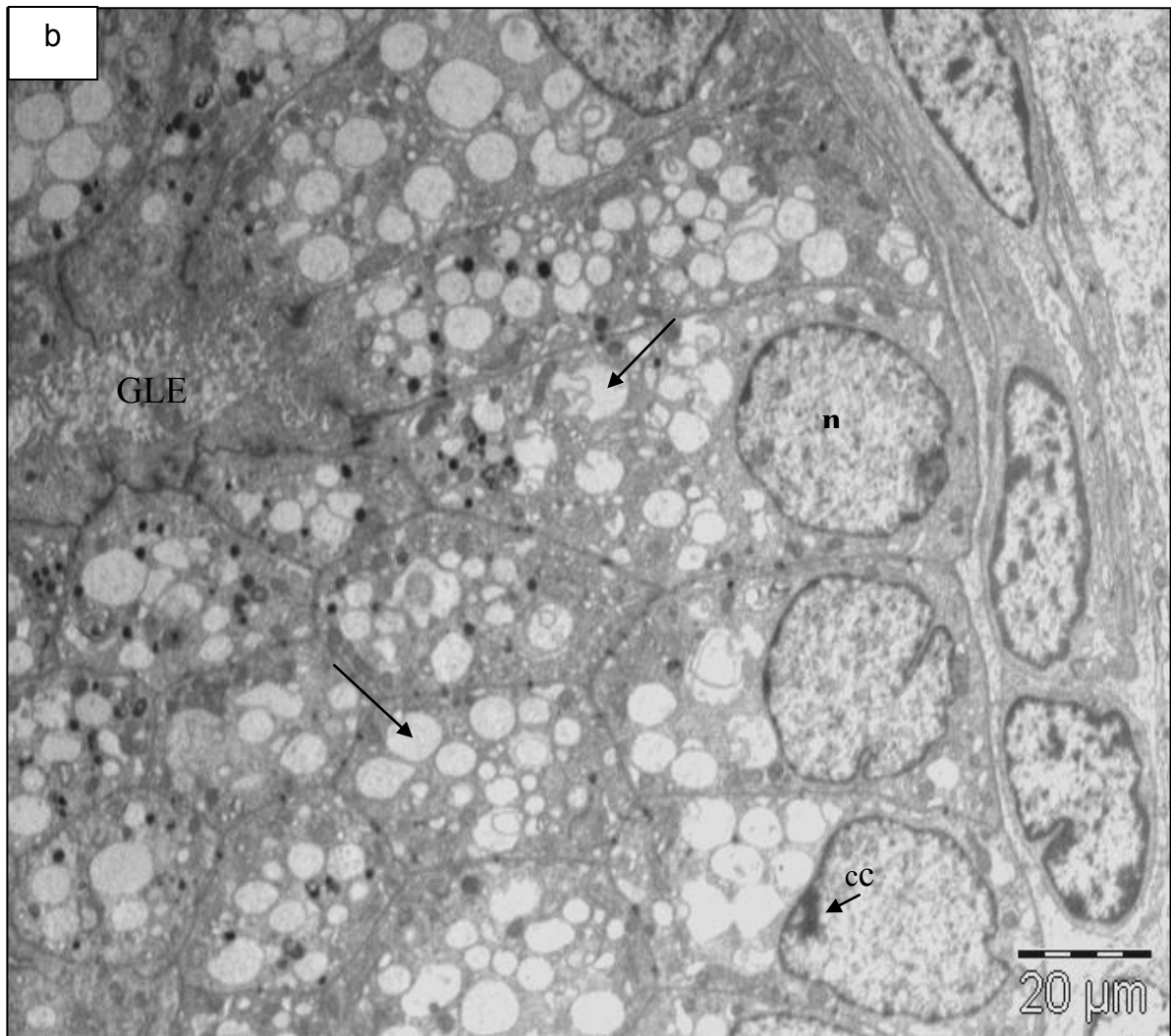


Figura 21b: Glândulas endometriais (GLE) apresentam as células repletas com vacúolos elétronicamente-lúcidos (seta) em seus citoplasmas, provavelmente grânulos contendo secreção (foto a), núcleo (n), cromatina condensada (seta cc).

Grupo II (12 dias de diestro não gestacional)

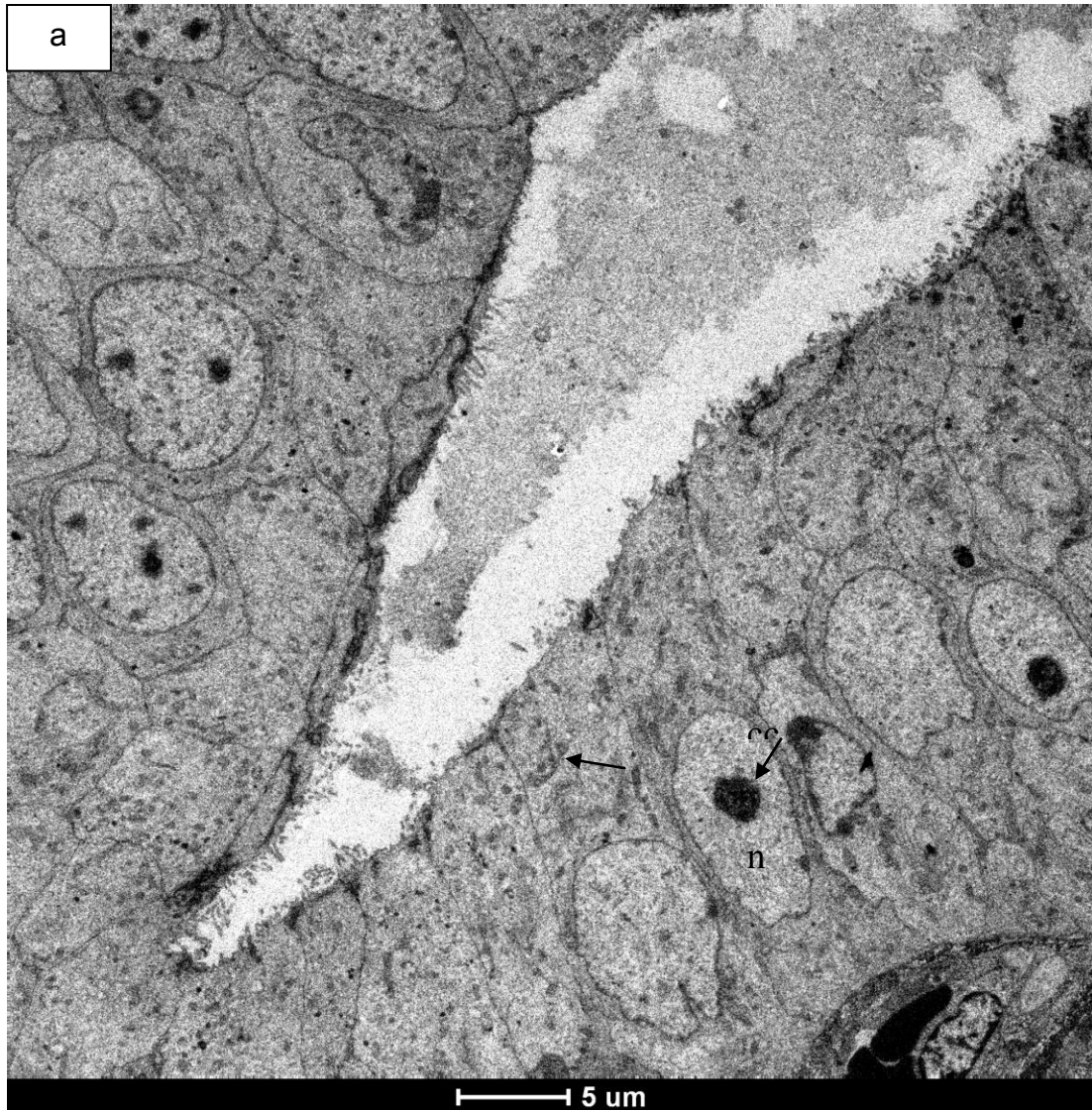


Figura 22a: Endométrio uterino contendo glândulas tubulares com epitélio cilíndrico pseudoestratificado, célula com núcleo ora ovalado elétron-denso (n), cromatina condensada (cc) em alguns pontos evidenciando a membrana nuclear e ora com núcleo arredondados, alguns com nucléolo conspicuo (foto a). Citoplasma elétron-denso (ct) com a presença de mitocôndrias (seta) .

4.1.4.3. Análise ultraestrutural de Mórulas

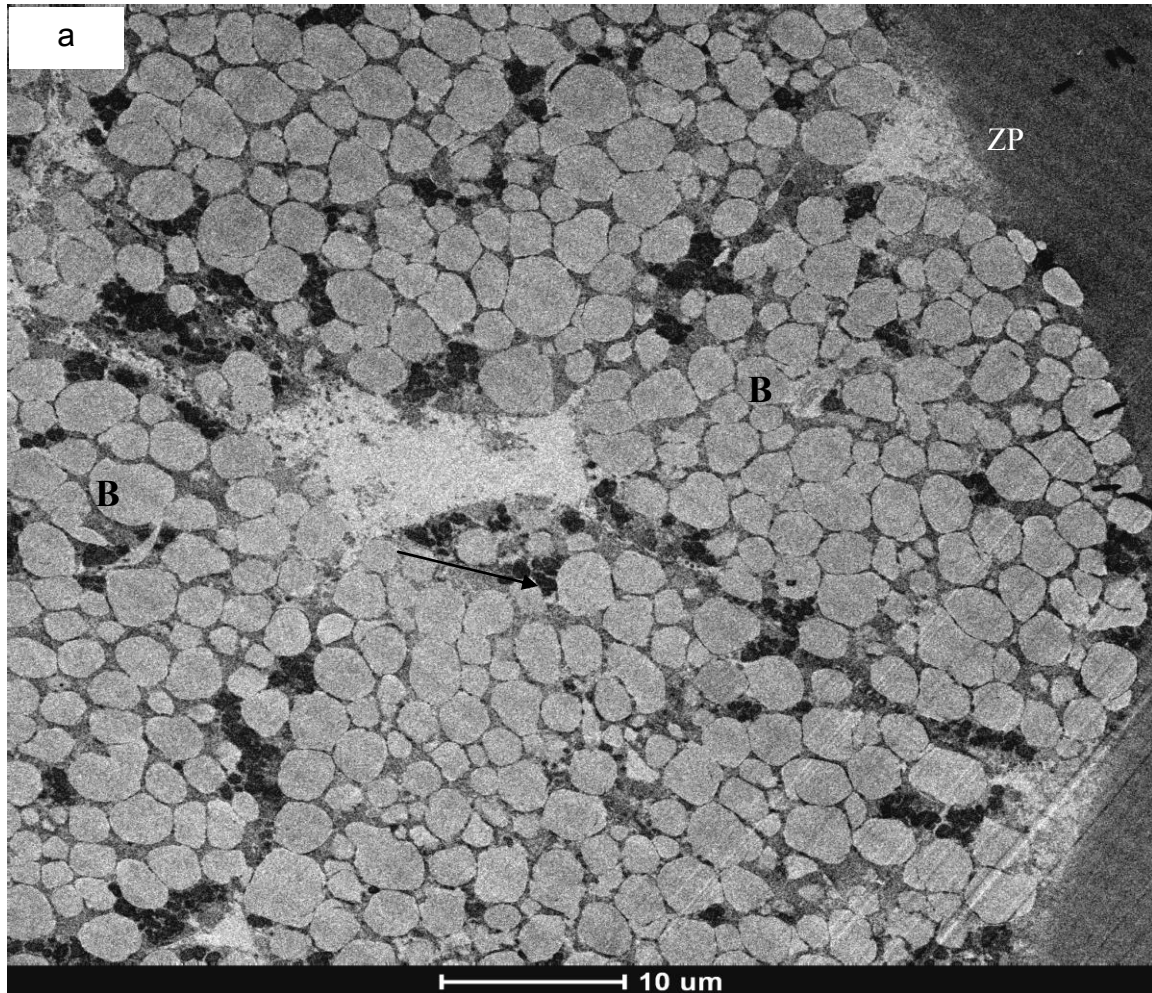


Figura 23 a: A zona pelúcida (ZP) se apresenta com um aspecto integro, homogêneo e com eletron densidade média (foto a). Apresentam os blastômeros (B) repletos de dois tipos de grânulos (seta).

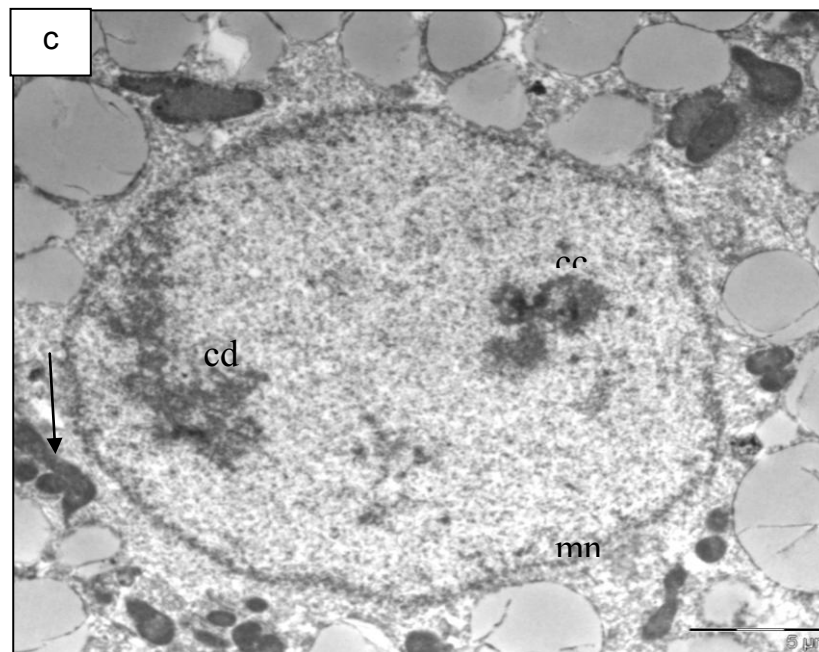
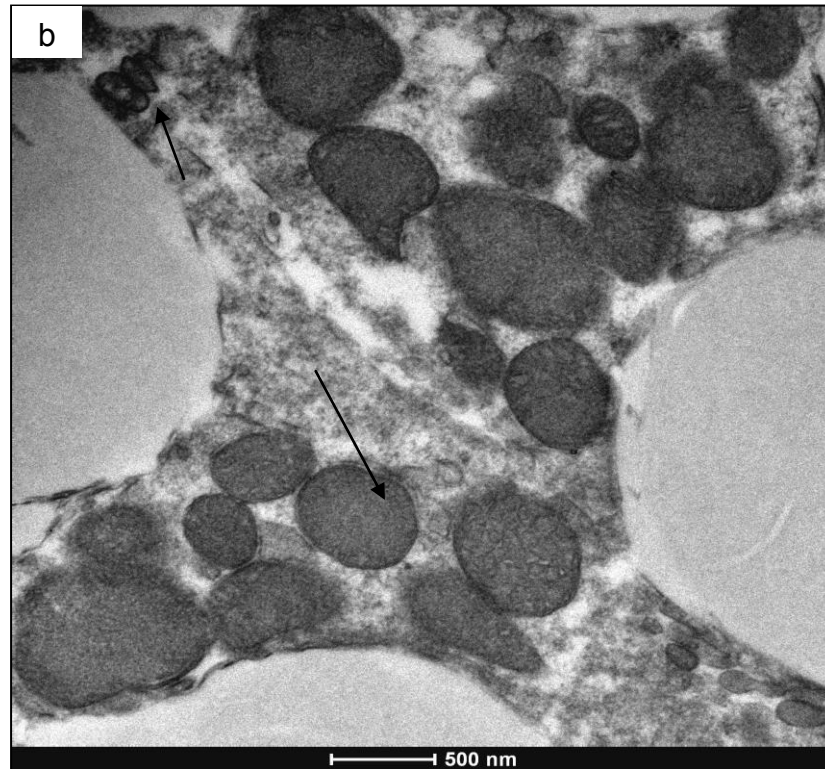


Figura 23 b: Presença de grânulos (seta): um tipo menor muito elétron-denso e um outro maior, menos elétron-denso, provavelmente grânulos de vitelo (foto b). O núcleo de um blastômero apresentando formato arredondado, cromatina dispersa (cd) e em alguns pontos condensada (cc), membrana nuclear (mn) bem evidente (foto c).

4.1.4.3. Análise ultraestrutural de Blastocistos

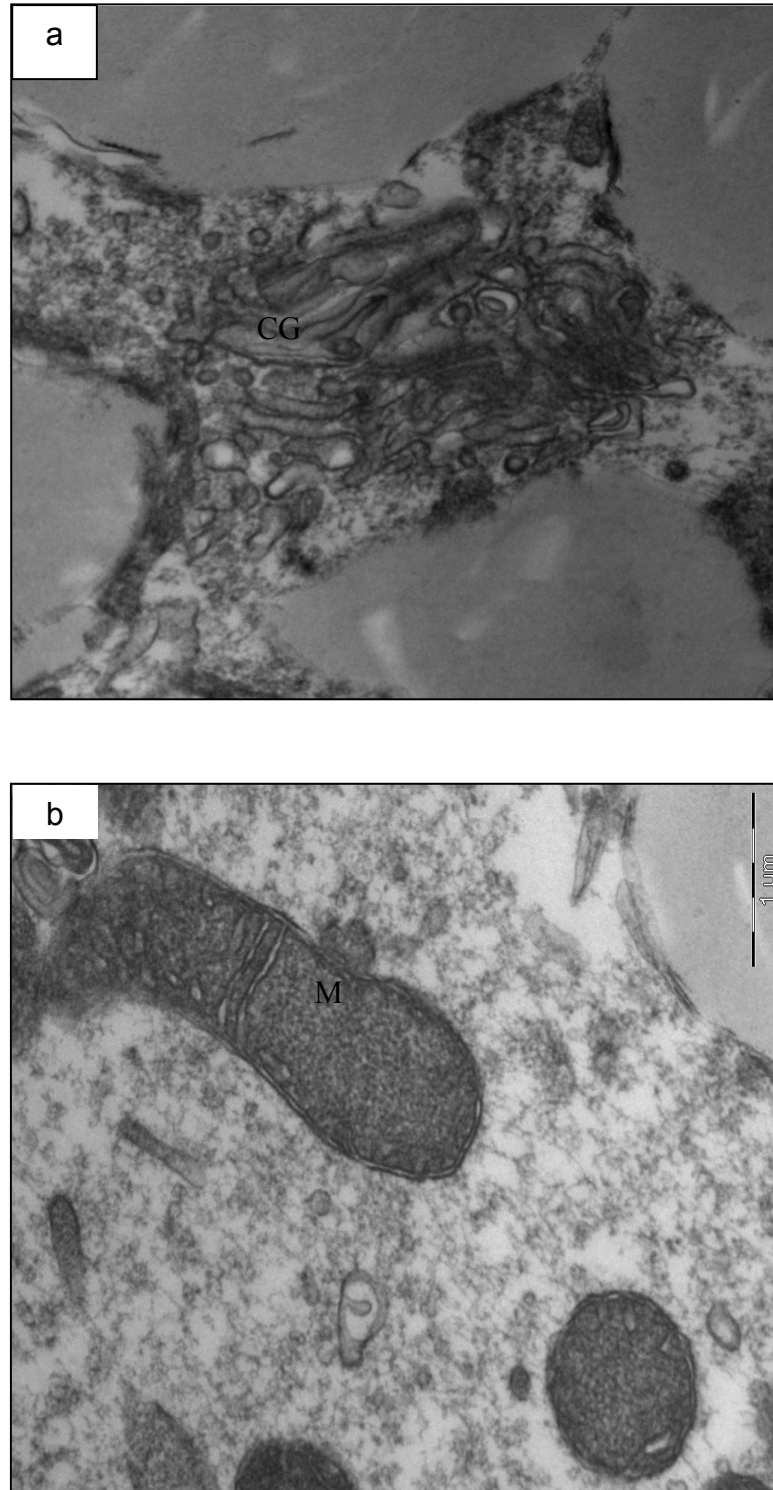


Figura 24: Organelas presentes em blastocistos: complexos de golgi (CG) (foto a) e mitocôndrias (M) (foto b).

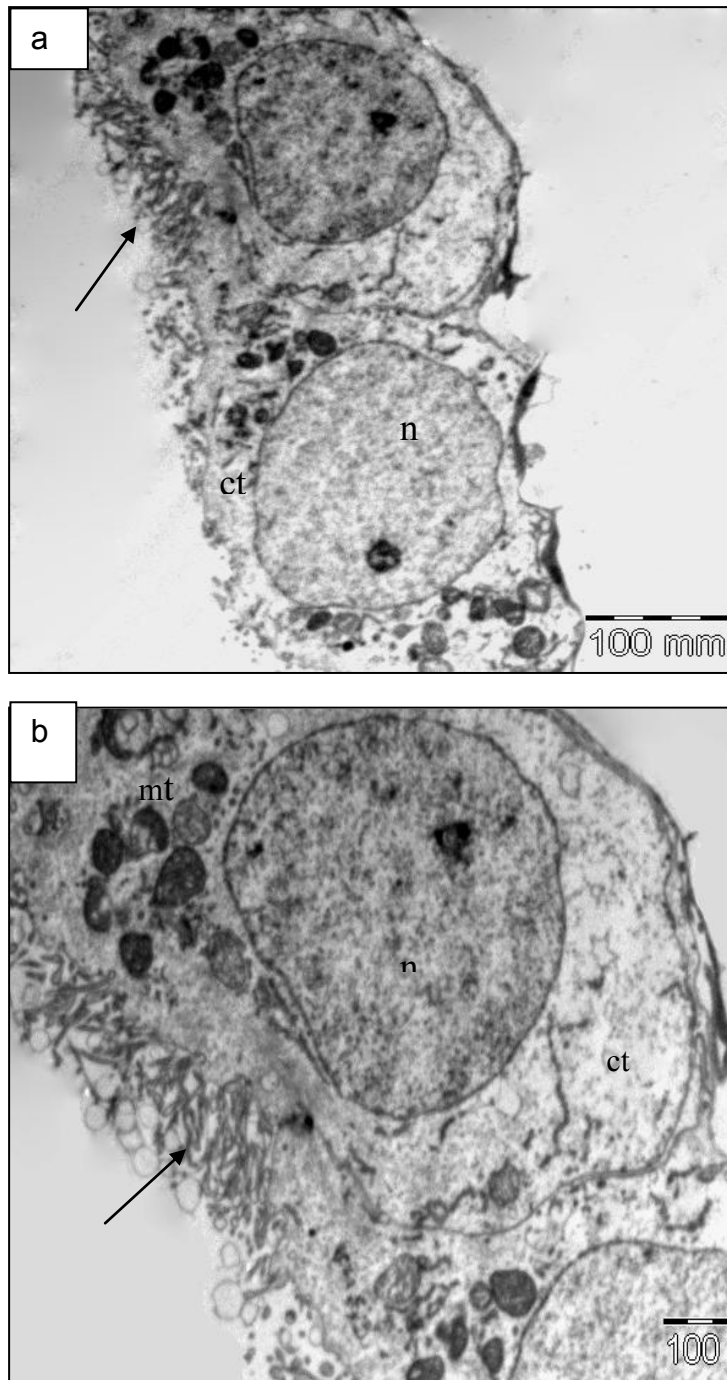


Figura 25: Células trofoblásticas com núcleo arredondado, cromatina difusa e nucléolo evidente. Citoplasma (ct) elétron-lúcido contendo material fibrinoso, mitocôndrias (mt) e grânulos elétron-densos (vitelo). Estas células apresentam duas faces diferentes com relação ao contorno celular (foto a e foto b) uma face com contorno regular, supostamente a face voltada para a blastocèle (ou cavidade blastocística) e outra face contendo microvilosidades (seta) na superfície da membrana, provavelmente a face externa, voltada para a Zona Pelúcida.

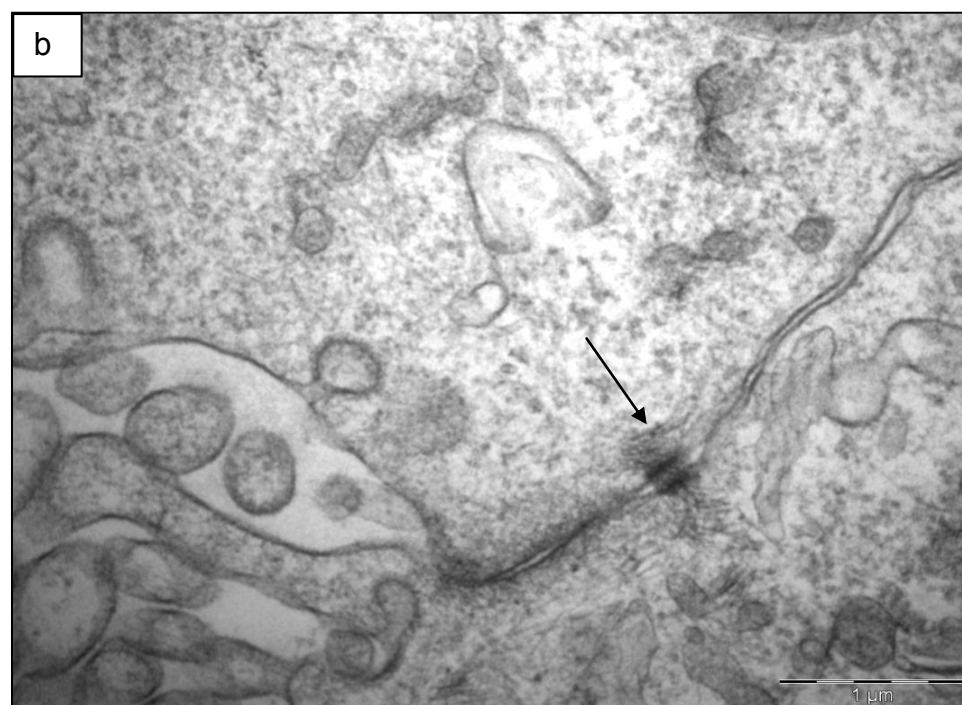
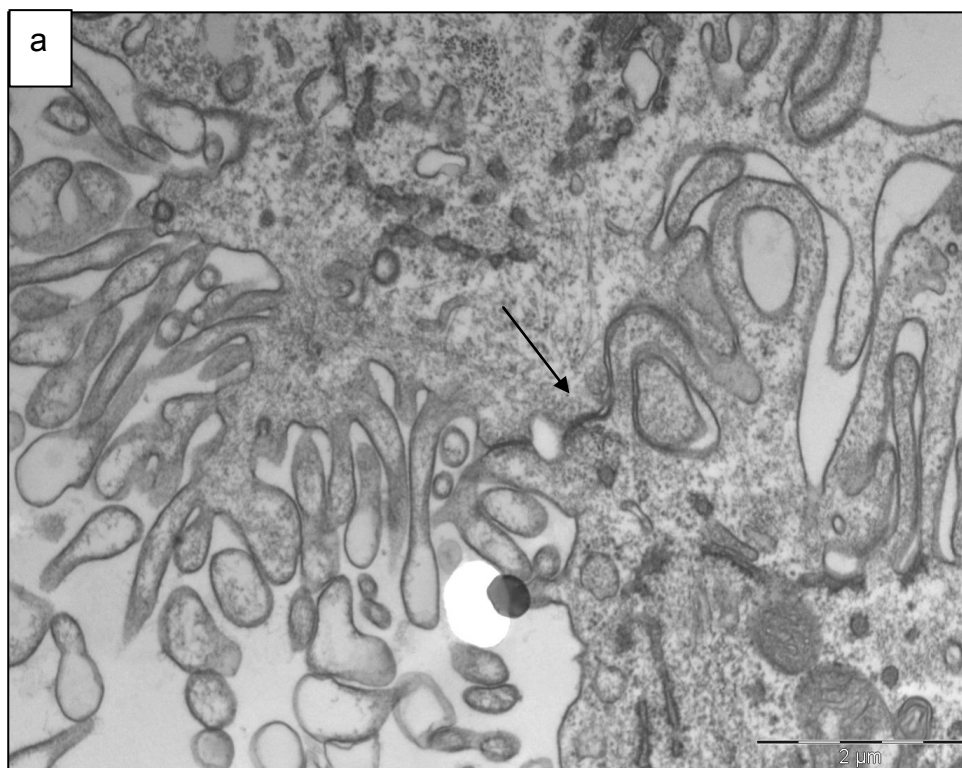


Figura 26: As células estão aderidas umas às outras através de “tight junctions” (seta) (junções adesivas) (foto a e foto b)

Avaliação do perfil protéico de secreção tubárica e uterina durante o período peri-implantação

Tabela 10- Valores da dosagem de proteína total dos pools dos lavados tubáricos e uterinos dos grupos I (GIA, GIB e GIC) e grupo II, anterior ao processo de concentração (pool inicial) e após o processo de concentração (pool final). Botucatu, 2012:

Grupo	Pool inicial (ug/mL)	Pool final (ug/mL)
Lavado tubárico		
GIA	193,60596	697,24566
GIB	150,93954	726,27642
GIC	170,29338	932,1309
GII	218,67798	734,1939
Lavado uterino		
GIA	380,54646	2058,1725
GIB	173,81226	694,6065
GIC	479,51496	2480,4381
GII	412,65624	2234,1165

lavado uterino dos grupos:						lavado tubárico dos grupos:				
B	II	IA	IB	IC	M	II	IA	IB	IC	

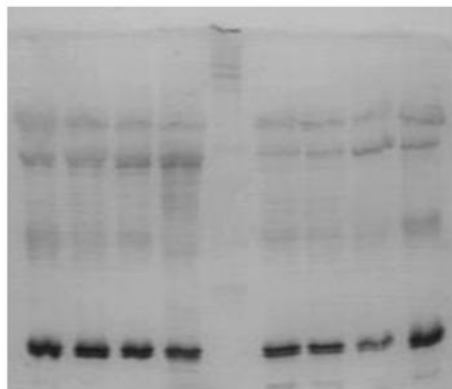


Figura 27: Primeira eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados

lavado tubárico dos grupos:					lavado uterino dos grupos:				
II	IA	M	IB	IC	IC	IB	IA	II	

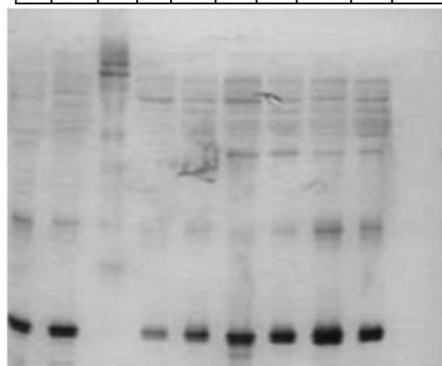


Figura 29: Terceira Eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados

lavado tubárico dos grupos:					lavado uterino dos grupos:				
B	II	IA	M	IB	IC	IC	IB	IA	II

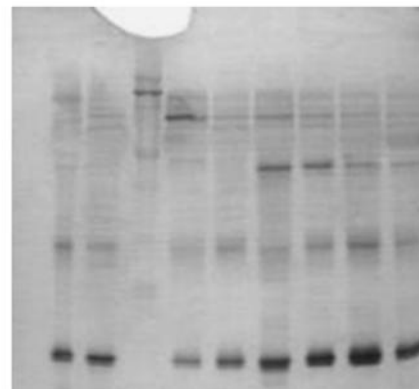


Figura 28: Segunda eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados

lavado tubárico dos grupos:					lavado uterino dos grupos:				
B	M	II	IA	IB	IC	II	IA	IB	IC

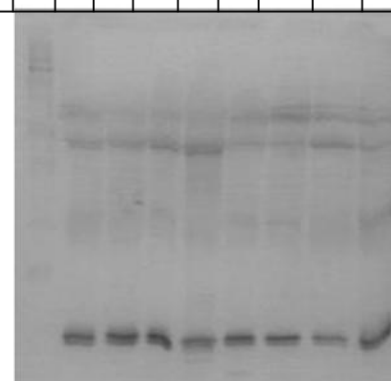


Figura 30: Quarta eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados

lavado tubárico dos grupos:					lavado uterino dos grupos:				
B	ii	M	IA	IB	IC	II	IA	IB	IC

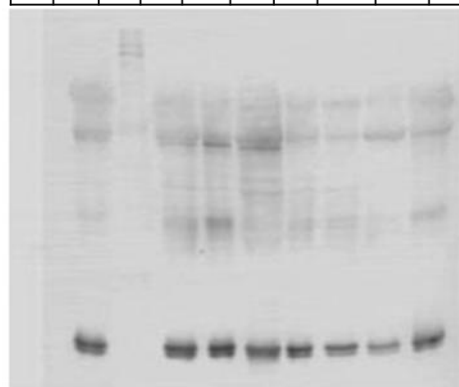


Figura 31: Quinta eletroforese unidimensional das proteínas presentes no lavado lavado uterino e tubárico do grupos analisados

Tabela 11- Média e desvio padrão do massa molar (MM) das proteínas encontradas no lavado do útero dos grupos I (subgrupos A,B e C) e grupo II. Botucatu, 2012.

MM (KDaa)	Proteína	Grupo II (controle)	Grupo IA (8 dias de gestação)	Grupo IB (12 dias de gestação)	Grupo IC (21 dias de gestação)
150	U1	150 ± 0	162,5 ± 0	143,14 ± 0	167,85 ± 10,10
130	U2	115,71 ± 5,99	136,29 ± 0	136,29 ± 0	-
91	U3	95,5 ± 0	87,99 ± 8,06	92,87 ± 2,38	95,5 ± 0
76	U4	79,82 ± 5,99	77,73 ± 2,63	75,14 ± 1,21	79,48 ± 0,33
72	U5	-	-	-	73,60 ± 0
64	U6	62 ± 2,12	64 ± 0	64 ± 0	64,75 ± 10,61
52	U7	51,29 ± 1,79	53,33 ± 0	53,33 ± 0	51,29 ± 1,79
46	U8	46,48 ± 1,61	47,99 ± 2,11	47,47 ± 2,18	46,81 ± 1,86
38	U9	-	-	-	37,58 ± 0
31	U10	-	-	-	31,58 ± 0
24	U11	24,49 ± 1,79	22,83 ± 0,9	25,21 ± 1,73	24,825 ± 1,61
17	U12	16,21 ± 0	16,21 + 0	-	-
14	U13	-	-	-	15,16 ± 0
12	U14	11,87 ± 0,18	11,78 ± 0,06	11,78 ± 0,06	11,87 ± 0,186

Tabela 12- Média e desvio padrão da massa molar das proteínas encontradas no lavado de tuba dos grupos I (subgrupos A,B e C) e grupo II. Botucatu, 2012.

MM (KDAa)	Proteína	Grupo II (controle)	Grupo IA (8 dias de gestação)	Grupo IB (12 dias de gestação)	Grupo IC (21 dias de gestação)
150	T1	-	-	175 ± 0	152,82 ± 13,69
130	T2	122,57 ± 0	-	-	-
91	T3	95,5 ± 0	92,25 ± 4,60	89 ± 9,19	93,87 ± 2,30
76	T4	81,34 ± 2,95	76,65 ± 3,30	-	-
72	T5	69,40 ± 2,55	72,40 ± 0	72,87 ± 0,66	70 ± 0
64	T6	62,50 ± 2,12	64 ± 0	64 ± 0	63,80 ± 2,70
52	T7	-	56,5 ± 0	-	-
46	T8	50,99 ± 1,57	53,33 ± 0	51,93 ± 1,98	51,93 ± 1,98
38	T9	46,07 ± 0,848	48,60 ± 2,73	47,47 ± 1,13	46,67 ± 0
24	T10	32,80 ± 1,51	31,64 ± 1,38	-	-
17	T11	24,58 ± 1,93	24,58 ± 1,93	24,40 ± 1,10	25,71 ± 1,60

Tabela 13- Média e desvio padrão do índice de densidade óptica (IOD) das proteínas encontradas no lavado do útero dos grupos I (subgrupos A,B e C) e grupo II. Botucatu, 2012.

Proteína	Grupo II	Grupo IA	Grupo IB	Grupo IC	p
U1	38,945 ± 0	33,840 ± 0	143,140 ± 0	32,111 ± 20,76	0,2731
U2	18,178 ± 0	13,445 ± 0	13,2290 ± 0	-	-
U3	83,335 ± 0	41.424 ± 10,72	61,792 ± 42, 03	30,721 ± 27, 15	0,3556
U4	46,505 ± 31,270	27,045 ± 19,627	46,683 ± 4,761	4,976 ± 9,006	0,0876'
U6	93,155 ± 6,30	39,045 ± 0	86,371 ± 0	55,161 ± 15,14	0,1221
U7	58,872 ± 6,070	50,570 ± 0	79,403 ± 0	71,658 ± 48,784	0,2856
U8	54,324 ± 10,712	43,315 ± 34,213	46,876 ± 34,522	33,413 ± 33,220	0,0877'
U11	43,876 ± 19,157 ^a	21,139 ± 12,669 ^b	42,087 ± 28,814 ^a	42,121 ± 28,814 ^a	0,0392
U12	0,17738 ± 0	0,04416 ± 0	-	-	-
U14	17,836 ± 2,149	29,507 ± 5,673	17,162 ± 5,402	50,733 ± 43,435	0,3466

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística, p <0,05

Tabela 14- Média e desvio padrão do índice de densidade óptica (IOD) das proteínas encontradas no lavado da tuba dos grupos I (subgrupos A,B e C) e grupo II. Botucatu, 2012.

Proteína	Grupo II	Grupo IA	Grupo IB	Grupo IC	p
T1	-	-	23,701 ± 0	20,310 ± 4,07	-
T3	28,590 ± 1,055	52,535 ± 11,960	37,598 ± 17,942	46,478 ± 4,867	0,2888
T4	20,595 ± 2,165	35,178 ± 9,470	-	44,257 ± 34,28	0,5045
T5	32,173 ± 5,27	17,031 ± 0	24,662 ± 1,434	41,579 ± 0	0,0735
T6	53,529 ± 26,98	15,096 ± 4,488	69,050 ± 0	48,557 ± 8,562	0,2180
T8	42,869 ± 37,635	64,207 ± 22, 331	30,891 ± 27,840	42,484 ± 0	0,3537
T9	-	-	-	-	-
T10	40,449 ± 23,043 ^a	39,435 ± 24,978 ^a	40,054 ± 19,105 ^a	63,053 ± 34,66 ^b	0,0008
T11	-	-	-	-	-

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística, p <0,05

5. DISCUSSÃO

A. Dosagem de P₄ sérica:

Os valores observados na dosagem da P₄ sérica tanto do grupo experimental, como no grupo controle, comprovam a não variação deste hormônio entre as fêmeas gestantes e não gestantes (gráfico 1), conforme já observado por outros autores (BURKE., 1991, JOHNSTON et al., 2001; VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008; CONCANNON et al., 2009)

A concentração plasmática de P₄ é similar tanto em cadelas gestantes quanto nas não gestantes, porém é pouco elucidado o reflexo dessa concentração, tanto na função luteal, como no próprio metabolismo hormonal. O curto período de elevação da P₄ plasmática e o declínio abrupto são considerados fisiológicos, desde que a concentração de P₄ aumente no final do proestro, apresente um pico em torno do 20° ao 30° dias após o surgimento da onda pré-ovulatória de LH e declíneo, atingindo níveis basais em torno dos 60 a 70 dias (CONCANNON et al., 2009).

Verstegen-Onclin e Verstegen (2008) descrevem que a quantificação de metabólicos da P₄ medida através de análise fecal é significativamente maior em animais gestantes, porém a metabolização periférica deste hormônio na região placentária, faz com que os níveis séricos permaneçam similares.

Concannon et al. (2009), afirmam que a produção de P₄ durante a gestação é maior do que no ciclo não gestante, embora essa diferença não seja observada nas concentrações de P₄ periférica, devido a um aumento do metabolismo da P₄ e da diluição, pelo aumento do volume e da distribuição plasmática o que poderia reduzir cerca de 25% ou mais da concentração de P₄ circulante. Além disto, observaram que o *clearance* hepato biliar da P₄ é duas vezes mais alto em cadelas gestantes do que cadelas não gestantes.

Neste estudo observamos que as concentrações de P₄ observadas no acompanhamento do ciclo estral das cadelas tanto do grupo controle quanto experimental aumentaram ao longo do diestro. As fêmeas apresentaram valores entre 0,09 a 1,9 pg/mL durante o proestro citológico.

As concentrações de P_4 obtidas durante o estro citológico (0,5 a 5,48 ng/ml) e no primeiro dia de diestro citológico (21,25 a 61,62 ng/mL) foram consideradas compatíveis com os achados descritos na literatura consultada (CONCANNON et al., 1989; FELDMAN & NELSON, 1996; JOHNSTON et al., 2001) para os mesmos períodos.

De acordo com Burke (1991), a P_4 apresenta concentração basal na ordem de 1ng/ml, precedente ao pico pré- ovulatório de LH. Este valor praticamente triplica no primeiro dia após a ovulação, elevando-se para cerca de 10 ng/ml durante o estro e permanecendo em torno de 22 ng/ml durante o diestro, retornando para os valores basais em 61-65 dias na fêmea prenhe e 51-82 dias naquelas não prênhes.

Nas fêmeas analisadas, a número 09 apresentou queda no valor de P_4 ainda na fase de proestro e a cadela 01 apresentou citologia vaginal irregular, ocorrendo pouca correspondência com a dosagem de P_4 sérica. Acreditamos que este fato ocorreu por ser o primeiro estro destas cadelas.

A P_4 é absolutamente imprescindível para a manutenção da gestação nas cadelas, podendo causar morte embrionária precoce mesmo que o processo de implantação tenha sido adequado (GUNZEL-APEL, 2008). Níveis abaixo de 2 ng/mL geram uma insuficiência luteal, que segundo Tibold e Thuróczy (2008) podem ocasionar reabsorção ou morte fetal, principalmente durante a segunda metade da gestação.

A P_4 garante a diferenciação endometrial e secreção das glândulas endometriais, necessárias ao processo de gestação e adesão placentária. A supressão da contratilidade uterina também é auxiliada pela P_4 , devido a sua ação preventiva da atividade uterogênica do estrógeno (VERSTEGEN-ONCLIN e VERSTEGEN, 2008).

De acordo com Christiansen (1984) existem variações a respeito do conteúdo hormonal em cadelas como, por exemplo, diferenças nas amostras investigadas (soro ou plasma) e nos métodos bioquímicos empregados (RIA ou ELISA). Steinetz et al. (1990) também observaram que os valores progesterônicos encontrados na gestação são mais elevados pela manhã do que os observados à tarde.

B. Recuperação de estruturas embrionárias:

O índice de recuperação embrionário (Tabela 5) foi de 94,38%, portanto semelhantes aos obtidos por Tsutsui et al. (2001) e Pereira et al. (2007). Em nosso estudo, as cirurgias foram realizadas em média entre o 8º e o 24º dia após a primeira inseminação e foram recuperados 84 embriões, sendo 47 blastocistos (55,95 %) em diferentes estádios de desenvolvimento e 37 mórulas (44,04%). Reynaud et al. (2005) demonstraram uma taxa de recuperação de mórulas de 72,4% em tuba uterina (6 dias após a cobertura) e Bysted et al. (2001) observaram uma taxa de 99% de recuperação de mórulas em lavados tubáricos, 3 a 7 dias após o acasalamento. Esses autores realizaram lavagens mais cedo em relação às datas de cobertura quando comparado com o nosso procedimento.

A taxa de recuperação de 60% no grupo IC, pode ser um indicativo da ocorrência de reabsorção embrionária, ou de taxas de ovulações maiores do que as taxas de fecundação, o que segundo Cunha et al. (2005) pode ocorrer. Após a ovulação alguns oócitos podem não ser captados pelas tubas uterinas, o que também explicaria a baixa taxa de recuperação de oócitos (Tabela 6) no grupo controle (50%).

Na coleta das estruturas do grupo IA houve dificuldade, sendo realizada de maneira diferente do que fora estabelecido inicialmente. A coleta seria realizada 8 a 9 dias após a provável data de fertilização, no entanto, trata-se de um período em que as mórulas podem ficar acumuladas no segmento distal da tuba, o que dificultou muito a coleta dessas estruturas (BYSTED et al., 2001; REYNAUD et al., 2005).

Inicialmente, seccionávamos a tuba na região útero- tubárica para a realização da lavagem, na intenção da recuperação de mórulas, no entanto obtivemos insucesso em várias tentativas. Optamos então por preservar uma porção logo abaixo da junção útero tubárica nas 2 fêmeas restante deste grupo (fêmea 38 e 39) e após a lavagem observamos a presença de mórulas que provavelmente estavam acumuladas nesse local, tanto que nossa recuperação nestas duas fêmeas foi bastante satisfatória.

A sinuosidade da tuba uterina associada à presença abundante de tecido gorduroso ao redor, são fatores que dificultam a dissecação adequada da estrutura tubárica. Acreditamos que a anatomia das tubas é um fator que prejudique a coleta das

mórulas e sugerimos que para a lavagem das tubas há de se ter um cuidado extremo com a preservação anatômica do órgão, dissecar somente a parte inicial do infundíbulo e preservar a porção inicial dos cornos; esses cuidados contribuem para uma maior taxa de recuperação de mórulas.

C. Avaliação da expressão gênica embrionária

A avaliação da expressão gênica dos genes alvos em embriões (Tabela 9), demonstrou que apenas o gene OTR está presente tanto em mórulas quanto em blastocistos. Os genes ER- α , PR, LIF-R estão presentes somente em blastocistos e os genes ER- β , OPN e LIF não foram expressos nas fases embrionárias analisadas.

A ausência da expressão de mRNA ER- β em embriões caninos e a detecção de mRNA ER- α , somente em blastocistos podem sugerir que há diferença na função biológica e ação do estrógeno nas fases embrionárias analisadas. Estes resultados se mostraram semelhantes aos observado por Hou et al. (1993) em ratos, onde também não se detectou receptores estrogênicos em mórulas, mas somente em blastocistos.

Hou et al. (1993) definiram que a presença dos receptores estrogênicos ocorrem em oócitos e zigotos, declinam na fase de 2 células, atingem níveis mais baixos na fase de 8 células, não são detectados na fase de mórula e reaparecem na fase de blastocisto. Baseado nos fatos de que existe a expressão tanto de mRNA ER- β e mRNA ER- λ em oócitos caninos (GONÇALVES et al., 2007) e em nos nossos resultados obtidos com mórulas e blastocistos em relação a estes receptores, acreditamos que a expressão destes genes no embrião canino se comporte da mesma maneira que no embrião de rato.

A ausência de detecção de mRNA ER- β em mórulas e blastocistos caninos não exclui a importância deste receptor após a implantação, já que o mesmo foi detectado em vesículas embrionárias em nosso estudo e também em células trofoblásticas em roedores (LEMMEN, 1999).

Smith et al. (1971) descreveram a importância do estrógeno em relação a implantação, já que embriões produzidos *in vitro* e tratados com estrógeno apresentaram taxas de implantação significativamente maiores quando transferidos.

Hou et al. (1993) afirmaram que o estrogênio também afeta a captação e incorporação de precursores de ácidos nucleicos e aminoácidos em blastocistos de rato, afetando diretamente o desenvolvimento embrionário.

Desta forma acredita-se que realmente o estrógeno atue diretamente através de seus receptores no desenvolvimento do embrião canino, no entanto, provavelmente o ER- α , participa mais cedo no desenvolvimento do embrião e talvez esteja mais envolvido na sinalização da implantação e na estimulação do desenvolvimento embrionário, do que o ER- β que foi detectado mais tardiamente, quando o embrião já se apresentava efetivamente implantado.

A presença da expressão de mRNA PR somente em blastocistos caninos, corrobora com os achados obtidos por Ying et al. (2000) em suínos e acredita-se que os efeitos da P_4 sobre a embriogênese parecem ser indiretos, talvez através da regulação destes receptores por fatores de crescimento produzidos pelo trato reprodutivo materno.

Em camundongos, segundo Hou e Gorski (1993) o gene PR ainda não está ativado até o estágio de blastocisto no período peri-implantação. Tem-se pouca evidência dos efeitos diretos da P_4 no desenvolvimento embrionário durante a fase pré-implantação (Ying et al., 2000).

Em ratos, o desenvolvimento de embrião antes do estágio de 2 células depende em grande parte da proteína e do RNA sintetizado durante a ovogênese. O genoma embrionário é relativamente inativo até algum tempo após a primeira clivagem (HOU e GROUSKI, 1993). O momento da AGE é variável de acordo com a espécie e normalmente ocorre por volta do estágio de 2 células em camundongo, 4 células em humanos e suínos, 8 células em bovinos, suínos e cães, e no estágio de 16 células em coelhos (TELFORD et al., 1990; SCHULTZ, 1993; DE SOUZA et al., 1998, REYNAUD et al., 2005).

A diminuição da detecção de mRNAs de receptores ao longo do desenvolvimento embrionário também pode ocorrer devido à ativação do genoma embrionário, momento onde há uma transição progressiva do controle materno para o embrionário, fornecendo ao embrião uma oportunidade de restringir o programa

genético materno codificado e estabelecer o programa de expressão gênica embrionária (SCHULTZ, 2005).

A progesterona é também considerada necessária a implantação em ratos e estudos atuais tem demonstrando que a ação hormonal sobre os embriões podem ser tão essencial quanto ao preparo uterino para que a implantação seja bem sucedida (HOU e GROUSKI, 1993).

Nossos resultados em relação à expressão de mRNA OTR foram semelhantes aos obtidos por Beretsos et al. (2006). Este foi o único receptor presente em ambas as fases embrionárias estudadas, sendo que em mórula estava presente em quantidade significativamente superior à de blastocistos. Assim como observado em ratos, a expressão de mRNA OTR nas cadelas, passa a diminuir gradativamente com o desenvolvimento embrionário e sua presença no blastocisto estaria associado ao controle de receptividade do endométrio e prevenção da luteólise.

A não detecção de mRNA OPN em mórulas e blastocistos caninos é semelhante aos resultados encontrados em suínos, ovinos e coelhos (JONHSON et al., 2003). Apesar de não ser evidenciada a expressão de mRNA OPN em blastocisto, a importância deste componente na sinalização da implantação embrionária não pode ser excluída (APPARAO, 2003)

A ação deste componente da matriz extracelular parece estar mais relacionada a momentos próximos a implantação e ao longo da gestação, já que em nossos estudos, pode ser observada a presença de mRNA OPN em vesículas embrionárias. A sua ação provavelmente está associada a integrinas placentárias e embora a OPN não seja sintetizada pelo trofoblasto ela possui importante papel na determinação da morfologia placentária e na adesão do embrião ao útero materno durante a implantação e placentação (JONHSON et al., 2003).

Não houve detecção de mRNA LIF durante as fases embrionárias analisadas. Estes resultados são diferentes dos obtidos por Schafer-Somi et al., (2008) que detectaram mRNA para LIF em embriões caninos de 10 e 12 dias. Essa diferença de resultados pode estar associada a baixa quantidade de RNA extraído das estruturas embrionárias, em nosso estudo, no entanto, posteriormente detectamos a presença de mRNA LIF-R em blastocistos e alta incidência de mRNA LIF em tecido materno. Desta

forma podemos concluir que a ação de LIF na cadela talvez ocorra mediante estímulo materno, de forma parácrina, assim como em coelhos (LEI et al., 2004).

Em cultivo de células embrionárias a LIF é produzida pela monocamada de sustentação (fibroblastos) e age sobre as células da massa celular interna. Este componente mantém as células indiferenciadas condizente com nossos resultados, já que os receptores de LIF estavam presentes somente nos blastocistos.

Os mRNAs LIF e LIFR também foram detectados em embriões pré-implantação de ratos (NICHOLS et al., 1996), bovinos (ECKERT e NIEMANN 1998) e humanos (CHEN et al., 1999). Na espécie humana, a secreção de LIF e a presença de LIFR em trofoblasto é importante para o crescimento e diferenciação do trofoblasto e para uma mudança na predominância de linfócitos T *helper* (KOJIMA et al., 1995; PICCINNI et al., 1998), que é importante para a sobrevivência dos embriões (KWAK-KIM et al., 2005).

Hou e Grousni (1993) relataram que genes específicos são expressos na transição de mórula para blastocisto, sendo que também há alterações na síntese e na secreção de proteínas específicas a partir do início de blastocistos tardios.

D. Avaliação da expressão gênica nos tecidos maternos (tuba uterina e útero):

Após a normalização dos dados e escolha do gene de referência adotado (GADPH) foi possível a comparação das concentrações de mRNA nas diferentes amostras. Em nosso estudo todos os genes candidatos propostos foram expressos tanto em tecido materno como em tecido tubárico (Tabela 7 e 8).

Análise dos receptores de estrógeno α (ER- α) e β (ER- β) em útero e tuba uterina:

Em útero, no final de gestação, a expressão de mRNA ER- α foi significativamente superior aos demais grupos analisados (grupo ID > grupo IA, IB, IC, vesículas e grupo II), os quais não diferiram entre si. No tecido tubárico observou-se resultado semelhante ao obtido no tecido uterino, sendo os maiores níveis de

expressão encontrados no final da gestação (grupo ID), conforme pode ser observado no gráfico 2 e 3.

Nossos resultados diferem do observado em tecido ovariano (HATOYA et al, 2003). Em ovário, os níveis de mRNA ER- α aumentaram da fase de proestro para a fase de diestro, correlacionando-se positivamente com os níveis de P₄. Em nosso caso, a expressão de mRNA ER- α no útero, foi significativamente superior nas fases em que o nível de P₄ apresentava-se em declínio e os níveis de estrógenos próximos ao basal.

De acordo com Gonçalves et al. (2007) a ação anti-estrogênica da P₄ (DONNAY et al., 1995; VERMEIRSCH et al., 1999, 2000), leva a redução da concentração de mRNA ER- α , tornando assim o endométrio resistente ao estrógeno durante a implantação (LESSEY et al., 2006). De acordo com este mesmo autor, provavelmente a diminuição da expressão de mRNA ER- α em resposta a P₄ esta associada a um intervalo no ciclo, no qual a implantação ocorre. Este declínio de mRNA ER- α pode ser um evento critico, necessário para inibir genes específicos sinalizando o início da receptividade do endométrio (LESSEY et al., 2006).

Ao analisar o labirinto placentário de cadelas, Vermeirsch et al. (2000) observaram ausência de ER- α e PR neste órgão, mas observaram sua presença em células mesenquimais localizadas ao redor da membrana basal, próximas aos vasos sanguíneos maternos, o que pode indicar ações indiretas dos receptores hormonais no tecido uterino.

A expressão de mRNA ER- β em tecido uterino foi significativamente superior na fase do diestro gestacional inicial (grupo IB) e ciclico (grupo II), praticamente não variou ao longo da gestação (grupo IA e IC), diminuindo no local da implantação (vesículas) e parto (grupo ID). Em tecido tubárico, houve expressão de mRNA ER- β significativamente superior em início de diestro cíclico (grupo II) em comparação ao gestacional (Grupo IA). Não houve variação ao longo da gestação (grupo IB e IC) e no local da implantação (vesícula), diminuindo apenas no momento do parto (grupo ID).

Hatoya et al. (2003) observaram que os níveis de mRNA ER- β aumentaram na fase de anestro e proestro e posteriormente declinaram, em hipotálamo e pituitária. Nos momentos analisados houve uma expressão significativamente superior de mRNA ER- β em fases onde havia uma alta concentração de P₄ sérica e diminuição na expressão

nos momentos em que a concentração de P_4 passou a declinar (a partir do dia 25 da onda pré-ovulatória de LH) o que nos permite relacionar o aumento na expressão de mRNA ER- β com o aumento da P_4 sérica. Estes resultados também diferem dos observados por Hatoya et al. (2003), no qual o aumento na expressão de mRNA ER- β no tecido ovariano ocorreu em períodos de níveis de P_4 baixos.

Apesar dos resultados em tecido tubárico e uterino serem opostos aos observados em tecido ovariano, verificou-se o mesmo comportamento antagônico observado por Hatoya et al. (2003) entre os receptores estrogênicos. A diferença observada entre os tecidos (uterino/tubárico x ovariano), pode ser atribuída a diferenças de afinidade do receptor a um determinado composto, podendo desta forma, gerar efeitos controversos em certos tecidos e ser também específico para uma fase particular de desenvolvimento, conforme observado por Jefferson et al. (2000).

A tuba uterina é considerada uma estrutura extremamente sensível a ação hormonal devido a presença de receptores. Ulbrich et al. (2003) também obtiveram resultados semelhantes na avaliação da expressão de mRNA ER (α e β) em tuba uterina, atribuindo este fato a uma função fisiológica distinta destes receptores na tuba e suas células -alvo.

Com relação a expressão de mRNA ER- β , foi observado uma variação de acordo com a região da tuba uterina avaliada e com a fase do ciclo estral, já com relação a expressão de mRNA ER- α , na região da ampola não foi notada diferença relacionada as fases do ciclo, porém, após estímulos com estrógeno exógeno houve um aumento rápido nos receptores de ER- α , na região do istmo (ULBRICH et al.,2003).

Ao analisar nossos resultados observamos que o comportamento dos receptores estrogênicos tanto em tecido tubárico quanto uterino são bastante semelhantes, provavelmente existe uma influência similar da P_4 sobre esses tecidos.

De acordo com Hatoya et al. (2003), o ER- β parece ter um papel importante papel nos estágios iniciais da fase folicular e gestacional e nesses casos, a ação do estrógeno pode estar envolvida na iniciação dos receptores de LH mediados via ER- β . No caso do ER- α , provavelmente exista uma associação com a regulação luteal, assim como observado em ratos.

Análise do receptor de progesterona (PR) em útero e tuba uterina:

Na análise da expressão de receptor de P_4 em útero, observamos que não houve variação em relação ao diestro gestacional inicial (Grupo IA) e cíclico (Grupo II). Na análise das fases gestacionais, observamos que a expressão de mRNA PR diminui próximo a implantação (vesículas) e permanece baixo até o final da gestação (Grupo ID). Em tuba uterina, não houve variação na expressão deste receptor ao longo da gestação, conforme pode ser observado no gráfico 4.

Os receptores progesterônicos são expressos nos compartimentos epiteliais, estromais e miometriais do útero e sua expressão espaço-temporal nestes compartimentos é regulada pelo estrogênio e pela P_4 (TIBBETTS et al. 1998), passando por mudanças dinâmicas durante o ciclo estral e gestação inicial (KURITA et al. 1998, TAN et al., 1999).

Em nosso estudo não verificamos diferenças no padrão de expressão de mRNA PR quando realizamos a análise do local da implantação e áreas adjacentes, evento semelhante ao observado por Vermeish et al. (1999), o qual atribuíram essa situação ao fato do conceito não afetar a quantidade de ER e PR do tecido uterino.

De acordo com Johnston (1985) e Galabova Kovacs (2004), em cadelas, o aumento do nível de estrógeno estaria associado ao aumento de receptores estrogênicos e progesterônicos no endométrio, logo a maior expressão de mRNA PR, no início do diestro, seria resultante de um acúmulo gerado no período do estro, no qual as concentrações de estrógeno encontravam-se aumentadas. Provavelmente este útero estaria em preparação para as etapas posteriores secretoras quando os níveis de P_4 plasmática estão em um nível superior (VERMEIRSCH et al, 1999, 2000).

No período em que há um aumento de P_4 circulante ocorre uma diminuição na população de mRNA PR, no endométrio. Este fato também foi observado ao longo da gestação, o que justifica a evidencia de que os menores níveis de mRNA PR uterinos estão associados com o pico de P_4 sérica (DONNAY et al., 1995; DE COCK et al., 1997; VERMEIRSCH et al., 1999, 2000).

A ativação de PR estimula a diferenciação e sobrevivência do tecido decidual durante a implantação (STAVEREIS- EVERS et al., 2001). Através da técnica de

imunohistoquímica, observou-se que há um aumento na expressão de PR na fase lútea e uma diminuição durante a implantação e até o final de gestação. Essa condição também foi evidenciada em nosso trabalho, já que os menores valores da expressão de mRNA PR foram detectados exatamente no local da vesícula embrionária e no útero em final de gestação.

Vermeish et al. (1999) evidenciaram que o número de receptores progesterônicos é maior no final da gestação. Antes do parto, os níveis de mRNA PR são mais baixos e isso se deve à ação de ocitocina.

A não variação na expressão de mRNA PR em tuba uterina, pode ser um reflexo do nível de P_4 alto durante as fases analisadas (grupo II, grupo IA, IB e IC). Neste momento como a P_4 não sofreu grandes variações, também não houve variação na expressão do receptor, indicando também uma supressão de PR na tuba uterina, durante a dominância de P_4 (ULBRICH et al., 2003).

Ulbrich et al. (2003) avaliou a expressão de mRNA PR em tubas uterinas de bovinos ao longo do ciclo e verificou diferença no padrão de expressão com relação as regiões tubáricas relacionadas a sua importância funcional. No entanto, na região ampolar da fase lútea, a expressão de mRNA PR também manteve-se constante. Como em nosso estudo apenas a região ampolar foi analisada, não podemos excluir a possibilidade de que possa existir variação ao longo da gestação nas demais regiões tubáricas, já que em bovinos (ULBRICH et al., 2003), a expressão de mRNA PR na região do istmo mostrou ser duas vezes superior a região da ampola.

Análise do receptor de ocitocina (OTR) em útero e tuba uterina:

Na avaliação do receptor de ocitocina (OTR), observamos que houve maior expressão nas fases gestacionais finais (Grupo ID > Grupo IA, IB, IC e II) e local da implantação (vesículas > grupo IA, IB e II). Em tuba uterina, houve diferença significativa somente entre o final da gestação (grupo ID) e grupo II (controle), conforme pode ser observado no gráfico 5.

De acordo com Spencer et al. (1995) a P_4 promove um bloqueio na síntese de OTR, o que pode explicar o aumento da expressão de mRNA OTR exatamente na fase

em que a P₄ encontra-se em níveis baixos, como no momento do parto (Grupo ID). Provavelmente este fato não se deve à ação da ocitocina, já que esta somente estará aumentada na fase de expulsão fetal (KLARENBECK et al., 2007). Neste momento também pode ser notados baixos níveis de expressão de mRNA PR e altos níveis de expressão de mRNA ER- α , o que pode gerar também aumento na expressão de mRNA OTR, semelhante ao que ocorre em ovinos (SPENCER et al., 1995).

O aumento também durante a fase de implantação está de acordo com o observado por Beretsos et al. (2006), indicando uma provável participação da OTR no local da implantação.

A sinalização da gestação em equinos ainda não foi identificada, mas devido às semelhanças no controle da cascata luteolítica entre éguas e ruminantes, propõe-se que o conceito equino exerce sua sinalização pela inibição de receptores de ocitocina endometriais, já que em equinos, há ausência / redução da OTR endometrial durante a gestação inicial (BAZER, 1992), porém o mesmo não parece ocorrer em cadelas já que o nível de mRNA OTR foi similar entre cadelas gestantes e não gestantes no diestro inicial.

A ocitocina (OT) é um dos fatores envolvidos na atividade contrátil da tuba e também possui seus receptores expressos em tubas uterinas, de ratos, coelhos, ovelhas e porcas. Estudos demonstram que estes receptores encontram-se exclusivamente na camada muscular da parede das tubas uterinas, e possuem relação com a motilidade da parte inferior da tuba uterina, durante o estro em bovinos. A influência hormonal sobre esta contratilidade possui resultados contraditórios entre os autores, no entanto acredita-se que o nível de expressão de mRNA OTR em tuba uterina de vacas, como em outras fêmeas, é dependente da concentração elevada de estrogênios (KOTIWA et al., 2003).

Como em nosso estudo nenhuma fase analisada corresponde a um período de alto nível de estrogênio, não podemos afirmar o mesmo, mas sim somente que o nível de expressão de mRNA OTR durante as fases gestacionais não sofre alterações.

Análise do fator inibidor de leucemia (LIF) e seu receptor (LIF-R) em útero e tuba uterina:

Na avaliação da expressão gênica de mRNA LIF e LIF-R obtivemos comportamento idêntico em ambas as estruturas avaliadas, ou seja, a expressão de mRNA LIF foi maior no final da gestação (grupo ID) quando comparada aos demais grupo que não diferiram entre si (grupo IA, IB, IC e II) tanto em útero como em tuba uterina. Com relação à expressão de mRNA de seu receptor (LIF- R), a expressão no grupo controle foi maior em relação aos grupos gestacionais avaliados, os quais não diferiram entre si (Grupo IA, IB, IC e ID) tanto em útero com em tuba uterina, conforme pode ser observado no gráfico 6 e 7.

Desta maneira percebemos que o receptor de LIF parece não variar ao longo da gestação inicial, no entanto sua quantidade aumentada na fase final gestacional reflete a provável relação desta citocina com a placentação, assim como já mencionado por Schäfer-Somi (2008) em cães, Modric et al. (2000) em suínos e Vogiagis et al. (1997) em ovinos, o que sugere que LIF podem mediar interações entre decídua materna, leucócitos e trofoblasto (SHARKEY et al., 1999). Este fato também pode ser um reflexo da alta produção desta citocina pelo pinopódios materno, conforme citado por Kabir-Salmani et al. (2005) em humanos, relacionando esta citocina inclusive com o aumento da permeabilidade vascular (RED- HORSE et al., 2004).

Também podemos observar que assim como Schäfer-Somi et al. (2009) a diminuição na expressão de mRNA PR uterina pode contribuir para o aumentar em mRNA LIF uterino no mesmo período. Neste mesmo estudo, este autor propõe que possivelmente existam proteínas secretadas pelo embrião canino que desencadeiem tem efeito regulador sobre PR e LIF uterino, tanto durante, como após a implantação.

A presença constante de LIF-R durante a gestação também é um reflexo da importância do papel do LIF durante as fases gestacionais avaliadas, já que não houve variação na expressão destes entre as fases gestacionais.

A presença de LIF em tuba uterina e seu mesmo padrão de comportamento em relação à expressão, pode ser um indicio do mesmo tipo de influencia progesterônica

exercida nesta estrutura, neste caso provavelmente a ação de LIF esteja associada ao efeito promotor de crescimento, descrito por Schäfer-Somi et al. (2009).

Análise da expressão de osteopontina em útero e tuba uterina:

Em nosso estudo, não obtivemos variação na expressão de osteopontina durante a gestação inicial (grupo IA, IB, IC), sendo a expressão no início e final da gestação (grupo IA e ID) superior ao local da implantação, na qual a expressão de mRNA OPN encontrava-se em quantidade significativamente inferior. Com relação à tuba uterina, a expressão de OPN foi significativamente superior nas fases gestacionais iniciais (Grupo IA e IB) em relação a final da gestação (Grupo ID), sendo a menor quantidade detectada no grupo controle, conforme pode ser observado no gráfico 8.

Com relação aos resultados obtidos em utero, estes mostram-se contraditórios ao observado na literatura, já que a diminuição da expressão de mRNA OPN em nosso estudo ocorre a partir do momento da implantação, permanecendo baixa até o momento do parto. Diferentemente ao que foi preconizado por Johnson et al. (2003), no qual a P_4 agiria de uma maneira estimulatória a produção de OPN em útero no momento do parto.

Com relação aos resultados obtidos na avaliação da expressão de mRNA OPN em tuba, resultados semelhantes foram obtidos em humanos e sua presença foi detectada tanto nas regiões da ampola, como no istmo. Segundo Brown et al. (1992) a osteopontina é sintetizada pelo epitélio da tuba uterina, e é liberada do epitélio para o fluido luminal, e tem sua participação relacionada a um papel funcional na fisiologia normal da tuba uterina, afetando as interações entre os gametas, e embriões. , logo a sua menor detecção nas fases gestacionais finais em tuba, estariam associadas a sua pouca ação na gestação final e em animais não gestantes.

E. Avaliação ultraestruturais de embriões, tubas e útero durante o período peri-implantação

Na avaliação ultraestrutural de mórula em nosso experimento (Figura 23), podemos observar a presença abundante de grânulos lipídicos no citoplasma dos blastômeros, os quais apresentam-se com aspectos arredondado. As mitocôndrias existentes também possuem aspecto ovalado e ainda existe a presença da zona pelúcida, descrição semelhante ao observado por Landim e Alvarenga (1997).

De acordo com estes autores, esta descrição de constituição embrionária parece ser compatível com o provável processo metabólico realizado pelo embrião nesta fase, evidenciando um baixo nível de biossíntese e limitada habilidade em metabolizar glicose como fonte energética.

Em embriões bovinos, nos estádios iniciais de desenvolvimento também há uma limitada capacidade de utilizar glicose até a compactação, dependendo principalmente, da oxidação de nutrientes como piruvato e aminoácidos para fornecimento de energia (THOMPSON et al., 1996). Nesta fase então há a oxidação do piruvato. Este processo pode ocorrer de um forma aeróbica, incluindo então a participação do ciclo de krebs e da cadeia respiratória, através da fosforilação oxidativa, como também pode ocorrer de forma anaeróbica, através de uma oxidação incompleta da glicose, gerando ácido láctico e pouca produção energética (RIEGER, 1992).

Durante o estagio de AGE, a captação da glicose parece ser obrigatória para o desenvolvimento embrionário, refletindo uma maior necessidade energética para a AGE, a compactação e a expansão da blastocle (THOMPSON et al., 1996). O metabolismo nesta etapa é considerado aumentado entre os estágios de mórula e blastocisto em bovinos, e há um aumento no consumo de glicose e produção de lactato (HARVEY, 2007; THOMPSON et al., 1996).

A presença dos grânulos lipídicos, repletos de mucopolissacarídeos e proteínas, também parece estar associada a um maior aporte de energia disponível ao embrião principalmente nesta fase, atuando como uma reserva energética ate a efetiva implantação (LANDIM e ALVARENGA,1997), já que no decorrer de seu

desenvolvimento, na fase de blastocisto, podemos observar que o número dos grânulos diminuem e a presença de organelas aumenta.

A constituição celular do embrião canino então durante a fase de blastocisto, mostra-se semelhante a dos demais mamíferos com espaço perivitelínico e superfície apical das células trofoblásticas ainda coberta por microvilosidades (Figura 25) e neste caso podemos notar presença de mitocôndrias mais alongadas e organelas como complexo de golgi (Figura 24) e retículo endoplasmático liso, evidenciando uma provável evolução metabólica. Nesta fase também são evidenciadas as junções *tight* (Figura 26), *as quais* atuam como barreira de permeabilidade seletiva, responsáveis por manter as células unidas (JOHNSON e ZIOMEK, 1981; YAMANAKA et al., 2006).

Estas organelas (mitocôndrias e complexo de golgi) podem auxiliar na degradação de aminoácidos, principalmente a glutamina, que também se mostra bastante importante no desenvolvimento de embriões de hamster, suínos e bovinos (RIEGER, 1992).

Deste modo o metabolismo da glutamina, pode ser uma fonte significativa de energia no embrião na fase inicial, como também é para outras células que proliferam rapidamente. Essa via também está relacionada à formação de outros aminoácidos, produção de NADH, substratos para a realização de ciclo de krebs, síntese de glicoproteínas, glicolipídios, componentes da matriz extracelular e eliminação de radicais livres, que são extremamente prejudiciais ao desenvolvimento embrionário (RIEGER, 1992).

Também se associa a necessidade de um maior aporte energético ao aumento das trocas iônicas realizados pela bomba de sódio e potássio (LEESE, 1995) em embriões de coelhos e ratos. Nesta fase os embriões bovinos são capazes de aumentar a glicólise em uma capacidade máxima para ganhar energia adicional quando as outras vias já estão operando em seu limite.

Essa energia derivada da metabolização da glicose deverá ser proveniente provavelmente de processos anaeróbicos, já que a existência de ambientes anaeróbios até a fase de implantação parece ocorrer (tensão de oxigênio no trato reprodutivo da fêmea é em torno de 5%). A ativação da via fosfato-pentose possivelmente é via de escolha, já que aparentemente o ciclo de krebs apresenta um pequeno papel em

blastocistos de bovinos, coelhos e ovelhas (RIEGER, 1992). Deste modo, é possível perceber que à medida que o embrião se torna mais complexo, há um concomitante aumento em suas demandas energéticas (GARDNER, 1998).

Na avaliação da região ampolar da tuba uterina durante o período gestacional avaliado (Grupo IA- 8 dias de gestação, Grupo IB- 12 dias de gestação e Grupo IC- 21 dias de gestação), esta apresentou-se formada por epitélio cúbico simples, característico de ductos e túbulos que possuem atividade excretora, secretora ou absorvente (Figura 15,16 e 17). Evidenciamos a presença de citoplasma e vacúolos eletrólucidos, os quais são um indicativo provável de presença de material mucopolissacarídeo, por outro lado a presença de grânulos elétrondensos também evidenciada é indicativo provável de presença de material protéico (ALMEIRÃO, 2011), no entanto análises mais específicas são necessárias para distinguir a natureza destes materiais.

De acordo com Leese et al. (1998), a distribuição dos tipos celulares evidenciados (células ciliadas e não ciliadas) varia de acordo com a região da tuba analisada, ou seja, sendo próximo as fimbrias e infundíbulo há presença de células ciliadas em abundância, as quais diminuem de quantidade no trajeto até a região do istmo, já as células secretoras ou não ciliadas aumentam em direção ao istmo. Em nosso trabalho, não houve distinção de predominância de tipos celulares e atividade celular na região da ampola no grupo IA, IB, IC e II, porém não avaliamos a região do istmo e infundíbulo, durante estes períodos.

Com 21 dias de gestação houve aumento da presença de grânulos elétrólucidos nos citoplasmas de ambos os tipos celulares descritos, o que pode indicar uma variação no conteúdo de secreção liberada.

Na avaliação da região ampolar da tuba uterina de animais não gestantes (Figura 18), em diestro fisiológico, podemos observar que o epitélio apresentou-se pseudoestratificado, ou seja, as células cilíndricas apresentavam-se mais altas e aparentava existir mais uma camada de células, conforme o corte observado. Neste caso, as células basais apresentavam formato piramidal com núcleo arredondado e central, podendo passar por divisões mitóticas para renovação do epitélio e secretarem muco como função lubrificante, auxiliando na adesão de partículas. Não observamos a

presença de grânulos elétron-densos neste grupo, o que pode ser um indicativo de uma secreção tubárica diferenciada entre o diestro inicial de animais gestantes e não gestantes, porém análises mais específicas das secreções tubáricas nestes períodos são necessárias.

Na análise do fragmento médio do corno uterino dos períodos gestacionais avaliados (Grupo IA, IB e IC) e diestro inicial (Grupo II) observados nas Figuras 19, 20, 21 e 22, não foi possível evidenciar as 3 camadas musculares existentes em nenhum corte analisado. No fragmento uterino referente ao grupo IB, evidenciamos somente a submucosa formada por tecido conjuntivo frouxo.

O endométrio, evidenciado na análise do grupo IA e II, mostrou-se formado por epitélio cilíndrico pseudo-estratificado, diferentemente ao observado por Barrau et al. (1975) que caracterizou o epitélio como cubóide simples. De acordo com este mesmo autor este epitélio sofre modificações passando a ser considerado secretor mucoíde colunar, entre o final do estro e durante a primeira semana do diestro. Nestes grupos avaliados também não houve variação quanto ao tipo de vacúolo encontrado caracterizando sempre presença provável de mesmo tipo de material no interior das glândulas durante essas fases.

No grupo IC (21 dias de gestação) foi evidenciada presença de glândulas com material elétron-lucidos, o que dessa forma indicar uma mudança no tipo de material secretado, durante o período implantacional.

De acordo com Barrau et al. (1975), em cadelas cíclicas, o estradiol exerce grande influencia sobre esta variação de epitélio encontrado, auxiliando no processo de crescimento e de diferenciação (TAN et al., 1999), no sentido de torná-lo apto a uma provável gestação, no entanto na fase progesacional existe um aumento na espessura do endométrio e as glândulas endometriais se tornam mais tortuosas com llumen mais amplo caracterizando sua função secretora, assim como em mulheres.

F. Avaliação do perfil protéico de secreção tubárica e uterina durante o período peri-implantação

Após realizarmos o processo de concentração das proteínas resultantes do lavado tanto uterino como tubárico, observamos que houve grande aumento na concentração final a ser trabalhada e que este foi um processo essencial para que pudéssemos realizar com maior qualidade a eletroforese unidimensional (Tabela 10)

As proteínas encontradas no lavado uterino tiveram massa molar variando entre $167,85 \pm 10,10$ a $11,78 \pm 0,06$ KDA e no lavado tubárico variaram entre 175 a $24,40 \pm 1,10$ KDA.

Na análise do perfil protéico da secreção uterina (Tabela 11) podemos observar que existiram quatorze proteínas encontradas, sendo que oito destas U1, U3, U4, U6, U7, U8, U11, U14) se repetiram nos 4 grupos avaliados (grupo IA, IB, IC e II). Destas somente a proteína de aproximadamente 24 KDA (U 11) era menos encontrada no grupo IB em relação aos demais grupos que não diferiram entre si (Grupo IA, IC e II), conforme pode ser observado na tabela 13.

Existiram também duas proteínas (U2 E U12) que apresentaram padrão de expressão diferenciado entre os grupos, sendo que a primeira não foi encontrada no grupo IC e a segunda somente foi encontrada no grupo IA e II, em quantidades similares entre os grupos avaliados (figuras 27,28,29,30 e 31).

Existiram quatro proteínas que foram encontradas exclusivamente no grupo ID (U5, U9, U10 E U13,). Este grupo corresponde ao período de implantação e possivelmente estas proteínas estejam relacionadas a uma secreção diferenciada durante esta fase.

Durante o período de peri-implantação, o endométrio e o embrião são responsáveis por produzir inúmeras proteínas que serão essenciais durante a implantação, tais como uteroferrina, proteína trofoblástica ovina (OTP-1) e bovina (BTP-1) e proteína ligante ao retinol (RBP) (TATCHER et al., 1994).

Acredita-se que estas proteínas sejam um dos principais componentes do histiotrofoblasto, que possuem também misturas complexas de enzimas, fatores de crescimento, citocinas, linfocinas, hormônios, proteínas de transporte (BAZER, 1975),

gases e pequenas moléculas de nutrientes, como açúcares e aminoácidos, que alcançam a superfície absorviva do trofoectoderma por difusão através dos fluidos luminiais (THATCHER et al., 1994).

De acordo com Buhi et al. (1992), os resultados de seus estudos com cultivo de explant de endométrio, seguido de eletroforese bidimensional, para avaliação das proteínas endometriais, indicaram que o endométrio canino sintetiza e secreta pelo menos dez complexos de proteína, sendo duas diferencialmente expressas (CP5 e CP6), as quais equivalem a 54,6 e 23,0 KDA respectivamente e possam ser as proteínas U7 e U11 respectivamente, por nós identificadas.

Em seu trabalho, o autor conclui que a expressão de proteínas parece ser diferente por dia do diestro, independentemente do diestro ser gestacional ou não, sugerindo que o embrião pré-implantação não tem efeito sobre a síntese e secreção de proteínas endometriais uterinas. Os autores sugeriram que a expressão das proteínas específicas durante o diestro inicial, estão relacionadas as concentrações de estrógeno e P₄, já que estas apresentavam variação conforme era acrescentado esses hormônios ao meio.

Em seu trabalho foram avaliados os dias 3, 7 e 10 de diestro, ciclico e gestacional, ou seja não trata-se do mesmo período por nós avaliado, o que torna difícil a comparação entre os trabalhos, sendo também que as técnicas de eletroforese utilizadas foram diferentes, porém entre as proteínas que possivelmente sejam as mesmas citadas por Buhi et al. (1992) (54 e 23 KDA), apenas a última apresentou comportamento similar, encontrando-se reduzida nos dias iniciais de diestro (grupo IB) e aumento com o decorrer desta fase.

Estas proteínas identificadas com cp5 e cp6, foram melhor estudadas posteriormente e acredita-se que a cp6 seja pertencente a família de proteínas ligantes ao retinol (RBPs) encontrado nas também nas secreções uterinas de suínos, as quais fazem parte da histotrofoblasto, sugerindo então serem essenciais para a nutrição dos conceptos pré-implantação

Em seu trabalho como não foi avaliado o período peri-implantação, acreditamos mediante aos nossos resultados obtidos, que há diferença no perfil proteico

principalmente quando analisado o período implantacional, já que 4 proteínas foram unicamente detectadas nesta fase.

Em trabalho realizado por Thatcher et al. (1994), houve avaliação também de explantes uterinos tanto do período pré-implantação como também do período pós-implantação. Em seu estudo foram identificadas 4 proteínas (CPI = 86 kDa), cP2 (42-44 kDa), cP4 (28-30 kDa), cP6 (20-25 kDa) que foram sintetizadas tanto pelo endométrio como pelo conceito entre os dias 16 a 27 da onda pré-ovulatória de LH. No entanto conforme ressaltado pelo autor, em estudos posteriores estas proteínas apareciam tanto em animais gestantes como também em não gestantes. Estas proteínas identificadas por Thatcher et al. (1994) talvez possam corresponder respectivamente as proteínas U13, U8, U10 e U11, que foram por nós identificadas.

Na análise do perfil protéico da secreção tubárica, evidenciamos onze proteínas encontradas (Tabela 12), sendo que seis destas proteínas (T3, T5, T6, T8, T9 e T11) estavam presentes em todos os grupos analisados, em quantidades similares entre os grupos, sendo que as proteínas com T9 e T11 não tiveram seus valores de IOD identificados, não permitindo dados para que pudessem ser feitas as devidas comparações, conforme pode ser observado na tabela 14.

A proteína T1, estava presente somente no grupo IB e IC, sendo presente em quantidades similares entre estes grupos e as proteínas equivalentes a T4 e T10 estavam presentes somente nos grupos II e IA, sendo que a primeira em quantidades similares e a segunda presente em maior quantidade no grupo IC. A proteína equivalente a T7 estava presente somente no grupo IA e a proteína equivalente a T2 estava presente somente no grupo II.

Muitos constituintes do fluido tubárico tem se mostrado importante para a fertilização e início do desenvolvimento embrionário e são conhecidos por variar, tanto entre as espécies, como também entre os diferentes estágios do ciclo estral dentro da mesma espécie. Em estudos iniciais com coelhos verificou-se que a concentração de bicarbonato, fosfato inorgânico, proteínas e ácido láctico aumentavam significativamente ao longo da tuba uterina no sentido fimbrias-junção útero-tubárica (DAVID et al., 1969), reforçando a idéia de que cada segmento da tuba apresenta papel distinto nos eventos iniciais da reprodução.

Na cadela, no entanto, há um papel adicional da tuba uterina, que é proporcionar o ambiente em que maturação do oócito ocorre. O uso de co-cultura de oócitos e aplicação da FIV nessa espécie encontra sérias barreiras, já que não há certezas dos componentes presentes na tuba da cadela na fase pós-ovulatória e a identificação de produtos de secreção da tuba uterina ainda é motivo de estudo, principalmente quanto aos elementos proteicos secretados durante o período pré-ovulatório (ENGLAND, 2000).

6. CONCLUSÃO

Com relação a hipótese levantada no início deste estudo, obtivemos parte da hipótese confirmada, pois a maioria dos genes candidatos não apresentaram diferenças na expressão quando comparado diestro cíclico e gestacional, tanto em tuba quanto em útero, com exceção de LIF-R, ER- β e OPN. Com relação aos achados ultraestruturais, o conteúdo dos grânulos secretados pela tuba entre cadelas gestantes e não gestantes parece variar, no entanto, pesquisas sobre a natureza deste material deverão ser realizadas, bem como análises mais específicas sobre as proteínas dos lavados em tuba, que foram detectadas exclusivamente em cadelas gestantes e não gestantes.

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nas condições do experimento, concluiu-se que:

- ❖ O nível sérico de P_4 não varia entre cadelas gestantes e não gestantes;
- ❖ Os genes ER- α , PR, LIF-R são expressos somente em blastocistos caninos, enquanto o gene OTR está presente tanto em mórulas quanto em blastocisto;
- ❖ Não há expressão dos genes ER- β , OPN e LIF em mórulas e blastocistos caninos;
- ❖ Os genes ER- α , ER- β , PR, OTR, LIFR, OPN e LIF são expressos em tubas e no útero de cadelas gestantes e não gestantes;
- ❖ A expressão dos genes ER- α , ER- β , PR, OTR, LIF e OPN no útero não varia entre cadelas gestantes e não gestantes, porém sofrem variações na sua expressão ao longo da gestação.

- ❖ O gene LIF- R é mais expresso no útero e em tubas de cadelas não gestantes quando comparado aos animais gestantes.
- ❖ Os genes ER- α , OTR, LIF sofrem variações em suas expressões nas tubas ao longo da gestação, porém não varia em cadelas gestantes e não gestantes .
- ❖ A expressão do gene ER- β é maior em tubas de animais não gestantes quando comparado a fêmeas gestantes
- ❖ A expressão gênica de OPN em tubas de animais não gestantes é menor que a de animais gestantes.
- ❖ A expressão gênica de PR não varia em tubas de animais gestantes e não gestantes
- ❖ Quatro proteínas que são secretadas somente durante a fase de implantação nas cadelas.
- ❖ Existem proteínas na tuba uterina que somente são secretadas em animais gestantes e outras que somente são secretadas em fêmeas no diestro ciclico
- ❖ O conteúdo secretado pelas células secretoras da tuba uterina varia entre oanimais gestantes e não gestantes
- ❖ Não há diferenças no aspecto ultraestrutural no segmento médio do corno uterino avaliado entre animais gestantes e não gestantes, porém a secreção uterina varia durante o período implantacional.
- ❖ Os embriões apresentam modificações ultraestruturais de acordo com o decorrer de seu desenvolvimento, podemos observar diminuição do número de granulos lipídicos e aumento do numero de organelas, provavelmente associadas a alterações metabólicas

REFERÊNCIAS¹

- ALLEN, W.E. Prenhez. In: Alen, W.E. **Fertilidade e obstetrícia no cão**. São Paulo: Liv. Varela, 1995, cap.10, p. 57-58.
- AMSO, N; CROW, J; SHAW, R.W. Comparative immunohistochemical study of oestrogen and progesterone receptors in the fallopian tube and uterus at different stages of the menstrual cycle and the menopause. **Human Reproduction**, v.9, n.6, p.1027-37, 1994.
- APPARAO, K.B; ILLERA, M.J; BEYLER, S.A; OLSON, G.E; OSTEEEN, K.G; CORJAY, M.H; BOGGESS, K; LESSEY, B.A. Regulated Expression of Osteopontin in the Peri-Implantation Rabbit Uterus. **Biology of Reproduction**, v.68, p. 1484–1490, 2003.
- BARRAU, M.D; ABEL, J.H; TORBIT, C.A; TIETZ, W.G. Development of the implantation chamber in pregnancy bitch. **Am. J. Anat.**, v.143, p.115-130, 1975.
- BAZER, F.W. Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 199, p. 373–384, 1992.
- BERETSOS, P; LOUTRADIS, D.; KOUSSOULAKOS, S; MARGARITIS, L.H; KIAPEKOU, E; MASTORAKOS, G; PAPASPIROU, I; MAKRIS, N; MAKRIGIANNAKIS, A; ANTSAKLIS, A. Oxytocin Receptor Is Differentially Expressed in Mouse Endometrium and Embryo during Blastocyst Implantation. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1092, p. 466-79, 2006
- BIGGERS, J.D; BELL, J.E, BENOS, D.J. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. **Am. J. Psychol.**, v. 255, p. 419-432, 1988.
- BROWN, L.F, BERSE, B; VAN DE WATER, L; PAPADOPOULOS, SERGIOU, A; PERRUZZI, C.A; MANSEAU, E.J; DVORAK, H.F; SENGGER, D.R. Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. **Mol Biol Cell**, v.3, p.1169–1180, 1992
- BUHI, W.C.; THATCHER, M. J; SHILLE, V.M; ALVAREZ, I. M; LANNON, A.P; JOHNSON, J. Synthesis of uterine endometrial proteins during early diestrus in the

¹ * ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação- Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

cyclic and pregnant dog, and after estrogen and progesterone treatment. **Biology of reproduction**, v.47, p.326-336, 1992.

BURKE, T.J. Small animal reproduction and fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Colégio Brasileiro

BYSTED, B.V; DIELEMAN, S. J; HYTTEL, P; GREVE, T.. Embryonic developmental stages in relation to the LH peak in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.57, p.181-186, 2001

CÁRDENAS, H; BURKE, K.A; BIGSBY, R.M; POPE, W. F; NEPHEW, K. P Estrogen Receptor β in the Sheep Ovary During the Estrous Cycle and Early Pregnancy **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 128-134, 2001

CHALLIS, J AND LYE, S.J. Parturition. In: KNOBIL, E; NEIL, F (ED). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p.985-1031, 1994.

CHEN, H.F; SHEW, J.Y; HO, H. N; HSU, W. L; YANG, Y. S. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in preimplantation embryos. *Fertil. Steril.*, v. 72, p. 713-719, 1999

CHIRINEA, V. Efeito do meio de congelação sobre as características morfofuncionais do sêmen canino. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista- UNESP-FMVZ- Botucatu, 2004. 65 p.

CHRISTIANSEN, I.J. **Reproduction in the dog & cat**. São Paulo : Bailliere Trindall, 1984. Cap.7, p.154-170.

COCANNON, P.W. Canine pregnancy: Predicting parturition and timing events of gestation. In: CONCANNON, P.W ET AL. **Recent advances in small animal reproduction**, Ithaca: International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: <[http; www.ivis.org/](http://www.ivis.org/)>. Acesso em: 18 set. 2007.

CONCANNON, P. W; WHALEY, S; LEIN, D; WISSLER, R. Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, p.1819-1821, 1983.

CONCANNON, P.W. Canine pregnancy and parturition. **Vet. Clin. N. am-small**, v. 16, n.3, p.453-475, 1986

CONCANNON, P.W.; CASTRACANE, V.D.; TEMPLE, M.; MONTANEZ. A. Endocrine control of ovarian function in dogs and others carnivores. In: II INTERNACIONAL

SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION, 6., 2009, São Paulo.
Proceedings... São Paulo, 2009, p. 172- 190.

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and Endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.39, p.3-25, 1990.

CONCANNON, P.W; HANSEL, W; VISEK, W. J.The ovarian cyce of the bitch : plasma strogen, LH and progesterone. **Biology of Reproduction**, v.13, p. 112-121, 1975

CONCANNON, P; TSUTSUI, T; SHILLE, V.Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 57, p.169-179, 2001.

CONCANNON,P.W; POWERS, ME, HOLDER, W; HANSEL, W. Pregnancy and parturition in the bitch. **Biol. Reprod**, v.16, p.517–526, 1977

COOKE, P.S; BUCHANAN, D.L; LUBAHN, D.B; CUNHA, GR.. Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse. **Biol . Reprod.**, v. 59, p. 470–475, 1998

CUI, X.S; LI, X.Y; KIM, N.H. Global gene transcription patterns in in vitro-cultured fertilized embryos and diploid and haploid murine parthenotes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 352, p. 709–715, 2007.

CULLINAN, E. B; ABBONDANZO, S. J; ANDERSON, P. S, POLLARD, J.W, LESSEY, B. A, STEWART , C. L.. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/ paracrine function in regulating embyo implantation. **Proc of Natl Acacde Sci.**, v.93, p. 3115-3120, 1996

CUNHA, G.N.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E. Taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial em fêmeas caninas (Canis Familiares- Linnaeus, 1758). **Biotemas**, v. 18, n. 2, p- 155-167, 2005

DAVID, A; BRACKETT, B; GARCIA, C; MASTRIANNI, L. Composition of rabbit oviduct fluid in ligated segments of the fallopian tube. **J. Reprod. Fert.** v.19, p.285-289, 1969.

DE COCK, H; DUCATELLE, R; LOGGH, J. P. mmunohistochemical localization of estrogen receptor in the normal canine female genital tract. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 14, p. 133–147, 1997

DERUSSI, A.A.P. Efeitos da aplicação do benzoato de estradiol na prevenção da gestação em cadelas. Botucatu, 2008. 100p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. Universidade Estadual Paulista.

ENGLAND, G.; CONCANNON, P.W. Determination of the optimal breeding time in the bitch; Basic consideration. In: CONCANNON, P. W., ENGLAND, G.C.M., VERSTEGEN, J. Recent advances in small animal reproduction. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org/>>. Acesso em 13 de dez 2011.

FELDMAN, E.C; NELSON, R.W. **Canine and Feline endocrinology and reproduction**, Philadelphia, 2.ed, W.B. Saunders, 1996, 78 p.

FRANZDN, A, HEINEGARD, D. In: **The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues**, Ed. Butler, W. T. EBSCO MEDIA, BIRMINGHAM, AL, p. 132-141, 1985

FUCKS, A; SUMUDRA PERIYASAMY, S; ALEXANDROVA, M; SOLOFF, M. Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids. *Endocrinology*, v.113, p.742-749, 1983.

GABLER, C; CHAPMAN, D.A; GERENA, R.L; SORENSEN, E.S; KILLIAN, G.J Osteopontin is present in the bovine oviduct epithelium and luminal fluid. **Biology of Reproduction**, v. 60, 1999

GABLER, G; CHAPMAN, D. A; KILLIAN, G. J. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 126, p. 721–729, 2003

GALABOVA- KOVACS, G; WALTER, I; URICH, C; AURICH, J. Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro condition. **Theriogenology**, v.61, n.4, p.963-976, 2004

GARDNER, D.K. Embryo development and culture techniques. In: **New Technologies in Animal Breeding**, Clark J (Ed), Harwood Academic, Berkshire, 1997.

GONÇALVES, J.S. Análise da expressão gênica diferencial dos receptores de estrogênio (alpha e beta) e P₄ em oócitos e células do cumulus nas diferentes fases do ciclo estral em cães. 2007. 55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária –

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GONÇALVES, J.S.A; VANNUCCHI, C.I; BRAGA, F.C, PAULA-LOPES, F.F; MILAZZOTTO, M.P; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A; VISINTIN, J.A. Estrogen and progesterone receptors gene expression in canine oocytes and cumulus cells throughout the estrous cycle. In: **6th Internacional Symposium on canine and feline Reproduction & 6th Biannual EVSSAR congress**, 2008, Vienna. **Proceedings...** Vienna, 2008. p.100-101.

GONCALVES, R.F; WOLINETZ, C.D; KILLIAN, G.J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (α V and α 5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v. 67, p. 468–474, 2007

GRAY, C.A; ABBEY, C.A, BEREMAND, P.D; CHOI, Y; FARMER, J.L; ADELSON, D.L; THOMAS, T.L BAZER, F.W; SPENCER, T.E. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone and interferon tau in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.74, p.383-394, 2006

GUNZEL–APEL, A.R. Influence of progesterone withdrawal on pregnancy related parameters during post- implantation early pregnancy loss. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CANINE AND FELINE REPRODUCTION, 6. 2008, BIENNIAL EVSSAR CONGRESS, 6., 2008, Vienna. **Proceedings...** Viena, 2008, p.104- 109

HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantion embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 113-128, 2007.

HASE, M; HORI, T; KAWAKAMI, E; TSUTSUI,T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. **Journal Veterinary. Medical Science**. v.62, p.243-248, 2000.

HATOYA, S; TORIIB, R; KUMAGAIA, D; SUGIURAA, K; KAWATEC, N; TAMADAC, H; SAWADAC, T; INABAA, T. Expression of estrogen receptor α and β genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. **Neuroscience Letters**, v. 347, p. 131–135, 2003.

HIXON, J.E; FLINT, A.P.F. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F₂ secretion in sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v. 79, p. 457-467, 1987.

HOU, Q; GORSKI, J. Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differently in mouse embryos during preimplantation development. **PNAS**, v. 90, p. 9460- 9464, 1993

HOU, Q; Paria, B ; MUI, C ; DEY,S.K, GORSKY, J. Immunolocalization of estrogen receptor protein in the mouse blastocyst during normal and delayed implantation. **Physiology**, v. 93, p. 2376-2381, 1996.

JEFFERSON, W; COUSE, J; BANKS, E; KORACH, K; NEWBOLD , R. Expression of Estrogen Receptor β Is Developmentally Regulated in Reproductive Tissues of Male and Female Mice. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 310–317, 2000

JOHNSON, G.A; BURGHARDT, R.C; JOYCE, M.M; SPENCER, T.E; BAZER, F.W; PFARRER, C; GRAY, C.A. Osteopontin expression in uterine stroma indicates a decidualization-like differentiation during ovine pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1951-1958, 2003.

JOHNSON, M.H; ZIOMEK, C.A. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. **Journal of Cell Biology**, v. 91, p. 303–308, 1981

JOHNSON,G. Osteopontin: Roles in Implantation and Placentation. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1458–1471, 2003.

JOHNSTON, S.D., ROOT KUSTRITZ, M.V., OLSON, P.N.S., 2001. **Canine and Feline Theriogenology**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 287–306.

KABIR- SALMANIL, M, NIKZAD, H; SHIOKAWA, S; AKIMOTO, Y; IWASHITA, M. Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. **Mol Human Reprod**, v. 11, p. 553-559, 2005

KILLIAN, G. J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. **Anim Reprod Sci**, v. 82, p. 141–53, 2004

KLARENBECK, M; OKKENS, A.C, KOOISTRA, H.S; MOL, J.A; BEVERS, M.M, TAVERNE, M.A.M. Plasma oxytocin concentrations during late pregnancy and parturition in the dog. **Theriogenology**, v.68, p.1169-1176, 2007.

KLEIN, C; BAUERSACHS, S; ULBRICH, S.E; EINSPANIER, R; MEYER, H.H, SCHMIT,S.E; REICHENBACH, H.D, VERMEHREN, M; SINOWATZ,F; BLUM,H. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period., **Biol Reprod** v.74, p.253-264, 2006.

KOJIMA, K; KANZAKI, H; IWAI, M; HATAYAMA, H; FUJIMOTO, M, INOUE, T. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. **Biol Reprod**, v. 50, p. 882–7, 1994

KOTWICA, G. B. The concentrations of catecholamines and oxytocin receptors in the oviduct and its contractile activity in cows during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 60, p. 953–964, 2003.

KUIPER, G.G.J.M., LEMMEN, J.G., CARLSSON, B., CORTON, J.C., SAFE, S.H.,VAN DER SAAG, P.T., VAN DER BURG, B., GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor α . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252–4263, 1998

KURITA, T; YOUNG, P; BRODY, J.R; LYDON, J. P; O'MALLEY, B.W; CUNHA G.R. Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. **Endocrinology**, v. 139, p. 4708 –13, 1998

LANDIM-ALVARENGA, F.C, BICUDO, S.D. Ultrastructural study of pré-implantation dog embryos. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.14, p.213-217, 1997.

LEESE, H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. **Human Reproduction Update**, v. 1, p. 63–72, 1995

LEESE, H.J. The formation and function of oviduct fluid. **J. Reprod. Fert.** 82, 843-856, 1988.

LEI, T; YANG,T, XIA, M ; GAN, L ; CHEN, X.D ; YUAN, J ; ZHU, Y. Stage- specific expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in rabbit pre-implantation embryo and uterine epithelium during early pregnancy. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 39, p. 13-18, 2004

LEMMEN, J; BROEKHOF, J; KUIPER, G; GUSTAFSSON, J, VAN DER SAAG, P. Expression of estrogen receptor α and β during mouse embryogenesis **Mechanisms of Development**, v. 81,p. 163–167, 1999

LESSEY, B.A; PALOMINO, W.A; APPARAO, K.B; YOUNG, S. L; LININGER, R.A. Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women.. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1-10, 2006

LI, W; BOOMSMA, R.A; VERHAGE, H. G. Immunocytochemical analysis of estrogen and progesterin receptors in uteri of steroid-treated and pregnant cats. **Biol Reprod**, v. 47, p. 1073–1081, 1992

LUZ, M.R, BERTAN, C. M, BINELLI, M, LOPES, M. D. Plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F2-alpha (PGFM), progesterone and estradiol in pregnant and nonpregnant diestrus cross-bred bitches. **Theriogenology**, v.66, p.1436-1441, 2006.

LYDON, J.P; DEMAYO, F.J; FUNK, C.R; MANI, S.K; HUGHES, A.R; MONTGOMERY, C.A JR; SHYAMALA, G; CONNEELY, O.M, O'MALLEY, B.W. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. **Genes Dev**. V.9, p.2266–2278 1995.

MITCHELL, B.F; FANG, X; WONG, S. Metabolism of oxytocin in rat uterus and placenta in late gestation. **Biology of reproduction**, v.57, p.807-812, 1997.

MODRIC, T ; KOWALSKI, A.A; GREEN, M.L; SIMMEN, R.C; SIMMEN, F.A. Pregnancy-dependent expression of leukemia inhibitory factor (Lif), Lif receptor-b and interleukin-6 (IL-6) messenger ribonucleic acids in the porcine female reproductive tract. **Placenta**, v. 21, p. 345–353, 2000.

MORTON, D. B. Artificial insemination with frozen semen in the dog: principles of DNA fingerprinting. In: JONES D.E. and JOSHUA J.O. (Eds.). **Reproductive clinical problems in the dog**. Bristol: Wright and Sons Ltd., 1988. p. 169-186

MOSES, D.F; MATKOVIC, M.; FISHER, E.C; MARTINEZ, A.G. Amino acid contents on sheep oviductal and uterine fluids. **Theriogenology**, v. 47, p. 336, 1997.

MOSSELMAN, S; POLMAN, J; DIJKEMA, R. Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Lett.**, v. 392, p. 49-53, 1996

MULAC- JERICEVIC, B; CONNELLY, O. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. **Reproduction**, v. 128, p. 139-146, 2004

OGAWA S, INOUE S, WATANABE T, HIROI H, ORIMO A, HOSOI T, OUCHI Y, MURAMATSU M. The complete primary structure of human estrogen receptor 1 (hER 1

and its heterodimerization with ER α in vivo and in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 243, p.122-126, 1998

ONCLIN, K; VERSTEGEN, J.P. Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches. **J Reprod Fertil Suppl**, v.51, p.203-208, 1997.

OZAKI, K; LEONARD, W.J;. Cytoquine and cytoquine receptor pleiotropy and redundancy. **Journal Biology Chemistry**, v. 277, p. 29355-9352, 2002..

PEREIRA, J.J.; HOLANDA, C.C.; ARÊAS, V.S.; LIMA, K.R.O.; SALGADO, A.E.P.; GIANNOTTI, J.G.; LUZ, M.R. Comparação de duas técnicas para colheita de embriões caninos. **Acta Sci. Vet**, v. 35, supl. 3, 2007.

PRATT, H.P. Membrane organization in the preimplantation mouse embryo. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 90, p. 101-121, 1985.

PRETZER, S.D. Canine embryonic and fetal development: A review. **Theriogenology**, v.70, p.300-303, 2008.

PURI, C; GARFIEL, R. Changes in hormone levels and gap junctions in the rat uterus during pregnancy and parturition. **Biology of Reproduction**, v.27, p. 967, 1982

RED-HORSE, K; ZHOU, Y; GENBACEV, O; PRAKOBPHOL, A; FOULK, R; MCMASTER, M; FISHER, S. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **Science in Medicine**. V, 114, n.6, 2004

REHN, S; STANISLAUS, D; WILLIAMS, A. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. **Reproductive Physiology and Toxicology Review Serie**, v. 80, p. 233–245, 2007

REINHART, K. Synthesis and regulation of leukaemia inhibitory factor in cultured bovine oviduct cells by hormones. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p. 301–308, 1998

REN, S. G; MELMED, S, BRAUNSTEIN, G. D. Decidual leukemia inhibitory factor production and action on human chorionic gonadotropin secretion at different stages of gestation in vitro. **Early Pregnancy**, v. 3, p. 102- 108, 1997.

REYNAUD, K.; FONTBONNE, A.; MARSELOO, N.; THOUMIRE, S.; CHEBROUT, M.; VIARIS DE LESEGNO, C.; CHASTANT-MAILLARD, S. In vivo meiotic resumption,

fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v.130, p.193-201, 2005.

RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 75-93, 1992.

RIEMER, R. K; GOLDFIEN, A. C, GOLDFIEN, A; ROBERTS, J. M. Rabbit uterine oxytocin receptors and in vitro contractile response: abrupt changes at term and the role of eicosanoids. **Endocrinology**, v.119, p. 699-709, 1986.

SCHAFER-SOMI, S; BECERIKLISOY, HB; BUDIK, S; KANCA, H; AKSOY, O.A; POLAT, B; CETIN, Y; AY, S.S; ASLAN, S. Expression of Genes in the Canine Pre-implantation Uterus and Embryo: Implications for an Active Role of the Embryo Before and During Invasion. **Reproduction in Domestic Animals**, 2008

SCHAMS, D; BERISHA, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, n.1, p.53-65, 2002.

SCHULTZ, R.M .From egg to embryo: a peripartetic journey. **Reproduction**, v.130, p. 825–828, p.2005.

SERAFINI, P. Expressão Proteica no endométrio durante a fase lútea do ciclo menstrual (Tese Doutorado) Faculdade de medicina- USP- São Paulo. 93p, 2007.

SMITH, S.D; DUNK, C. E; APLIN, J. D; HARRIS, L.K; JONES, R.L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. **American Journal of Pathology**, v. 174, p. 1959- 595, 2009

SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation system in the domestic dog. **Anim. Reprod. Sci.** v.98, p. 2-22, 2007.

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

SPENCER, T; BECKER, W.C; GEORGE, P; MIRANDO, M.A; OGLE, T.F; BAZER, F.W. Ovine interferon- tau regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. **Biology of reproduction**, v.53, p.732-745, 1995.

SPENCER, T.E; JOHNSON, G.A; BAZER, F.W; BURGHARDT, R.C. Fetal- maternal interaction during the establishment of pregnancy in ruminants. **Society of Reproduction and Fertility**, v.64, p.379-396, 2007

STANTON, J ; MACGREGOR, A.B ; GREEN, D.P. Gene expression in the mouse preimplantation embryo. **Reproduction**, v. 125, p. 457-468, 2003.

STEINETZ, B. F; LAURA, T. G; HASAN, S. H; LUST, G. Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin, ou estradiol-17beta in the pregnant bitch. **Endocrinology**, v.127, p.1057-1063, 1990.

STEWART CL, KASPAR P, BRUNET LJ, BHATT H, GADI I, KONTGEN F. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. **Nature**, v. 359, p. 76 –9, 1992

SOUZA, F.F. Caracterização eletroforetica do perfil proteico e analise bioquimica do plasma seminal canino. 2003. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista-UNESP- FMVZ- Botucatu, 2003. 97 p.

TAN, J; PARIA; B. C; DEY, S. K. Differential uterine expression ofestrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparationfor implantation and decidualization in the mouse. **Endocrinology**, v. 140, p. 5310–5321, 1999

THATCHER M.J; SHILLE, V.M; BUHI W.C; ALVAREZ, I.M; CONCANNON, P.W;THIBEAULT, D, COTTON, M. Canine conceptus appearance and de novo protein synthesis in relation to the time of implantation. **Theriogenology**, v. 41, Issue 8, bp. 1679-1692, 1994.

THOMPSON, J.G. Defining the requirements for bovine embryo culture. **Theriogenology**, v. 45, p. 27-40, 1996.

TIBBETS, T; MENDOZA-MENESES, M; O'MALLEY, B ; CONNEELY. Mutual and Intercompartmental Regulation of Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Expression in the Mouse Uterus. **Biology of Reproduction** November, v. 59, p. 1143-1152, 1998.

TIBOLD, A; THUROCZY, C. Progesterone, Oestradiol, FSH and LH Concentrations in Serum of Progesterone-Treated Pregnant Bitches with Suspected Luteal Insufficiency. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 44, p 129–132, 2009

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl**; v. 339, p. 269-275, 1989.

TSUTSUI, T; SHIMIZU, T; HORI, T; KAWAKAMI, E. Factor affecting transuterine migration of canine embryos. **Theriogenology**, v.12, p.1117-1121, 2002.

TSUTSUI, T; SHIMIZU, T; HORI, T; KAWAKAMI, E. Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy of surgical uterine flushing. **Theriogenology**, v.4, p.401-405, 2001.

ULBRICH, S; KETTLER, A; EINSPANIE, R. Expression and localization of estrogen receptor α , estrogen receptor and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and in vitro. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 84, p. 279–289, 2003

VANDESOMPELE, J; DE PRETER, K; PATTYN, F; POPPE, B; VAN ROY N, DE PAEPE, A; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, 2002

VERMEIRSCH, H; SIMOENS, P; HELLEMANS, A; CORYN M; LAUWERS H. Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 53, p. 773–788. 2000

VERMEIRSCH, H; SIMOENS, P; LAUWERS, H; CORYN, M. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 51, p. 729– 743, 1999.

VERSTEGEN – ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. Endocrinology of pregnancy in the dog: A review. **Theriogenology**, v. 70, p.291-299, 2008.

VOGIAGIS, D., FRY, R.C., SANDEMAN, R.M., SALAMONSEN, L.A., Leukaemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewes. **J. Reprod. Fertil**, v. 109, p. 279–288, 1997.

WATHES, D; HAMON, M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrus cycle and early pregnancy of the ewe. **Journal Endocrinology**, v.138, p.479-491, 1993.

WATSON, A; WESTHUSIN, M; DE SOUSA, P; BETTS, D; BARCROFT, L. Gene expression regulating blastocyst formation. **Theriogenology**, v. 51, issue 1, p.117 – 133, 1999

WATSON, A.J.; BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. **Frontiers in Bioscience**, v. 6, p. 708-730, 2001.

WEST, N.B; BRENNER, R.M. Estrogen receptor levels in the oviducts and endometria of cynomolgus macaques during the menstrual cycle. **Biol Reprod**, v. 29, p. 1303- 12, 1983.

WINTENBERGER-TORRES, S.; FLECHON, J.E. Ultrastructural evolution of the trophoblast cells of the pre-implantation sheep blastocyst from day 8 to day 18. **Journal of Anatomy**, v. 118, p. 143-153, 1974.

WU, T.C; WANG, L; WAN, Y. J. Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 33, p. 407-412, 1992

YAMANAKA, Y; RALSTON, A; STEPHENSON, R; ROSSANT, J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. **Developmental Dynamics** , v.235, p. 2301–2314, 2006

YING, C; YANG, Y; HONG, W; CHENG, W; HSU, W. Progesterone receptor gene expression in preimplantation pig embryos. **European Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 697- 703, 2000.

Progesterone (PR), estrogen (ER- α and ER- β) and oxytocin (OTR) gene expression in the oviduct and uterus of pregnant and nonpregnant bitches

Ana Augusta Pagnano Derussi^{1*}, Rodrigo Wagner Alves de Souza², Rodrigo Volpato¹, Carlos Renato Freitas Guaitolini¹, Camila Louise Ackermann¹, Marilda Onghero Taffarel¹, Guilherme Schiess Cardoso¹, Maeli Dal Pai Silva², Maria Denise Lopes¹

¹ School of Veterinary Medicine and Animal Science- UNESP- Botucatu- São Paulo- Brazil

² Institute of Biosciences- IBB- UNESP-Botucatu- São Paulo- Brazil

Contents

The aim was to assess hormone receptor gene expression in the oviduct and uterus during canine pregnancy. Nineteen pregnant bitches divided into 4 groups were ovariectomized (OVH) at either day 8, 12, 21 or 60 of pregnancy and five non-pregnant females underwent OVH 12 days after the preovulatory LH surge and served as controls. *RT-qPCR* for progesterone (PR), estrogen (ER- α and ER- β) and oxytocin (OTR) receptors was performed on the oviduct and uterine tissue. The mRNA PR expression in the uterus during early stages of pregnancy and the luteal phase were higher than at other times. The mRNA ER- β expression in the oviduct during early pregnancy was less than in non-pregnant bitches. In the uterus the mRNA ER- β expression was higher in the initial stages of pregnancy. The ER α expression was higher in the oviduct and uterus in advanced stages of pregnancy. The mRNA OTR expression in the oviduct was lower

than in the uterus in control group. The expression of this receptor in oviduct and the uterus were higher in the final stages of pregnancy, when compared to other phases. These data suggested that the serum progesterone concentrations probably exert a direct control on the PR and ER (α and β) expression and indirectly on OTR expression in the bitch oviduct and uterus.

Keywords: Progesterone, estrogen, oxytocin, receptor, bitch

INTRODUCTION

The pre-implantation embryonic period corresponds to the migration of the embryo within the oviduct and uterus. During this phase, the interaction between the embryo and endometrium is influenced by progesterone and placental hormones that act in a paracrine manner on the endometrium, promoting the development of the female reproductive tract and causing changes in gene expression that participate in the development of the fetus and maintenance of pregnancy.

The mechanisms of action of these hormones involves interaction with specific receptor proteins present in cells, that lead to activation and transcription of responsive genes to these steroids (Wang et al, 1999), allowing the synthesis of a wide variety of growth factors which participate in endometrial decidual cellular proliferation. Systematic study of gene expression of hormone receptors may clarify some mechanisms that control biological processes involved in early embryonic development. The identification and characterization of gene expression is important for the understanding of crucial events during the peri-implantation period (Cui et al, 2007). The aim of this study was to assess hormone receptor gene expression in the oviduct and uterus during canine pregnancy.

MATERIAL AND METHODS

Animal and collection of tissue

Twenty four healthy mature bitches were assigned to the experiment. Nineteen were inseminated and 5 served as control. Artificial insemination was performed based on monitoring vaginal cytology and progesterone concentration to determine the onset of the preovulatory surge of LH (progesterone range 1 to 1.9 ng/mL) and estimation of the time of ovulation time (progesterone 4 ng / ml). The first insemination was performed between days +1 and +2 after the pre-ovulatory LH surge and the second insemination was performed 48-hour later.

All females underwent ovariectomy (OVH) on predetermined days: Group A (n=5): 8 d after the LH surge, Group B (n=5): 12 d after the LH surge, Group C (n=5): 21 d after the LH surge, Group D (n=4): 60 d after the LH surge. OVH was performed in the non-pregnant females (n=5) 12 days after the LH surge (Group E).

Following OVH the oviduct and uterus were isolated and flushed for the purpose of embryo recovery to determine the gestational age. Sections of the middle portion of uterine horn and oviduct were recovered and stored in 7.5 ml cryogenic tubes and frozen at -80°C.

RNA isolation and RT-qPCR.

Total RNA was extracted using TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Total RNA amounts were determined using a NanoDrop[®] (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Total RNA (2 µg) was treated with Amplification Grade Deoxyribonuclease I (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). The RNA structural integrity was assessed using a bioanalyzer (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) calculating the RNA Integrity Number (RIN); for all samples this was greater than 7 (on a scale of 1–10).

The cDNA was synthesized using a High Capacity cDNA archive kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's protocols. The target and reference gene expression levels were detected by reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) using an ABI 7300 Real Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and were amplified using Power SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Primer pairs for all genes were designed using sequences published in GenBank using Primer Express 3.0 software (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). The expression stability of reference genes Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 18S ribosomal RNA and Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) was assessed through geNorm VBA applet for Microsoft Excel.

Statistical analysis

GrapPad3 (GrapPad Software Inc) was used for statistical analysis. Two tailed paired t-tests were used to examine the results between different tissue types and Anova for analyzing the results of the same tissue type from different groups. Data were expressed as mean $\pm$ SD. Differences were considered significant with a p value of < 0.05 .

RESULTS

The values of mRNA expression of the hormone receptor (PR, ER-B, ER-L OXTR) in the uterus and oviduct in the different groups are shown in Table 1. The PR expression in the oviduct was not different between any of the groups. However the PR expression in the uterus during the early stages of pregnancy (Group A) and nonpregnant bitches (Group E) were higher than in the other stages of pregnancy (Group B, C, D) indicating a change in the PR expression during pregnancy.

The ER- β expression in the oviduct in the early pregnant females was less than in non-pregnant bitches. In the uterus the ER- β expression was higher in the initial phases of pregnancy (group A and B) and in group E. The ER α expression was higher in the oviduct in advanced stages of pregnancy (Group D versus A). Similar results were observed in the uterus.

In the oviduct the OTR expression did not changed during pregnancy but were numerically higher at day 60; expression of OTR in late pregnancy was significantly higher than in the non-pregnant control bitches. In the uterus the OTR expression was different between pregnant and non-pregnant bitches and expression was highest in bitches at day 60 of pregnancy compared with any of the other groups.

Table1. Mean $\pm$ SD mRNA expression of the hormone receptors PR, ER- β , ER- α and OTR in the uterus and oviduct in non-pregnant bitches and bitches at different stages of pregnancy.

Group	A: Pregnant 8 days after LH surge	B: Pregnant 12 days after LH surge	C: Pregnant 21 days after LH surge	D: Pregnant 60 days after LH surge	E: Non-pregnant 12 days after the LH surge
N	5	5	5	4	5
<u>Uterine horn</u>					
PR	1.82 $\pm$ 0.31 ^A	1.1 $\pm$ 0.15 ^B	1.05 $\pm$ 0.29 ^C	0.07 $\pm$ 0.05 ^{AD}	2.12 $\pm$ 0.17 ^{BCD}
ER- β	3.24 $\pm$ 0.24	5.26 $\pm$ 0.31 ^A	3.4 $\pm$ 0.89	0.01 $\pm$ 0.001 ^{AB}	5.2 $\pm$ 1.2 ^B
ER- α	0.33 $\pm$ 0.12 ^A	0.33 $\pm$ 0.12 ^B	0.55 $\pm$ 0.16 ^C	0.94 $\pm$ 0.18 ^{ABCD}	0.41 $\pm$ 0.13 ^D
OTR	0.12 $\pm$ 0.07 ^A	0.14 $\pm$ 0.06 ^B	0.41 $\pm$ 0.29 ^C	1.41 $\pm$ 0.22 ^{ABCD}	0.17 $\pm$ 0.08 ^D
<u>Oviduct</u>					
PR	0.55 $\pm$ 0.29	1.14 $\pm$ 0.73	0.84 $\pm$ 0.26	0.59 $\pm$ 0.08	0.83 $\pm$ 0.32
ER-B	0.07 $\pm$ 0.028 ^A	0.21 $\pm$ 0.096	0.13 $\pm$ 0.051	0.01 $\pm$ 0.002 ^B	0.29 $\pm$ 0.051 ^{AB}
ER- α	0.13 $\pm$ 0.10 ^A	0.19 $\pm$ 0.03 ^B	0.24 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.09 ^{ABC}	0.13 $\pm$ 0.05 ^C
OTR	0.16 $\pm$ 0.19	0.22 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.36	0.49 $\pm$ 0.18 ^A	0.02 $\pm$ 0.01 ^A

Means between columns with a letter in common were significantly different $p < 0.05$.

DISCUSSION

In bitches, progesterone has an important role in the establishment and maintenance of pregnancy, since it prepares the uterine epithelium for receptivity and endometrial and stromal cell differentiation. These changes ensure that embryo development can be supported (Mulac-Jericevic and Conneely, 2004).

Progesterone has a self-regulatory action on the PRs in the endometrium and glandular epithelium. In pregnant and cyclic females PR expression is generally thought to be negatively correlated to plasma progesterone concentrations. In our study we observed similar results, although in oviduct there was no variation in PR expression associated with non-pregnancy or any stage of pregnancy. We believe that this occurred because there is different affinity between the tissues and the receptor; findings that have already been described (Jefferson et al, 2000).

In adult women ERs are expressed in epithelial cell and uterine and vaginal stroma. Estrogen is obligatory for normal epithelial morphogenesis, cyto-differentiation and secretory activity in these tissues (Coke et al, 1998). In our study changes in both ER- α and β within the oviduct and uterus were the opposite to those that have been previously described for ovarian tissue (Hatoya et al, 2003). We believe that this occurred due to the action of progesterone in these tissues. However the ER- α results were similar to those obtained in women, in which ER- α were down-regulated at the time of implantation when progesterone concentrations were greatest (Lessey et al, 2006).

The increase in OTR expression found in the uterus and a lesser degree the oviduct during late pregnancy may be due to the role of this hormone in parturition and lactation (Mitchell *et al.*, 1998) and potentially because progesterone concentrations are basal such that there is no progesterone block (Vermeish et al, 2000).

We conclude that ER (α and β), PR and OTR gene expression differs throughout the various stages of pregnancy, and is largely influenced by concentrations of progesterone at the target tissues.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank FAPESP (Process [2009/50718-0](#)) for financial support.

REFERENCE

Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR, 1998: Mechanism of Estrogen Action: Lessons from the Estrogen Receptor- α Knockout Mouse. *Biol Reprod* **59**, 470–475.

Cui XS, Li XY, Kim NH, 2007: Global gene transcription patterns in in vitro-cultured fertilized embryos and diploid and haploid murine parthenotes. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 709–715.

Hatoya S, Toriib R, Kumagaia D, Sugiura A, Kawatec K, Tamadac N, Sawadac T, 2003: Expression of estrogen receptor α and β genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. *Neurosci Lett* **347**, 131–135.

Jefferson WN, , Couse JF, Banks EP, Korach KS, Newbold RR, 2000: Expression of Estrogen Receptor β Is Developmentally Regulated in Reproductive Tissues of Male and Female Mice. *Biol Reprod* **62**, 310–317

Lessey BA, Palomino WA, Apparao KBC, Young SL, Lininger LA, 2006: Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and defects in uterine receptivity in women. *Reprod Biol Endocrinol* **4**, 1-10.

Mulac-Jericevic B, Conneely OM, 2004: Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* **128**, 139–146.

Vermeirsch H, Simoens P, Lauwers H, 2000: Immunohistochemical Detection of the Estrogen Receptor-a and Progesterone Receptor in the Canine Pregnant Uterus and Placental Labyrinth. *Anat Rec* **260**, 42–50.

Wang H, Masironi B, Eriksson HK, Sahlin L, 1999: A Comparative Study of Estrogen Receptors a and b in the Rat Uterus. *Biol Reprod* **61**, 955–964.

Manuscript Requirements

Format

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing *throughout* and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word), .doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design

should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

Length

Original papers and review articles, including figures, tables and references, should not exceed 5,000 words. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 1,800 words, including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum. Extended data sets can be published online as supplementary material and should be identified as such.

Units, abbreviations and nomenclature

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a **registered** trademark should be marked with ®. When **non-commercially available** substances or reagents are used, the following text must be provided: "[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]"

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

Illustrations and tables

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-

dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the CMYK colour palette (print colours), not RGB (monitor colours). Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour print charges are explained on the Colour Work Agreement Form. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Please direct queries to the Production Editor at rda@wiley.com.

Tables should be created using the table function.

References

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in 1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name and all the authors should be listed.

The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication.

Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumonie der Stewing. Berl Münch Tierärztl Wschr **102**, 6-11.

Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J Vet Med A **35**, 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

Anexos:

Dosagem de P₄ sérica:

A realização da dosagem de P₄ sérica foi realizada concomitantemente com a avaliação citológica (Tabelas 1, 2,3 e 4), auxiliando na determinação do dia da inseminação artificial e estipulação do dia de coleta das estruturas em ambos os grupos.

Tabela 1: Resultados de dosagem de P₄ sérica das fêmeas do **grupo IA** (experimental) e porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal. Botucatu, 2012.

Fêmea	Data de coleta	P ₄ (ng/ml)	% de células superficiais
Fêmea 11	27/1	3,8	84
	29/1	9,510	95
	31/1	22,92	95
	04/2	53,36	22
Fêmea 20	28/03	7,50	100
	30/3	22,04	97
	01/4	49,48	0
	09/4	64,88	0
Fêmea 36	16/7	6,16	100
	18/7	19,42	100
	20/07	39,49	100
	22/07	59,44	100
	24/07	56,08	100
Fêmea 39	01/09	2,89	100
	03/09	2,96	100
	05/09	3,72	100
	07/09	13,44	100
	09/09	22,49	100
	12/09	34,31	12
Fêmea 38	02/08	0,28	25
	04/08	0,22	50
	08/8	2,89	100
	10/8	11,22	100
	16/8	36,44	100

Tabela 2: Resultados da dosagem de P₄ sérica das fêmeas do **grupo I-B (experimental)** e porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal. Botucatu, 2012.

Fêmea	Data de coleta	P ₄ (ng/ml)	% de células superficiais
Fêmea 05	14/11	0,8657	100
	16/11	3,4197	100
	19/11	15,487	100
	21/11	36,200	99
	22/11	79,420	36
	24/11	53,340	23
	26/11	59,700	0
Fêmea 15	04/3	5,6435	100
	06/3	11,617	100
	10/3	42,380	0
	12/3	48,280	0
	16/3	12,873	0
Fêmea 16	04/03	2,54	100
	06/03	14,46	100
	12/3	38,68	100
	16/3	33,891	100
	18/03	33,17	100
Fêmea 22	31/3	0,0902	12
	02/4	0,1423	23
	04/4	0,1576	88
	06/4	0,5087	100
	08/4	1,1243	100
	11/4	7,7229	100
	13/4	30,164	99
	18/4	61,620	0
	20/4	39,662	0
	25/04	26,3	0
Fêmea 37	06/4	0,3	12
	19/4	1,1353	12
	20/4	1,1872	12
	22/4	3,7937	100
	25/4	12,3415	100
	27/4	18,930	100
	29/4	25,690	100
	01/5	25,430	100
	04/5	28,530	100
	09/05	27,14	100

Tabela 3: Resultados da dosagem de P₄ sérica das fêmeas do **grupo I-C** (*experimental*) e porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal. Botucatu, 2012.

Fêmea	Data de coleta	P ₄ (ng/ml)	% de células superficiais
FÊMEA 06	04/01	6,3	100
	06/01	12	100
	08/01	21,59	86
	10/01	36,92	95
	12/01	34,77	2
	14/01	38,2	0
	16/01	38,4	0
	18/01	67,96	0
	20/01	53,68	0
	22/01	52,28	0
	25/01	13,59	0
FÊMEA 07	12/01	0,9	8
	15/01	3,29	100
	17/01	7,595	100
	18/01	20,9	88
	20/01	38,76	22
	22/01	58,76	7
	24/01	35,17	7
	26/01	36,83	0
	28/01	33,37	0
	06/02	13,53	0
FÊMEA 24	16/04	6,3	100
	18/04	8,51	100
	20/04	27,66	86
	22/04	21,95	16
	25/04	29,61	5
	27/01	35,87	0
	29/01	68,22	0
	01/5	39,34	0
	03/05	70,4	0
FÊMEA 23	07/5	18,63	0
	11/04	1,9	67
	13/04	5,48	100
	15/04	17,32	100
	18/04	22,6	100
	20/04	26,96	100
	22/4	27,49	100
	25/4	26,18	100
	27/04	25,92	100
	01/5	25,72	0
FÊMEA 34	04/5	16,7	0
	13/05	0,42	30
	16/05	0,64	34
	18/05	2,99	100
	20/5	7,52	100
	22/05	12,54	100
	31/05	36,72	0
	04/6	39,34	0
	09/6	32,91	0

Tabela 4: Resultados da dosagem de P₄ sérica das fêmeas do **grupo ii** (*controle*)
porcentagem de células superficiais no exame de citologia vaginal. botucatu, 2012.

FÊMEA	DATA DE COLETA	P ₄ (NG/ML)	% DE CÉLULAS SUPERFICIAIS
FÊMEA 01	23/8	1,93	25
	27/8	7,1151	44
	02/9	9,300	7
	06/9	12,231	5
FÊMEA 02	01/9	2,5450	100
	03/9	8,2564	100
	05/9	28,473	100
	07/9	32,276	100
	10/9	26,200	31
FÊMEA 09	26/1	3,00	100
	28/1	8,6439	100
	31/2	30,297	90
	02/2	35,649	100
	05/2	11,2700	100
FÊMEA 10	26/1	1,0836	100
	28/1	1,06925	100
	31/1	4,3951	100
	02/2	8,1625	100
	06/2	12,0165	100
FÊMEA 13	04/2	0,6287	42
	07/2	0,4639	68
	09/2	2,5160	100
	16/2	30,259	90

Tabela 09- Valores referentes à razão entre as medidas espectrofotométricas a 260 e 280 nm das amostras tubáricas do grupo I e II. Botucatu, 2012.

Grupo	Amostra	Razão 260 x 230	Razão 280 X 260	Quantificação
Grupo IA	Tuba- fêmea 11	1,54	1,57	288,2
	Tuba- fêmea 20	2,16	1,98	4378
	Tuba- fêmea 36	1,689	1,933	2921
	Tuba- fêmea 39	2,01	1,89	4836
	Tuba- fêmea 38	1,81	2,02	3340
Grupo IB	Tuba- fêmea 05	1,65	1,94	3312
	Tuba- fêmea 15	1,85	1,88	3428
	Tuba- fêmea 16	1,32	1,95	2654
	Tuba- fêmea 22	1,74	1,87	1323
	Tuba- fêmea 37	1,9	1,91	1170
Grupo IC	Tuba- fêmea 06	0,64	1,71	218,4
	Tuba- fêmea 07	1,04	1,92	387,6
	Tuba- fêmea 24	1,83	1,94	2076
	Tuba- fêmea 23	1,2	1,85	480,4
	Tuba- fêmea 34	1,43	1,87	2591
Grupo II	Tuba- fêmea 01	2,13	1,96	1902
	Tuba- fêmea 02	1,87	1,83	1332
	Tuba- fêmea 09	1,71	1,89	638,4
	Tuba- fêmea 10	0,99	1,42	621,6
	Tuba- fêmea 13	0,87	1,86	1003,2

Tabela 10- Valores referentes à razão entre as medidas espectrofotométricas a 260 e 280 nm das amostras uterinas do grupo I e II. Botucatu, 2012.

Grupo	Amostra	Razão 260 x 230	Razão 280 X 260	Quantificação
Grupo IA	Útero- fêmea 11	1,10	1,88	5820
	Útero- fêmea 20	0,98	1,35	4490
	Útero- fêmea 36	1,74	1,59	4514
	Útero- fêmea 39	0,95	1,18	6660
	Útero- fêmea 38	1,8	1,88	6792
Grupo IB	Útero- fêmea 05	1,44	1,93	8442
	Útero- fêmea 15	1,64	1,96	2218,8
	Útero- fêmea 16	1,21	1,95	6567
	Útero- fêmea 22	1,15	1,21	765,2
	Útero- fêmea 37	1,83	1,94	3144
Grupo IC	Útero- fêmea 06	1,23	1,77	4029
	Útero- fêmea 07	1,22	1,9	2332
	Útero- fêmea 24	1,83	1,94	4382
	Útero- fêmea 23	1,2	1,85	480,4
	Útero- fêmea 34	2,74	1,96	4508
	Vesícula- fêmea 06	1,59	1,7	8096
	Vesícula- fêmea 07	1,698	1,849	686,8
	Vesícula- fêmea 24	2,21	1,89	356
	Vesícula- fêmea 23	1,19	1,71	4581
	Vesícula- fêmea 34	1,46	1,6	4658
Grupo II	Útero- fêmea 01	1,43	1,94	4602
	Útero- fêmea 02	1,18	1,92	2529,6
	Útero- fêmea 09	1,76	1,92	3462
	Útero- fêmea 10	1,44	1,94	2917,2
	Útero- fêmea 13	0,55	1,86	2620

Tabela 13- Análise qualitativa da integridade do RNA (RNA Integrity Number, RIN) das amostras de tubas, útero e vesículas embrionárias (tabela 16). Botucatu, 2012.

Grupo	Amostra	RIN
Grupo IA	Tuba- fêmea 11	6,4
	Tuba- fêmea 20	6,6
	Tuba- fêmea 36	6,0
	Tuba- fêmea 39	7,1
	Tuba- fêmea 38	N/A
	Útero- fêmea 11	6,0
	Útero- fêmea 20	6,2
	Útero- fêmea 36	7
	Útero- fêmea 39	6,7
	Útero- fêmea 38	7,1
Grupo IB	Tuba- fêmea 05	7,5
	Tuba- fêmea 15	7,6
	Tuba- fêmea 16	7,5
	Tuba- fêmea 22	7,9
	Tuba- fêmea 37	7,1
	Útero- fêmea 05	8,1
	Útero- fêmea 15	7,0
	Útero- fêmea 16	6,6
	Útero- fêmea 22	6,7
	Útero- fêmea 37	7,7
Grupo IC	Tuba- fêmea 06	6,6
	Tuba- fêmea 07	7,3
	Tuba- fêmea 24	8
	Tuba- fêmea 23	7,4
	Tuba- fêmea 34	7,5
	Útero- fêmea 06	6,3
	Útero- fêmea 07	8,5
	Útero- fêmea 24	6,0
	Útero- fêmea 23	6,4
	Útero- fêmea 34	6,3

	Vesícula- fêmea 06	7,0
	Vesícula- fêmea 07	7,3
	Vesícula- fêmea 24	6,0
	Vesícula- fêmea 23	6,9
	Vesícula- fêmea 34	N/A
Grupo II	Tuba- fêmea 02	6,7
	Tuba- fêmea 09	6,5
	Tuba- fêmea 10	7,5
	Tuba- fêmea 13	7,8
	Tuba- fêmea 01	6,9
	Útero- fêmea 01	6,9
	Útero- fêmea 02	7,2
	Útero- fêmea 09	6,7
	Útero- fêmea 10	7,3
	Útero- fêmea 13	7,2