

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA.

**DINÂMICA DOS FATORES ANGIOGÊNICOS EM CORPOS LÚTEOS DE
CADELAS GESTANTES E PSEUDOGESTANTES**

ANDERSON ALVES RIBEIRO

Botucatu - SP
Novembro / 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ÁJULIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA
VETERINÁRIA.

**DINÂMICA DOS FATORES ANGIOGÊNICOS EM CORPOS LÚTEOS DE
CADELAS GESTANTES E PSEUDOGESTANTES**

ANDERSON ALVES RIBEIRO

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista ÁJúlio de
Mesquita Filho Campus de Botucatu,
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia Animal.

Orientadora: Prof. Maria Denise Lopes

Botucatu ã SP

Novembro / 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ribeiro, Anderson Alves.

Dinâmica dos fatores angiogênicos em corpos lúteos de
cadela gestantes e pseudogestantes / Anderson Alves
Ribeiro. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Maria Denise Lopes

Capes: 50504002

1. Neovascularização. 2. Corpo lúteo. 3. Gravidez. 4.
Diestro. 5. Cães.

Palavras-chave: angiogênese; cadela; corpo lúteo; diestro;
gestação.

Nome do autor: Anderson Alves Ribeiro

Título: **DINÂMICA DOS FATORES ANGIOGÊNICOS EM CORPOS LÚTEOS
DE CADELAS GESTANTES E PSEUDOGESTANTES**

BANCA EXAMINADORA

Professora Maria Denise Lopes

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP
Botucatu-SP

Professor João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro Titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP
Botucatu-SP

Professora Ana Augusta PagnanoDerussi

Membro Titular

Professora e Pesquisadora na área de Reprodução de Pequenos Animais da
Universidade José do Rosário Velano - Unifenas, Alfenas, MG.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a Ana Augusta Pagnano Derussi por colaborar integralmente no desenvolvimento da pesquisa, desde a coleta das amostras até o processamento no laboratório, bem como pelo contato do intercâmbio na instituição no Canadá. Seu auxílio foi imprescindível para a conclusão desse trabalho.

Agradeço muito à minha orientadora Maria Denise Lopes, sempre presente quando precisava e sempre me ajudando, sendo fundamental no desenvolvimento de todo o projeto.

Agradeço ao pessoal que me ajudou na rotina laboratorial, sem eles não haveria atingido meus objetivos. Em especial, Paula Paccielli Freire que contribuiu muito para o meu aprendizado na técnica de PCR e a Professora Maeli Dal Pai pela utilização do laboratório do Departamento de Morfologia do IB ã UNESP Botucatu. Agradeço também à Marie-Charlotte Meinsohn que me auxiliou constantemente na rotina laboratorial das imunofluorescências durante meu período de intercâmbio, além do Professor Bruce Daniel Murphy pelo acolhimento em seu laboratório na Universidade de Montreal.

Agradeço também a FAPESP pelo financiamento do projeto no país e no período de intercâmbio.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	3
1 - Introdução	4
2 - Revisão de Literatura	7
2.1 ã Ciclo estral	7
2.2 ã Luteogênese	10
2.3 ã Reconhecimento Materno da Gestação em Cadelas	15
2.4 ã Luteólise	18
3 ã Considerações Finais	23
4 ã Objetivos	25
5 ã Referências	26
CAPÍTULO 2	32
1 ã Introdução	34
2 ã Materias e Métodos	35
2.1 ã Animais	35
2.2 ã Estimativa do momento de ovulação	35
2.3 ã Citologia Vaginal	35
2.4 ã Dosagem de Progesterona Sérica.....	36
2.5 ã Protocolo de Inseminação Artificial.....	36
2.6 ã Ovariosalpingohisterectomia.....	36
2.7 ã Divisão dos grupos experimentais.....	36
2.8 ã Contatação da gestação	37
2.9 ã Coleta dos ovários	38
2.10 ã qRT-PCR	38
2.11 ã Imunofluorescência.....	41
2.12 ã Análise Estatística	42
3 ã Resultados.....	43
3.1 ã qRT ã PCR	43
3.2 ã Imunofluorescência	46
4 ã Discussão	53
5 ã Conclusões	55
6 ã Agradecimentos	56

7 ã Referências	56
-----------------------	----

RESUMO

RIBEIRO, A.A. (2018) **Dinâmica dos fatores angiogênicos em corpos lúteos de cadelas gestantes e pseudogestantes**. Botucatu - SP. 2018, 59p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

O objetivo desse estudo é obter conhecimentos mais profundos sobre os mecanismos regulatórios da manutenção e principalmente do término da função lútea em cadelas gestantes e não gestantes. O perfil de P4 é muito semelhante em cadelas gestantes e não gestantes, porém começa a divergir aproximadamente no dia 60 da fase lútea. Nesse momento, evidencia-se um declínio abrupto de P4 nas cadelas gestantes, sinalizando a luteólise pré-parto, com aumento da PGF2 α e grande atividade apoptótica no interior do corpo lúteo (CL). Diferente do mecanismo de cadelas não gestantes, em que a regressão lútea é passiva e pré-programada. No presente trabalho foi validada a expressão dos seguintes fatores angiogênicos - VEGFA, IGFBP5, Endotelina, THBS2 e TGFB1 em CLs de cadelas cíclicas e gestantes. Para tal, foi realizado o acompanhamento do ciclo estral de fêmeas em diestro cíclico (n=20) e as fêmeas do grupo gestante foram inseminadas artificialmente (n=20). Todas as fêmeas foram submetidas a ovariectomia (OVH) nos dias 10, 20, 40 e 60 após a onda pré-ovulatória de LH. Os CLs coletados foram submetidos às técnicas de qRT-PCR e imunofluorescência. Para análise estatística, aplicou-se o teste t de student, sendo os dados analisados pelo programa GraphPadPrism 6 e considerado significativo quando $p < 0,05$. Os resultados mostraram que os fatores angiogênicos selecionados foram diferencialmente expressos nos dias 40 e 60, especialmente no grupo das cadelas gestantes. Nos outros momentos avaliados não apresentaram diferenças. Os fatores anti-angiogênicos THBS2, TGFB1, VEGFA e IGFBP5 apresentaram acentuada expressão no momento 60 dias de gestação. A endotelina foi mais expressa no dia 60, no grupo das cadelas pseudogestantes. Esses resultados reforçam a hipótese que os mecanismos associados a luteólise são diferentes nas cadelas gestantes e pseudogestantes.

Palavras chave: angiogênese, cadela, corpo lúteo, diestro, gestação

ABSTRACT

RIBEIRO, A.A. (2018) **Dynamics of angiogenic factors in corpora lutea of pregnant and pseudopregnant bitches.** Botucatu - SP. 2018, 59p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

The objective of this study is to obtain a deeper understanding of regulatory mechanisms of maintenance and especially of the end of the luteal function in pregnant and non-pregnant bitches. The profile of P4 is very similar in pregnant and non-pregnant bitches, but it begins to diverge approximately on day 60 of the luteal phase. At this moment, an abrupt decline of P4 is evidenced in the pregnant bitches, signaling the prepartum luteolysis: associated to an increase of the PGF2 α and great apoptotic activity inside the corpus luteum (CL). Differently from non-pregnant bitches, where luteal regression is passive and preprogrammed. In the present work, it was validated the expression of the main angiogenic factors - VEGFA, IGFBP5, Endothelin, THBS2 and TGFB1 in CLs of cyclic and pregnant bitches. For this, the estral cycle of females in cyclic diestrus (n = 20) was monitored and the females of the pregnant group were artificially inseminated (n = 20). All females were submitted to ovariectomy (OVH) on days 10, 20, 40 and 60 after the preovulatory LH surge. The collected CLs were submitted to qRT-PCR and immunofluorescence techniques. For statistical analysis, the student's t-test was applied, the data analyzed by the program GraphPadPrism 6 and it was considered significant when $p < 0.05$. The results showed that the selected angiogenic factors were differentially expressed on days 40 and 60, especially in the group of pregnant bitches. No differences were observed in the other moments evaluated. The anti-angiogenic factors THBS2, TGFB1, VEGFA and IGFBP5 presented marked expression at the time 60 days of gestational diestrus. Endothelin was most expressed on day 60 in the group of pseudopregnants. These results reinforce the hypothesis that the mechanisms associated with luteolysis are different in pregnant and pseudopregnant

Key-words: angiogenesis, bitch, corpus luteum, diestrus, pregnancy

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O cão doméstico é classificado como espécie monoéstrica, politoca e não sazonal, com uma fase de inatividade ovariana obrigatória, entre fases sexuais ativas, denominada anestro. Embora a reprodução dos cães tenha sempre atraído a atenção da comunidade científica, muitas características espécie-específica permanecem a ser esclarecidas. A biologia do corpo lúteo (CL) canino tem sido estudada sob muitos aspectos, desde a fisiologia lútea incluindo o crescimento e manutenção do CL, até os padrões divergentes de regressão gradual e luteólise em cadelas pseudogestantes e gestantes (CONCANNON, 2011, KOWALEWSKI, 2012, PAPA e HOFFMANN, 2012; KOWALEWSKI, et al. 2013; ZATTA et al. 2017).

Nas cadelas o CL se desenvolve dentro da cavidade folicular rompida que libera o *complexo cumulus oocito*, dentro de 12 a 96 horas pós as ovulações (CONCANNON, 2011). Nos cães o número de ovulações varia e depende da raça e do porte do animal, com raças menores ovulando poucos oócitos e raças maiores ovulando de 5 a 15 oócitos. Os folículos ovulados se organizam e rapidamente se luteinizam, resultando em um aumento da capacidade esteroidogênica durante a fase lútea inicial, manifestada por um rápido aumento dos níveis de progesterona (P4) periférica que atingem as maiores concentrações dentro de 15 a 30 dias após as ovulações. Nesse período, a concentração média de P4 circulante varia entre 30 a 35 ng/mL; em seguida a capacidade esteroidogênica do CL começa a diminuir gradualmente indicando o limite na sua longevidade funcional (KOWALEWSKI, 2012, KOWALEWSKI, et al. 2013).

O CL canino permanece inalterado pela histerectomia, esse fato revela uma vida útil inerente, onde as cadelas não prenhes são independentes de qualquer mecanismo regulatório agudo. Essa vida útil pode durar de 1 a 3 meses até que as concentrações de P4 atinjam níveis basais inferiores a 1ng/mL, indicando por definição o início da fase de anestro do ciclo estral (OKKENS et al. 1985).

Durante a gestação canina a fase lútea determina a duração da prenhez que termina rapidamente cerca de 60 dias após as ovulações, quando a regressão lútea lenta é interrompida por um abrupto declínio de P4, pouco antes do parto, referido como luteólise pré-parto. Essa situação no cão como em outras espécies de mamíferos é um pré-requisito para o parto (KOWALEWSKI, 2017).

De forma geral, nos mamíferos, a P4 é um hormônio indispensável para o estabelecimento e a manutenção da gestação e uma das particularidades mais relevantes na reprodução canina é a ausência da esteroidogênese placentária. Essa característica é única nas cadelas, pois mesmos nas espécies dependentes de P4 do corpo lúteo para a manutenção da gestação, como os suínos e caprinos, isso não ocorre (SHELDRIK et al., 1980; TARRAFe KNIGHT 1995). Consequentemente, o cão é a única espécie doméstica que não depende dos esteróides placentários o que destaca ainda mais, o papel central do CL na regulação da fertilidade canina.

Além disso, a ausência de um fator luteolítico intra ou extra luteal leva a uma relação inversa entre a duração do corpo lúteo gestacional e a fase lútea estendida em cadelas cíclicas, referidas como pseudogestação, a qual geralmente excede o período de gestação normal (CONCANNON, 1989; HOFFMANN et al., 1992), portanto mecanismos diferentes devem estar envolvidos na regulação da regressão lútea gradual vista em cadelas cíclicas e na luteólise aguda pré-parto observada nas cadelas prenhes.

Comparada com outras espécies, nas quais a ciclicidade ovariana é mantida pela produção periódica de PGF₂U, o cão exibe a forma mais primitiva de controle do CL onde não há relação entre o útero e o controle do CL. Essa diferença ainda é expressa pela ausência de um sinal anti-luteolítico derivado do embrião; a relação entre útero e fator luteolítico é considerada um sistema evolucionário mais avançado entre os animais (KOWALEWSKI, 2017). O cão não apresenta um mecanismo definido de reconhecimento materno de gestação e em ambas as condições gestação e pseudogestação, o trato genital das fêmeas é exposto a um ambiente sensibilizado pela P4 originada do CL.

Uma outra particularidade da fisiologia reprodutiva das fêmeas caninas, relacionada ao suporte luteotrófico, é que durante a segunda metade da fase lútea a prolactina (PRL) e o hormônio luteinizante (LH) são considerados

fatores luteotróficos, mas a regressão lútea/luteólise ocorre a despeito das concentrações elevadas desses hormônios. Da mesma forma não há aumento de estrógeno relacionado a gestação e/ou parto em cães. O papel luteotrófico da P4 é reforçado pela aplicação de antigestágenos que induzem a uma sinalização útero/placentária resultando sempre em luteólise pré-termo ou aborto.

Também nos cães o conhecimento acerca do envolvimento do sistema imunológico no controle da função lútea é restrita a observações mostrando uma invasão tempo dependente das células imunes no CL de cadelas não gestantes (HOFFMANN e al. 2004b); estudos realizados por Nowaczyk et al. (2017) investigaram a presença de CD4, CD8, MHCII e endogлина em cadelas gestantes na fase de pré-implantação até a luteólise pré-parto; uma expressão tempo dependente de CD4, CD8 e endogлина foi fortemente relacionada com a formação do CL, enquanto o MHCII foi induzido somente durante a luteólise.

A definição do termo reconhecimento materno da gestação foi originalmente usado por Roger (1969) para descrever estratégias observadas em diferentes espécies para prevenir a luteólise e manter a sobrevivência do corpo lúteo (CL), além da atividade cíclica; entretanto, esse termo parece não se aplicar a espécie canina na qual a duração da fase lútea é semelhante em animais gestantes e não gestantes. Uma definição mais geral parece ser mais adequada para a espécie canina para designar o reconhecimento materno da gestação: *uma relação morfológica e funcional entre o útero, o embrião e o corpo lúteo que é a fonte de P4 nos cães* (CONCANNON et al. 1989). Segundo Kowalewski et al. (2010) o contato íntimo entre o embrião/feto e o organismo materno após a implantação e placentação é a condição mais importante para a manutenção da gestação nos cães.

Portanto mecanismos regulatórios que controlam a sobrevivência do CL e especialmente o término da função do CL em cadelas gestantes e não gestantes permanecem ainda sem elucidação. O objetivo dessa revisão é obter *insights* mais profundo sobre os mecanismos regulatórios da manutenção e principalmente do término da função lútea em cadelas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nos cães a função ovariana parece ser minimamente evoluída representando um modelo básico de reprodução entre os mamíferos. Os cães são classificados como monoestricos, não sazonais; são ovuladores espontâneos, ovulam uma única vez em cada estação de cobertura e apresentam períodos de atividade sexual separados por períodos obrigatórios de inatividade sexual, referidos como anestro, que podem durar de 11 até 36 semanas (OKKENS e KOOISTRA, 2006; CONCANNON, 2011). Em consequência dessas particularidades fisiológicas, as cadelas apresentam poucos períodos de estro e um pequeno número de gestações durante sua vida reprodutiva, fornecendo poucas possibilidades de pesquisas sobre os mecanismos espécie-específicos que regulam o padrão reprodutivo nessa espécie.

A progesterona (P4) é indispensável para o sucesso da gestação em cadelas, sua produção é continuamente requerida para o estabelecimento e manutenção da gestação, já que não há atividade esteirodogenética associada a placenta. Essa condição reforça o papel central do CL na manutenção da gestação (KOWALEWSKI et al. 2015).

2.1 Ciclo Estral

Nas cadelas, os ovários estão localizados na cavidade abdominal caudalmente aos rins e no interior da bursa ovárica, que é um prolongamento do peritônio recoberto por tecido adiposo. O principal suprimento sanguíneo do ovário é proveniente de um ramo da aorta: a artéria ovariana. Como um suprimento auxiliar de sangue arterial aos ovários ocorre à anastomose da artéria uterina com a ovariana (JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN e NELSON, 2004).

A estrutura ovariana é constituída de uma porção medular onde estão localizados os vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo e da porção cortical onde se localizam as estruturas mais nobres do ovário: os folículos ovarianos e os corpos lúteos. O ovário é revestido externamente por

um epitélio germinativo e mais internamente pela túnica albugínea e o estroma ovariano (JOHNSTON et al., 2001).

Os ovários exercem várias funções, entre elas a gametogênese (produção cíclica de gametas) e a esteroidogênese (produção de hormônios sexuais); o estrógeno é produzido pela parede dos folículos em crescimento e a progesterona é produzida pelo corpo lúteo (CHRISTIANSEN, 1998; JOHNSTON et al.; 2001).

A fêmea canina apresenta a puberdade, ou seja, o período em que atinge a capacidade de reprodução com idade entre seis e 10 meses em raças pequenas e aproximadamente aos 24 meses em raças de grande porte. O ciclo reprodutivo da cadela pode ser dividido em quatro fases: proestro, estro, diestro e anestro (CHRISTIANSEN, 1998; JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN e NELSON, 2004).

O proestro é a fase na qual ocorrem alterações externas que demonstram a eminência de estro. Observa-se nessa fase, edema vaginal com secreção sanguinolenta e a fêmea atrai os machos, mas não aceita a cópula. O proestro tem duração média de 9 dias, variando entre 3 e 16 dias (CHRISTIANSEN, 1998; JOHNSTON et al.; 2001). Na endocrinologia canina o proestro tem como característica uma concentração basal de progesterona e uma elevação da concentração sérica de estradiol que decresce a partir do momento que a fêmea passa a ser receptiva a monta. Na citologia vaginal do proestro ocorre um predomínio de células intermediárias (JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN e NELSON, 2004).

O estro é a fase em que a fêmea está receptiva ao macho, mas com edema de vulva menos evidente do que na fase anterior e duração aproximada de 7 a 9 dias, com variação de 4 a 24 dias. O estro também é identificado pela citologia vaginal, na qual é verificada uma porcentagem superior ou igual a 80% de células superficiais. A cadela se apresenta como a única espécie que demonstra o comportamento de estro mesmo com a elevada concentração de progesterona (JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN e NELSON, 2004; CONCANNON, 2011).

A onda pré-ovulatória de LH é o resultado de uma diminuição dos níveis de E2 e um aumento nas concentrações de P4 provocando um *feedback* positivo no hipotálamo e hipófise com consequente liberação de LH e ovulação.

A onda pré-ovulatória de LH ocorre cerca de 0,5 a 3 dias (média de 1 ou 2 dias) após o pico de E2 e dura cerca de 1 a 3 dias provocando a ovulação cerca de 48 a 60 horas após seu início (Fig. 1). O tempo entre o pico de LH e as ovulações é caracterizado por uma proliferação rápida das células da teca e emergência de uma vasta rede vascular; em consequência, as células foliculares que se luteinizam são capazes de produzir quantidades consideráveis de P4 (5ng/mL), no momento das ovulações (CONCANNON, 2011).

As modificações morfológicas que ocorrem nos folículos associadas as ovulações e início da formação dos CLs em cães foi descrita inicialmente por Bischoff (1845) que descreveu estruturas semelhantes a tecido lúteo com proliferações e dobras nos folículos pré-ovulatórios. Atualmente, essas modificações tem sido associadas com altas concentrações de prostaglandina E2 e F2 alfa nos CLs em formação.

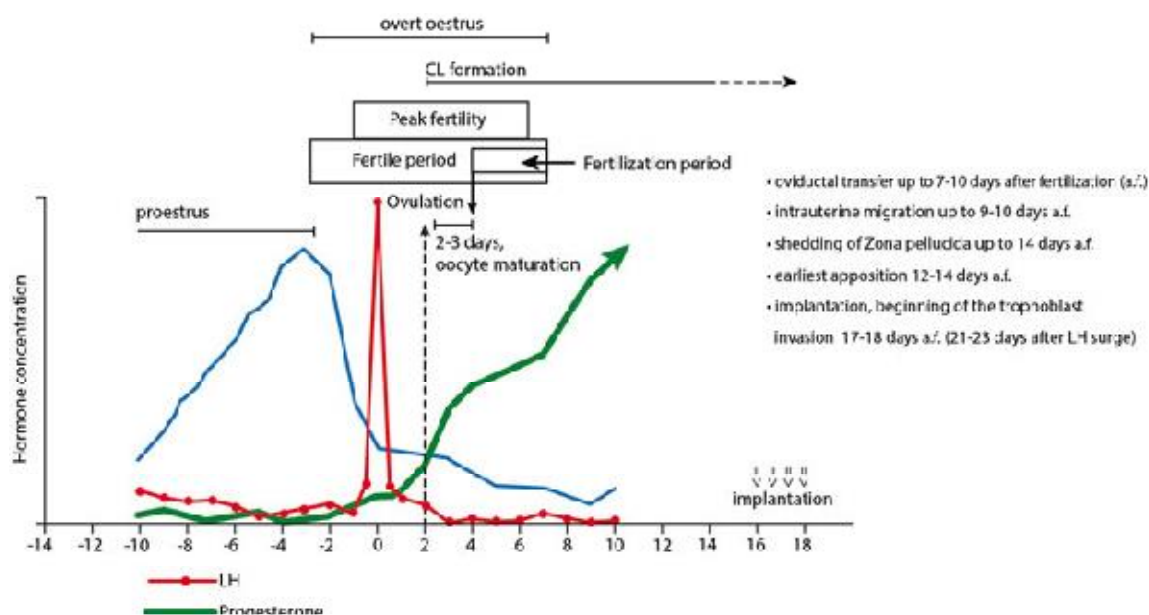


Figura 1: Controle endócrino do ciclo estral de cães, adaptado de Kowalewski. (2017)

O desenvolvimento estrutural do CL continua após a ovulação, antes do término do estro. Nesse momento o CL já se encontra funcional e morfológicamente formado e as fêmeas entram numa fase de dominância lútea, denominada diestro. Em termos hormonais o término do estro ocorre quando as concentrações de E2 estão abaixo de 15 ng/mL que correspondem

ao comportamento clínico e citologia vaginal compatível com sensibilização progestacional (CHRISTIANSEN, 1998; CONCANNON, 2011)

As cadelas durante o processo de ovulação liberam oócitos primários, ainda imaturos, que serão fertilizados após 48 a 72 horas, quando se tornarem oócitos secundários. Os oócitos nas cadelas são fecundados nas tubas uterinas e migram para o útero 9 a 10 dias após a ovulação, em estágio de mórula ou blastocisto inicial (JOHNSTON et al., 2001). Em cadelas gestantes a secreção de progesterona se mantém durante os 63/65 dias e em cadelas não gestantes persistem de uma forma similar, com variação de 50 a 80 dias (AIUDI et al., 2006).

O anestro é a fase em que não existe atividade ovariana e tem duração aproximada de 4 meses. A concentração de LH durante o anestro é pulsátil até a ocorrência do próximo proestro e os níveis de FSH aumentam durante a evolução do anestro. Durante toda essa fase a concentração de progesterona se mantém em níveis basais. Na citologia vaginal do anestro existe o predomínio de células parabasais (CHRISTIANSEN, 1998; JOHNSTON et al.; 2001; FELDMAN e NELSON, 2004).

2.2 Luteogênese

A biologia do CL canino tem sido estudada sob muitos aspectos, desde a fisiologia lútea incluindo o crescimento e manutenção do CL, até os padrões divergentes de regressão gradual e luteólise em cadelas gestantes e pseudogestantes (CONCANNON, 2011, KOWALEWSKI, 2012, PAPA e HOFFMANN, 2012; KOWALEWSKI, et al. 2013).

O conhecimento existente em relação à formação do CL provém em sua maioria de estudos realizados com grandes e pequenos ruminantes e servem de base para as demais espécies, no entanto, diferentemente dos ruminantes, o processo de luteinização na cadela ocorre ainda na fase pré-ovulatória (CONCANNON e VERSTEGEN, 2005).

Nas cadelas, o processo de luteinização se inicia antes mesmo das ovulações devido a uma mudança nos receptores de gonadotrofina presentes nos folículos ovarianos. Inicialmente é observada uma luteinização de menor

importância, mas morfológicamente e endocrinologicamente detectável, que ocorre em pequenos pontos no interior da parede folicular, da metade para o final do proestro. Este período corresponde a 2 ou 3 dias anteriores à onda pré-ovulatória de LH, resultando em um aumento mínimo de P4 sérica, de concentrações não detectáveis para valores próximos de 0,4 a 0,8 ng/mL (CONCANNON e VERSTEGEN, 2005).

Secundariamente há uma luteinização pré-ovulatória mais notável, que ocorre entre o surgimento da onda pré-ovulatória de LH até 3 dias após. Nesse momento, o nível de P4 encontra-se mais elevado (1,0 a 3,0 ng/ml) e pode ser correlacionado ao surgimento da onda pré-ovulatória, que ocorre aproximadamente 2 dias antes do processo de ovulação (CONCANNON e VERSTEGEN, 2005; CONCANNON, 2011). Nesse tipo de luteinização, as células proliferam-se rapidamente na periferia dos folículos pré-ovulatórios e os níveis de P4 sérica podem atingir de 5,0 a 9,0 ng/ml, período correspondente às ovulações. A luteinização pré-ovulatória não ocorre apenas nos cães, é observada também nos suínos, roedores e primatas, porém em menor intensidade (CONCANNON, 2011).

Após as ovulações, nos ruminantes, o espaço anteriormente ocupado pelo oócito é invadido por células endoteliais, do sistema imune e pelas células da teca interna e da granulosa que sofrem hiperplasia e hipertrofia. Esse aglomerado celular é denominado primeiramente de corpo hemorrágico. As células foliculares que originam o corpo lúteo sofrem influência de diversos fatores, principalmente das gonadotrofinas, fatores angiogênicos e mitogênicos como o fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento semelhante à insulina, fator de crescimento semelhante à heparina e fator de crescimento endotelial vascular entre outros, para se transformarem em células lúteas. As organelas, substratos e enzimas contidas nas células lúteas do CL irão determinar sua capacidade em sintetizar P4 (BERTAN et al, 2006; SALLES e ARAÚJO, 2010).

As células lúteas na maioria das espécies são classificadas em pequenas, as quais se originam das células da teca interna, e grandes, as quais são originadas das células da granulosa. As células pequenas possuem altas concentrações de receptores para LH e secretam estradiol e baixas concentrações de progesterona e representam 20% a 30% do volume total das

células que formam o corpo lúteo. Já as células grandes secretam a maior parte de progesterona e ocupam 70% do volume do corpo lúteo (SALLES e ARAÚJO, 2010). Na espécie canina, no entanto, é descrito que as células lúteas grandes e pequenas se diferem pouco, assim como nos roedores. As células esteroidogênicas em cadelas se assemelham com as células grandes em ruminantes, com elevado conteúdo mitocondrial (CONCANNON, 2012).

O CL também é formado por células não esteroidogênicas, tais como fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imune (macrófagos e linfócitos T) (WEBB et al., 2002).

Derrusi et al. (2017), não publicado, realizaram um estudo sobre a caracterização histológica e ultraestrutural de células lúteas em corpos lúteos de cadelas na fase inicial do diestro gestacional e cíclico e evidenciaram uma acentuada semelhança no padrão morfológico das células lúteas. As amostras histológicas apresentaram células contendo vacúolos, núcleo central e nucléolo bem evidente. Em relação à análise ultraestrutural foi possível observar que as células lúteas apresentavam tamanhos diversos e diferentes formas: arredondadas, alongadas, ovaladas e poliédricas. Os núcleos eram grandes e na sua maioria centralizados. Os citoplasmas eram de tamanhos variados e foram observados corpúsculos intracitoplasmáticos densos e de contornos irregulares. Organelas esparsas como mitocôndrias, ribossomos e cisternas de retículo endoplasmático liso e rugoso foram visualizados. As análises realizadas não constataram diferenças entre as células lúteas provenientes de CLs de cadelas gestantes e não gestantes; em ambas as situações foram observadas células lúteas de tamanhos diferentes.

De acordo com Papa et al.(2014), o início da fase lútea, após a ovulação, é caracterizado por uma intensa atividade proliferativa e vascular resultante pelo menos em parte, de um mecanismo de hipóxia, associada com uma infiltração aumentada de células imunológicas, gerando um aumento contínuo e cumulativo da atividade esteroidogênica; essa situação se reflete numa expressão elevada proteína esteroidogênica regulatória aguda (STAR) e da 3 β -hidroxiesteróide Δ^5 desidrogenase (3 β -HSD). Durante esse período, o CL é responsável por fornecer P4 requerida para o preparo do útero para a implantação embrionária. Durante a implantação, que nos cães ocorre

aproximadamente entre os dias 17/18 pós cobertura, o CL já está bem desenvolvido atingindo um estado de maturidade caracterizado por atividade esteroidogênica máxima (20 a 25 dias pós-ovulação); nessa fase tanto a P4 como o E2 são considerados fatores luteotróficos e agem por intermédios de seus receptores.

Após a ovulação, as células remanescentes da teca e da granulosa do folículo ovulatório, que até então sintetizavam estradiol, são reorganizadas para formarem o CL e sintetizarem P4. Para tal mudança de especialidade, ocorre uma diminuição na expressão da enzima P450aromatase, que converte a androstenediona em estradiol. Tal mudança determina o início da luteinização das células da teca e da granulosa. Entretanto, para que a P4 seja sintetizada em grande quantidade, além da diferenciação celular, necessariamente deverá ocorrer um aumento na expressão das enzimas necessárias para a conversão do colesterol em P4 e das proteínas transportadoras de colesterol (STAR) para o interior da membrana mitocondrial (NISWENDER,1994). O colesterol transportado para membrana mitocondrial interna interage com a enzima P450scc que o cliva, transformando-o em pregnenolona. Este precursor é transportado para o retículo endoplasmático liso e, por ação da enzima 3 β -HSD é convertido em P4. Assim, a produção de P4 no CL é caracterizada por um aumento na expressão das enzimas que convertem o colesterol em P4 (P-450scc e 3 β -HSD) e por um decréscimo na expressão das enzimas que convertem P4 em estrógeno (P450 17 β -hidroxilase e P450aromatase) (BERTAN et al, 2006).

Embora a PRL e o LH sejam considerados fatores luteotróficos nos cães, com a PRL sendo a luteotrofina predominante, esses fatores agem por volta do 25º dia após o pico de LH; durante essa fase, o CL passa por um período de transição independente de gonadotrofina e a prostaglandina produzida localmente (intra CL), especialmente a PGE2 parece ser o fator luteotrófico mais relevante (KOWALEWSKI et al.2006, 2008, 2009). O desenvolvimento do CL nesse período, está associado com conteúdo aumentado de PGE2 e baixo de PGF2 α (KOWALEWSKI et al. 2014).

O papel luteotrófico da PGE, produzida localmente no CL, tem sido questionado nos cães. Acredita-se que PGE2 controle o fornecimento de P4 levando subsequentemente a supressão funcional da esteroidogênese, até a

luteólise, desempenhando também um importante papel na segunda metade do diestro. A PGE2 parece estar envolvida indiretamente com a função luteotrófica da PRL, estimulando a expressão de seu receptor. O LH parece também não estimular a secreção de P4 diretamente, especialmente na fase lútea tardia, mas sim atuar no aumento de concentrações de prolactina, tendo, portanto, um papel indireto na regulação da função lútea (KOWALEWSKI et al., 2011). De acordo com Kowalewski (2014) esse mecanismo regulatório é novo e ainda não está completamente descrito para espécies dependentes de LH para a manutenção lútea como os ruminantes e suínos.

A única fonte de progesterona durante a gestação nas fêmeas caninas é o corpo lúteo. Após 15 a 30 dias da onda pré-ovulatória de LH a secreção de progesterona pelo CL atinge uma concentração máxima em torno de 15 a 80 ng/mL, com uma variação individual grande (CONCANNON et al., 1989; CONCANNON, 2011). A partir desse ponto uma regressão gradual torna-se óbvia e os níveis de P4 diminuem lentamente (HOFFMANN et al., 1992; JOHNSTON et al., 2001). Após a implantação e formação da placenta os níveis médios de P4 tendem a ser numericamente, mas não estatisticamente mais alto nas cadelas gestantes, excluindo o uso da P4 como marcador externo da gestação. Essa divergência numérica nos níveis de P4 entre fêmeas gestantes e não gestantes na segunda metade da gestação é provavelmente resultado de uma concentração mais elevada de prolactina (PRL) nas cadelas gestantes. Nesse contexto é importante considerar que as variações individuais de prolactina durante a pseudogestação, semelhante a P4, impedem a utilização da prolactina como um marcador endócrino da gestação (KOWALEWSKI, 2017).

Quando cadelas prenhes são submetidas à ovariectomia ocorre a reabsorção ou abortamento dos fetos. A placenta da cadela pode metabolizar progesterona administrada experimentalmente, mas não é capaz de sintetizar progesterona natural em concentrações elevadas (JOHNSTON et al., 2001; FELDMAN e NELSON, 2004), logo a presença do CL é essencial para a manutenção da gestação. Uma das ações da progesterona observadas tanto em cadelas gestantes quanto em cadelas não gestante é o aumento da glândula mamária. A lactação no final do diestro também pode ocorrer em ambos os casos e tem relação com a queda da concentração sérica de

progesterona e a consequente elevação de prolactina que ocorre no fim do diestro. A queda da progesterona que ocorre na evolução do diestro não tem relação com a queda dos hormônios luteotróficos. As concentrações séricas de LH e prolactina aumentam na fase final do diestro, mostrando que não contribuem para a formação do corpo lúteo. (JOHNSTON et al., 2001).

2.3 Reconhecimento Materno da Gestação em Cadelas

O mecanismo no qual o útero prenhe sinaliza ao CL que o conceito está presente varia desde uma secreção de gonadotrofina coriônica em primatas e equinos, a secreção de fatores luteolíticos nos ruminantes domésticos e a um reflexo neuro-endócrino que modifica o padrão de secreção dos hormônios da adenohipófise na maioria dos roedores (NISWENDER et al. 2000).

O conhecimento exato do processo de maturação oocitária *in vivo*, o tempo do desenvolvimento embrionário é mandatório para o entendimento da fisiologia reprodutiva; nas cadelas o momento em que ocorrem esses eventos são imprecisos devido as diferenças e as dificuldades na identificação dos momentos iniciais dos eventos endócrinos, morfológicos e comportamentais relacionados a ovulação, a onda pré-ovulatória de LH, aos níveis de P4 periférica, a aceitação dos machos e a citologia vaginal. A maturação oocitária, e o reinício da meiose se completam no interior das tubas uterinas nas cadelas, ao contrário dos outros mamíferos, nos quais esses processos ocorrem no interior dos folículos ovarianos; isso complica muito o estudo da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial nos cães (CONCANNON et al. 2001).

A atividade secretória do endométrio e a estimulação da expressão dos genes envolvidos na receptividade uterina em animais cíclicos e/ou gestantes são pelo menos em parte devido a P4, pois indiretamente esse hormônio regula o desenvolvimento embrionário inicial pela manutenção do útero num estágio de receptividade fisiológica. O útero canino é normalmente exposto a concentrações de P4 muito maiores do que aquelas necessárias para a manutenção da gestação, portanto a P4 é predominante, senão o único hormônio necessário para a implantação e placentação nas fêmeas caninas. Não há aumento de E2 durante a gestação nas cadelas e os níveis observados

na segunda metade da gestação não excede aqueles observados antes da ovulação (KOWALEWSKI, 2017).

O cão doméstico parece ser a única espécie animal desprovida de um agente luteolítico ativo na ausência da gestação, exibindo um perfil hormonal semelhante durante a gestação e a pseudogestação; os cães não possuem um mecanismo regulatório que poderia facilitar os eventos reprodutivos que permitissem uma procriação mais rápida, pelo encurtamento dos ciclos não gestantes. Essa situação contrasta com a maioria das espécies domésticas onde a ciclicidade é mantida devido a secreção periódica de PGF2 α . Para o estabelecimento da gestação e prevenção da luteólise, os embriões de ruminantes produzem o *interferon tau* (IFN--) cuja função, entre outras, é o de suprimir a secreção de PGF2 α , inibindo os receptores estrogênicos alfa (ER α) e os receptores de ocitocina (OXTR); em suínos o trofoblasto produz E2 que redireciona a secreção de PGF2 α de exócrina para secreção endócrina prevenindo a luteólise. O cão deve ter algum tipo de mecanismo que facilite a sincronização entre o blastocisto em crescimento e o preparo do útero para dar sequência a gestação, mesmo que esse mecanismo não suprima a luteólise (KOWALEWSKI, 2017).

Alguns estudos argumentaram a favor das características bioquímicas e endócrinas do útero no início da gestação; uma concentração elevada de proteínas de fase aguda foi descoberta na circulação de cadelas gestantes nos dias 28 a 37 pós fertilização o que não ocorreu no sangue de cadelas saudáveis não gestantes. Um aumento dos níveis de relaxina, fibrinogênio e proteína C reativa foram observadas em cadelas prenhes entre os dias 21 e 50 pós onda de LH, entretanto essas proteínas com exceção da relaxina, não são específicas da gestação (KOWALEWSKI et al. 2011)

Estudos estão sendo desenvolvidos para caracterizar a secreção de proteínas sintetizadas durante a gestação: úteros foram coletados durante o diestro gestacional antes dos embriões atingirem o útero e antes da implantação e no diestro cíclico em períodos correspondentes; dois complexos proteicos denominados de Cp5 e Cp6 foram detectados e diferencialmente expressos. Esses complexos proteicos apresentaram diferenças significativas

relacionadas aos dias considerados mas não entre os grupos (gestantes vs cíclicos).

Schafer-Somi et al. (2008) investigaram a expressão de algumas citocinas e fatores de crescimento no início da gestação, período pré-implantação (dia 10 da gestação), e compararam essa expressão com aquelas observadas em cadelas não gestantes em períodos correspondentes. As citocinas mais expressas em fêmeas gestantes foram as CD8, IL4 e RNAm IFN γ , enquanto as citocinas CD4, TNF α e IL6 foram encontradas abundantemente no útero de cadelas cíclicas. No mesmo trabalho transcritos de TGF β , IL2, IL10 e LIF foram identificados apenas nos úteros gestantes. A expressão do FAZ ligante (Faz L) e seu receptor não diferiram entre úteros gestantes e não gestantes (SCHAFFER-SOMI et al. 2008)

Em contraste aos roedores e primatas nos quais a PRL é um dos marcadores mais importantes envolvidos na decidualização, o útero canino não mostra uma intensa capacidade de expressar PRL. Sua expressão foi baixa, sugerindo que o útero não contribui de forma relevante para a circulação de PRL nos cães. Apesar desses resultados Kowalewski et al. (2011) e Kautz et al. (2014) encontraram uma expressão aumentada de receptores da PRL (PRLR) o que poderia compensar a baixa expressão de PRL observada no útero. Os receptores de LH foram reduzidos de forma significativa no útero de cadelas gestantes.

Uma interferência do embrião/feto sobre o organismo materno pode modificar a bioquímica e a morfologia uterina; recentemente estudos sobre as mudanças uterinas influenciadas pelo embrião resultaram em um remodelamento estrutural do útero e formação de uma decídua canina de modo a formar a placenta endoteliocorial característica dessa espécie; há forte indicação que a decidualização é formada pelas células deciduais derivadas do estroma materno. Essas células modificam suas características morfológicas e junto com as células endoteliais dos vasos maternos alteram suas características bioquímicas prevenindo sua invasão pelos trofoblastos fetais. As células deciduais maternas são as únicas células da placenta que expressam os receptores de progesterona (PGR) (KOWALEWSKI et al., 2010); qualquer interferência com essa função protetora, como a aplicação antigestágenos

provoca o aborto/parto prematuro. Isso reforça a importância dessas células no estabelecimento e manutenção da gestação canina.

Os efeitos dos embriões livres sobre o útero foram investigados no início da gestação e alguns marcadores da decidualização foram descobertos: alguns deles foram modulados pela presença dos embriões como os receptores de prolactina (PRLR), receptores de estrogênio alfa (ER α), receptores de estrógeno 1 (ESR1), membros da família VEGF (fator de crescimento endotélio vascular). Fatores do sistema PG foram altamente representados, especialmente a PGE2 *sintetase* (PTGES) e seus dois receptores PTGER2 e PTGR4 ã conhecidos como EP2 e EP4. Além de seus efeitos luteotróficos, a PGE2 parece acelerar a decidualização mediada pela P4 e AMPc em humanos e nos roedores(KOWALEWSKI et al., 2010).

2.4Luteólise

Loeb (1923) foi o primeiro pesquisador a demonstrar a importância do útero no controle da regressão do corpo lúteo, quando relatou que a histerectomia em cobaias interrompia a ciclo estral e causava a persistência do CL (BERTAN et al, 2006). Esses efeitos foram observados posteriormente em várias espécies que possuem útero bicornio, porém a histerectomia em primatas, não tem efeito sobre o ciclo ovariano ou no período de vida do corpo lúteo.

A regressão lenta evidenciada no CL de cadelas após o 25° dia pós ovulação parece ser um processo dinâmico de degeneração celular e remodelamento estrutural. O suporte luteotrófico durante esse período está mais relacionado com a manutenção da função do CL do que com a estimulação da produção de P4. Os primeiros sinais de degeneração estrutural foram observados ultra estruturalmente após o 30° dia das ovulações; o retículo endoplasmático liso das células lúteas exibiu estruturas semelhantes a *turbilhão* junto a periferia das células e por volta do dia 45 pós ovulação apareceram grandes gotas de gorduras no citoplasma sugerindo uma degeneração gordurosa. O número de mitocôndrias diminuiu e o citoplasma

apresentou grandes vacúolos, outro sinal de degeneração. A distância intercelular entre as células lúteas aumentou com acúmulo de tecido conjuntivo.

A densidade da vascularização e a expressão de fatores vasculares e vasoativos diminuíram juntamente com a diminuição da atividade esteroidogênica, como indicado pela redução da expressão da STAR e 3 β -HSD. Além disso, o remodelamento estrutural e proliferação de tecido conjuntivo completaram o processo de redução progressiva da função lútea e formação do corpo *albicans*.

O CL canino permanece inalterado pela histerectomia, esse fato revela uma vida útil inerente, onde as cadelas não prenhes são independentes de qualquer mecanismo regulatório agudo. Essa vida útil pode durar de 1 a 3 meses até que as concentrações de P4 atinjam níveis basais inferiores a 1ng/mL, indicando por definição o início da fase de anestro do ciclo estral (OKKENS et al. 1985; KOWALEWSKI 2012, 2014).

A gestação nas cadelas termina rapidamente cerca de 60/63 dias após as ovulações, quando a regressão lútea lenta é interrompida por um abrupto declínio de P4 pouco antes do parto, referido como luteólise pré-parto. Essa situação no cão como em outras espécies de mamíferos é um pré-requisito para o parto (KOWALEWSKI, 2017). Aproximadamente no dia 60 da fase lútea, o perfil de P4, que até esse momento é semelhante nas cadelas gestantes ou e não gestantes começa a divergir. Nesse momento evidencia-se um declínio abrupto de P4 nas cadelas gestantes, sinalizando a luteólise pré-parto. Essa situação é acompanhada por um aumento nas concentrações de PGF2 α na circulação materna indicando a associação da PGF2 α tanto na luteólise como no parto (KOWALEWSKI et al. 2010; GRAM et al. 2013).

A luteólise ou regressão do corpo lúteo nos bovinos é caracterizada pelo declínio inicial da secreção de progesterona (luteólise funcional) seguido pela mudança da estrutura celular do espaço físico do CL (luteólise estrutural). Ou seja, pela cessação da produção de progesterona e perda dos componentes e da integridade celular (regressão funcional e morfológica), incluindo redução do suprimento vascular, proliferação do tecido conjuntivo, aumento da desorganização celular, degeneração e fagocitose das células lúteas, influxo de cálcio, ativação de endonucleases e morte celular (NISWENDER et al., 2000).

Embora o mecanismo luteolítico agudo nas cadelas gestantes esteja associado com um aumento intenso de PGF₂ no sangue periférico materno poucas informações existem sobre os mecanismos responsáveis por essa produção. Recentes observações sugerem que os mecanismos envolvendo o aumento de PGFS/AKR1C3 (Prostaglandina sintetase F/aldo-ceto redutase C3) não participam desse processo. Coincidente com a viabilidade diminuída da PGFS/AKR1C3 uma expressão aumentada de RNAm/PTGE no momento da luteólise pré-parto sugere uma possibilidade alternativa que é PGF₂ sintética ou seja, aquela que utiliza a PGE2 como substrato para a síntese de PGF₂ (KOWALEWSKI et al. 2010; GRAM et al. 2013).

Como observado nos bovinos a PGE2 poderia servir de substrato para a síntese de PGF₂ devido a atividade da 9-ceto-PGE2 *redutase*. A conversão PGE2/PGF₂ parece ser importante para o início do parto em humanos onde um aumento dessa conversão é um dos mecanismos envolvidos na produção de PGF₂ mediado pelo cortisol nas células fibroblástica do âmnio. Os elevados níveis de cortisol observado no sangue periférico materno não são mandatórios para o parto normal, mas podem refletir o aumento de cortisol no feto nesse momento; pouco se conhece a respeito dos efeitos locais do cortisol na placenta e útero, além disso a atividade aumentada da 9-K-PGR durante a luteólise pré-parto poderia ser um importante mecanismo facilitador da síntese de PGF₂.

Nos cães não há um aumento de E2 associado a gestação; o E2 apresenta um perfil, pelo menos em parte, paralelo ao da P4. Nas cadelas prenhes, diferentes de outras espécies domésticas uma diminuição de E2 é observada durante a luteólise pré-parto. Nenhuma atividade aromatase foi evidenciada na placenta e nenhuma expressão da enzima aromatase foi identificada na placenta canina (HOFFMANN et al., 1994) uma expressão aumentada foi, entretanto, confirmada no CL de cães. Tanto o E2 como a P4 parecem exercer efeitos parácrinos e autócrinos no CL de cadelas; a expressão de seus receptores PGR, ER α /ESR1, ER β /ESR2 foram detectados ao longo da fase lútea em células esteroideogênicas e células não esteroideogênicas (HOFFMANN et al., 2004; PAPA e HOFFMANN, 2011). A expressão de glicocorticoide na placenta é elevada nos cães durante a luteólise pré parto, mas não em resposta ao tratamento de antigestágenos quando

administrado na metade da gestação, isto sugere que o cortisol pode estar envolvido com a queda de P4 no momento do parto fisiológico, lembrando o mecanismo de parto na mulher, portanto, além da P4 ser divergente em fêmeas gestantes e pseudogestantes, também o E2 e o padrão de secreção de cortisol indicam mecanismos regulatórios distintos associados ao término da função lútea e início do parto em cadelas.

Adicionalmente, as ações combinadas entre a PGF2 α , a liberação de ocitocina local, a liberação de endotelina (ET), podem levar a vasoconstrição, isquemia, quimiotaxia de células imunológicas e a seguir uma redução dos níveis de progesterona. Esta hipóxia e isquemia levam não somente a diminuição da secreção de progesterona, mas também a apoptose das células não lúteas, primeiramente as células endoteliais, depois parênquimas e por último os fibroblastos (PATÊ e KEYES, 2001).

Nas cadelas não gestantes todas as alterações descritas anteriormente ocorrem na ausência de eventos apoptóticos, que são observados esporadicamente sugerindo que a regressão lútea é passiva, pré-programada; essa situação é exatamente ao contrário do que ocorre nas cadelas gestantes onde a luteólise pré-parto é associada a um aumento da PGF2 α e grande atividade apoptótica no interior do CL. Essa atividade apoptótica nas fêmeas gestantes pode ser vista microscopicamente e por forte expressão da atividade das caspases (HOFFMANN et al. 2004; KOWALEWSKI, 2014).

O processo de morte celular que ocorre na luteólise parece estar relacionado com a morte celular programada ou apoptose e se refere a um processo fisiológico ativo, que requer energia e implica em trocas bioquímicas e morfológicas nas células (PATE, 1994), no entanto, um aspecto intrigante nas cadelas é a vida útil média do corpo lúteo cíclico ser superior ao do CL gestacional (CONCANNON e DIGREGÓRIO, 1986), esse fato pode ser sugestivo de que o processo de luteólise ocorra de forma distinta.

A necrose ao contrário da apoptose, é um tipo de morte na qual as células sofrem um insulto que resulta no aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Durante a necrose, o conteúdo celular é liberado, causando danos às células vizinhas e uma reação inflamatória no local. É considerada uma resposta passiva à injúria celular,

entretanto estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser regulada geneticamente (CONCANNON e DIGREGÓRIO, 1986).

Em trabalho realizado por Derussi et al, (2018) com o objetivo de investigar o mecanismo de morte celular (apoptose/necrose) em células lúteas cíclicas e gestacionais caninas, nos dias 40 e 60 pós cultivo celular, constatou-se que as células lúteas das cadelas em diestro cíclico apresentaram-se em uma fase classificada como de parada de crescimento no 40º dia pós ovulação, apresentando apoptose apenas no 60º dia. O grupo gestante apresentou células lúteas em apoptose tanto no 40º como no 60º dia, sugerindo que a morte celular por apoptose se inicia antes no diestro gestacional.

Um indicativo de apoptose é a ruptura do DNA com formação de oligonucleossomas, estruturas identificadas durante a luteólise induzida pela PGF₂ (PATE, 1994). Nesse processo, as células iniciam um mecanismo de autodestruição em resposta a um sinal (MARTINS et al., 2007) que pode ser a falta de suporte trófico de uma grande variedade de estímulos levando à luteólise pelos seguintes mecanismos sequenciais: (1) fagocitose pelos macrófagos das células luteínicas em apoptose, (2) liberação das citocinas e TNF e (3) alteração química de monócitos/macrófagos, acompanhada de aumento da atividade lisossômica, de metaloproteinases que levam à degradação estrutural das células lúteas transformando-as em componentes estranhos ao organismo (SALLES e ARAÚJO, 2010). Representação esquemática dos mecanismos hormonais regulando a função lútea durante a gestação de cadelas prenhes e pseudoprenhes encontram-se na fig.2.

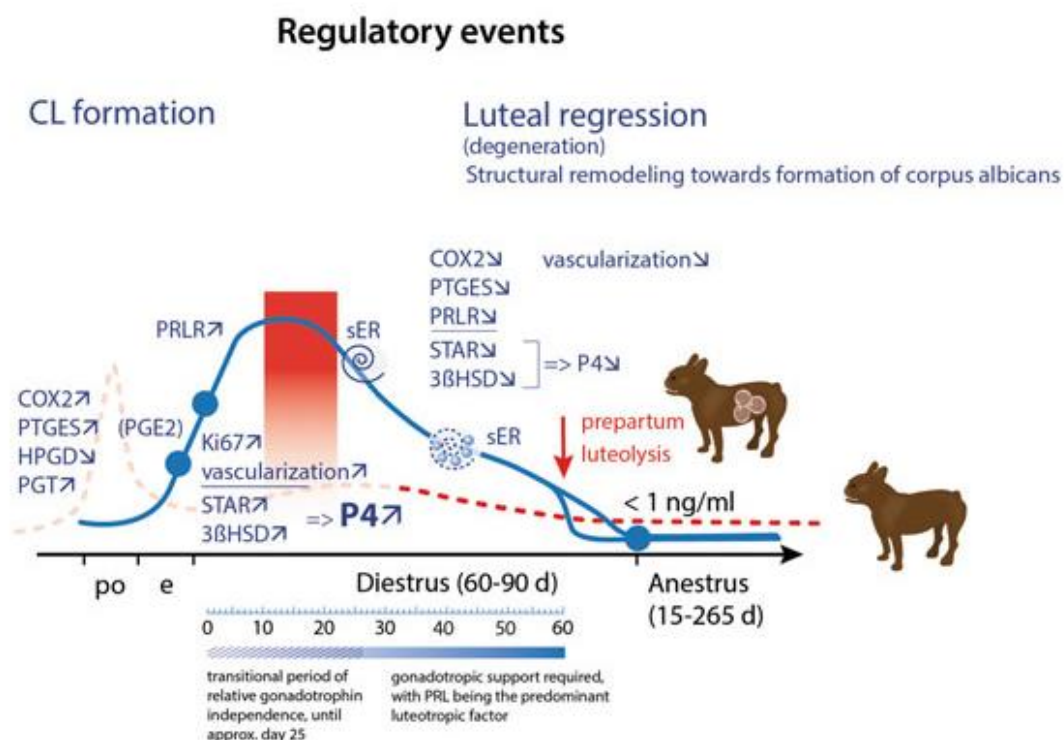


Figura 2. Representação esquemática dos mecanismos hormonais regulando a função lútea durante a gestação de cadelas prenhes e pseudoprenhes. Adaptado de KOWALEWSKI, 2017.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após revisão de literatura pertinente é incontestável que o ciclo estral em cadelas é diferente de outros animais domésticos, principalmente no que concerne a fase lútea. Na fêmea canina o corpo lúteo gestacional e o cíclico possuem semelhanças atuando por longos períodos em ambos os casos e é a única estrutura responsável pela manutenção da gestação. Devido às poucas informações na Medicina Veterinária em relação ao corpo lúteo canino esse tema é foco de estudo relevante em projetos de pesquisa.

A similaridade entre a fase lútea cíclica e gestacional nas cadelas permanece sendo uma das questões mais intrigantes da reprodução canina. Muitos estudos acerca da função reprodutiva de cães vêm ocorrendo nos últimos anos, no entanto, a grande parte das informações obtidas refere-se principalmente às técnicas de reprodução artificial. Os estudos básicos relacionados a formação, manutenção e regressão do CL são mais escassos.

Os processos fisiológicos associados à regressão do CL (luteólise) ainda não são totalmente compreendidos na cadelas e existem dúvidas sobre as vias moleculares de regulação da luteólise em cadelas não prenhes, a qual aparenta ser um processo passivo degenerativo na ausência de uma luteólise ativa.

De forma geral a luteólise em cadelas gestantes está mais caracterizada, pois os mecanismos regulatórios parecem ser semelhantes a de outras espécies domésticas, com envolvimento de fatores luteolíticos controlando a sobrevivência do CL; em compensação as fêmeas cíclicas necessitam de maiores estudos para a identificação dos mecanismos envolvidos na regressão do CL.

4. OBJETIVOS

Avaliar e comparar a expressão dos fatores angiogênicos em corpos lúteos de cadelas gestantes e não gestantes nos diferentes momentos do diestro gestacional e cíclico (10, 20, 40 e 60 pós onda de LH).

Validar a expressão de VEGFA, endotelina, IGFBP5, THBS2 e TGFB1 em corpos lúteos cíclicos e gestacionais por meio das técnicas de qRT-PCR e imunofluorescência.

5. REFERÊNCIAS

AIUDI, G., ALBRIZIO, M.; CAIRA, M.; CINONE, M. Apoptosis in canine corpus luteum during spontaneous and prostaglandina-induced luteal regression. **Theriogenology** - 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, v.6/7 p. 1454-61, 2006.

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

BISCHOFF T.L.W. The development of the canine oocyte.<http://digi.ub.uni-heidelberg.de/diglit/bischoff1845>

CHRISTIANSEN, I. B. J. **Reprodução no cão e gato**. P: 5-15. 1988.

CONCANNON, P. W. Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. **J. Reprod.Fertil.**v. 58, p. 407-10, 1980.

CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **J. Reprod. Fertil. (Suppl.47)**, p. 3-27, 1993.

CONCANNON, P.W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 124, p. 200-10, 2011.

CONCANNON P, TSUTSUI T, SHILLE V.; Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **J. Reprod. Fertil. Suppl** v.57, p.169ñ179, 2001.

CONCANNON, P.W., DIGREGORIO, G. B. Canine vaginal cytology. p. 96ñ111. In: **Small Animal Reproduction and Infertility**, editor T. Burke. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

CONCANNON, P.W., VERSTEGEN, J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, v.30, 2005, **Proceedings** Mexico City, 2005, p.1-8.

CONCANNON PW, MCCANN JP, TEMPLE M.; Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v.39, p.3ñ25, 1989.

CONCANNON PW, CASTRACANE VD, TEMPLE M, MONTANEZ A. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. **Anim. Reprod.**; v.6, p.172ñ93, 2009.

Derussi, A.A.P.; Neves, A.C.T., Sudano, M.J., Lopes, M.D. Evaluation of cell death type of canine luteal cells in cyclic and gestational diestrus A.A.P. **Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**; Florianópolis, SC, Brazil, 2018.

FELDMAN EC, NELSON RW. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3rd ed. St. Louis: Saunders; 2004. p. 752ñ74.

GRAM A, BUCHLER U, BOOS A, HOFFMANN B, KOWALEWSKI MP Biosynthesis and degradation of canine placental prostaglandins: prepartum changes in expression and function of prostaglandin F₂α-synthase (PGFS, AKR1C3) and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD). **Biol. Reprod.** p.89:2. 2013.

HOFFMANN B, BUSGES F, ENGEL E, KOWALEWSKI MP, PAPA P. Regulation of corpus luteum function in the bitch. **Reprod. Domest. Anim.**; v.39, p.232–40, 2004 a.

HOFFMANN B, BUSGES F, BAUMGARTNER W. Immunohistochemical detection of CD4-, CD8-and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus. **Reprod. Domest. Anim.** v. 39:391–395. 2004 b.

HOFFMANN B., HOVELER R., HASAN S.H., FAILING K.; Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. **J. Reprod.Fertil.** v.96, p. 837–45, 1992.

JOHNSTON, S.D., Kustritz MVR, Olson PNS. Canine and Feline **Theriogenology**. Philadelphia: Saunders; 2001.p: 16-29.

KAUTZ E, GRAM A, ASLAN S.; Expression of genes involved in the embryo-maternal interaction in the early-pregnant canine uterus. **Reproduction** v.147, p.703–717, 2014.

KOWALEWSKI M.P. Endocrine and molecular control of luteal and placental function in dogs: a review. **Reprod. Domest. Anim.** v.47 suppl 6, p. 19–24, 2012.

KOWALEWSKI, M.P. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. **Reprod. Biol.**, v. 14, p. 89-102, 2014.

KOWALEWISK, P.W. Regulation of Corpus Luteum Function in the Domestic Dog (*Canis familiaris*) and Comparative Aspects of Luteal Function in the Domestic Cat (*Felis catus*).IN: *The Life Cycle of the Corpus Luteum*, Springer (ed.) International Publishing Switzerland R. Meidan, 2017.

KOWALEWSKI M.P., FOX B., GRAM A., BOOS A., REICHLER I. Prostaglandin E2 functions as a luteotrophic factor in the dog. **Reproduction**. v.145, p. 213ñ26, 2013.

KOWALEWSKI, M. P, ZATTA S., GRAM A. The crafty and cunning canine CL: understanding its development and regulation. **Proceedings of the 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction ISCFR** June 22-25, 2016.

KOWALEWSKI, M.P., GRAM, A., KAUTZ, E; GRAUBNER, F.R.The Dog: Nonconformist, Not Only in Maternal Recognition Signaling.**Anat. Embryol. Cell Biol.** V. 216, p.215ñ37, 2015.

KOWALEWSKI MP, BECERIKLISOY HB, PFARRER C, ASLAN S, KINDAHL H, KUCUKASLAN I, HOFFMANN B.; Canine placenta: a source of prepartal prostaglandins ring normal and antiprogesterininduced parturition. **Reproduction**v.139, p.655ñ664, 2010.

LOEB, L. The effect of extirpation of the uterus on the life and function of the corpus luteum of the sexual cycle of the guinea pig. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.20, p.441, 1923.

MIYAMOTO, A. Intraluteal mechanisms involved in prostaglandin F2a induced luteolysis in Ewe. **J. Reprod. Develop.** v.49 p. 61-63, 1996.

NEUVIANS TP, SCHAMS D, BERISHA B, PFAFFL MW:Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2a-induced luteolysis in bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**; v.70, p.473ñ480, 2004.

NISWENDER, G. D. Corpus luteum and its control in infraprimates species. **Physiology of Reproduction**, v. 1, p.781-816, 1994.

NISWENDER, G.D., et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v.80, p.1-28, 2000.

NOWACZYK RM, JURSA-PIOTROWSKA E, GRAM A, SIEMIENIUCH MJ, BOOS A, KOWALEWSKI MP. Cells expressing CD4, CD8, MHCII and endoglin in the canine corpus luteum of pregnancy, and prepartum activation of the luteal TNF α system. **Theriogenology**; v.98, p.123-132, 2017.

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

OKKENS AC, KOOISTRA HS. Anoestrus in the dog: a fascinating story. **Reprod. Domest. Anim. = Zuchthygiene** v.41 p.:291-296, 2006.

OKKENS AC, DIELEMAN SJ, BEVERS MM, WILLEMSE, AH. Evidence for the non-involvement of the uterus in the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. **Vet Q.** v.7, p.169-173, 1985.

PAPA PC, HOFFMANN B. The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? **Reprod. Domest. Anim.** v.46, p.750-756, 2012.

PAPA P, SOUSA LM, SILVA S.; Glucose transporter 1 expression accompanies hypoxia sensing in the cyclic canine corpus luteum. **Reproduction** v.147, p.81-89, 2014.

PATE, J.L.; KEYES, L.P. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes. **Reproduction**. v.122 p.665-667, 2001.

PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.1884-1890, 1994.

SALLES, M.V., ARAÚJO, A.A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 34, p.185-194, 2010.

SCHAFER-SOMI S, BECERIKLISOY HB, BUDIK S.; Expression of genes in the canine Preimplantation uterus and embryo: Applications for an active role of the embryo before and during Invasion. **Reprod. Domest. Anim.** v. 43, p.656ñ663, 2008.

SHELDRIK E.L., RICKETTS A.P., FLINT A.P. Placental production of progesterone in ovariectomized goats treated with a synthetic progestagen to maintain pregnancy. **J. Reprod. Fertil.** v.60, p.339ñ348,1980.

TARRAF CG, KNIGHT JW. Effect of uterine space and fetal sex on conceptus development and in vitro release of progesterone and estrone from regions of the porcine placenta throughout gestation. **Domest. Anim. Endocrinol.** v.12, p.63ñ71, 1995.

ZATTA, S., REHRAUER, H., GRAM A., BOOS, A. AND KOWALEWSKI, M. P. Transcriptome analysis reveals differences in mechanisms regulating cessation of luteal function in pregnant and nonpregnant dogs. **BMC Genomics** v.18, p.757, 2017.

WEBB R, WOAD KJ, ARMSTRONG DG. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domest. Anim. Endocrinol.** v.23, p.277ñ285, 2002.

TARRAF CG, KNIGHT JW. Effect of uterine space and fetal sex on conceptus development and in vitro release of progesterone and estrone from regions of the porcine placenta throughout gestation. **Domest. Anim. Endocrinol.** v.12, p. 63ñ71,1995.

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

WEBB, R, WOAD, K.J., ARMSTRONG, D.G. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. **Domest. Anim. Endocrinol.** v.23, p. 277-1285, 2002.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 - TRABALHO CIENTÍFICO

A revista escolhida foi Theriogenology.

Link para normas de publicação:

<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

Dinâmica dos fatores angiogênicos em corpos lúteos de cadelas gestantes e pseudogestantes

A. A. Ribeiro^a, A. A. P. Derussi^b, P. P. Freire^a, M. Dal Pai^a, P. C. Papa^c, M. D. Lopes^a, M. C. Meinsohn^d, B. D. Murphy^d.

a Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil

b Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

c Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

d Universidade de Montreal, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada.

1. INTRODUÇÃO

A fisiologia reprodutiva canina apresenta diversas particularidades e a semelhança entre a duração da fase lútea em cadelas gestantes e não-gestantes continua sendo uma das características mais intrigante e ainda alvo de muitos estudos [1, 2, 3]. A fase lútea nas cadelas é identificada por uma ação plena do corpo lúteo: glândula endócrina transitória, caracterizada por um rápido crescimento das células da teca e da granulosa de folículos ovulatórios [4, 5]. Durante a fase lútea das cadelas não existem variações consideráveis nos processos de formação e manutenção do corpo lúteo (CL) e nem mesmo diferenças significativas no perfil esteroidogênico entre fêmeas em diestro cíclico e gestacional [6].

A única fonte de progesterona durante a gestação nas fêmeas caninas é o corpo lúteo. Após 15 a 30 dias da onda pré-ovulatória de LH a secreção de progesterona pelo CL atinge uma concentração máxima em torno de 15 a 80 ng/mL, com uma variação individual grande [6, 7]. A partir desse ponto uma regressão gradual torna-se óbvia e os níveis de P4 diminuem lentamente [8, 9].

A regulação da função lútea é realizada por um grupo de agentes que interagem na busca da homeostasia da glândula, portanto, as células que originam o corpo lúteo sofrem influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos [10]. Os reguladores primários da angiogênese ovariana pertencem às famílias dos fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFs) [11]; outros fatores envolvidos na angiogênese são os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) e suas proteínas de ligação (IGFBPs), fatores vasoativos (endotelina, angiotensina, óxido nítrico) e fatores antiangiogênicos (THBS e TGFB1). Esses agentes angiogênicos atuam no processo de formação do CL, mas também agem diretamente na regressão do CL [12]. Durante a luteólise, o CL perde a capacidade de sintetizar P₄, devido à uma diminuição do aporte sanguíneo às células lúteas e um aumento na ação do sistema imunológico com envolvimento de agentes vasoconstritores e quimiotáticos, seguido pela perda das células que o compõem [13].

A maioria dos fatores angiogênicos já caracterizados estão relacionados com a fase de formação do CL, portanto a maior parte das informações existentes refere-se principalmente aos mecanismos luteotróficos. Os

mecanismos associados à luteólise e as vias moleculares de sua regulação em cadelas prenhes e não prenhes ainda não são bem elucidados. De maneira geral, muitos fatores estão envolvidos nos processos de regressão funcional e estrutural do CL na espécie canina, assim como no desencadeamento do seu processo de lise. Portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de fatores angiogênicos - VEGFA, IGFBP5, Endotelina, THBS2 e TGFB1 previamente selecionados pela técnica de RNAseq em diversos momentos da fase lútea (10, 20, 40 e 60 dias) de fêmeas gestantes e não-gestantes através das técnicas de qRT-PCR e imunofluorescência.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Essa proposta foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade Estadual Paulista UNESP-Botucatu, sob registro 168/2013 CEUA.

2.1. Animais

Foram utilizadas 40 cadelas, sem raça definida, com idade entre 1 a 6 anos, pesos equivalentes, boa condição de saúde, com histórico de fertilidade comprovada, atendidas no Ambulatório de Reprodução de Pequenos Animais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu, cujos proprietários tinham interesse em realizar a ovariectomia (OSH) eletiva em seus animais.

2.2. Estimativa do momento de ovulação

A ovulação foi estimada baseando-se na concentração sérica de P_4 e citologia vaginal. No momento em que a concentração de P_4 atingiu 4 ng/ml, e a porcentagem de células superficiais igual ou superior a 90% na citologia vaginal, foi considerado como o dia da ovulação, ou seja, dia 2 (48 horas após onda pré-ovulatória de LH) [14].

2.3. Citologia vaginal

Os exames citológicos foram realizados com o uso de escova ginecológica. As lâminas foram coradas pelo Panótico (Hematocor®) e a identificação dos tipos celulares foi baseada nos critérios adotados por Johnston et al. [9], 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.

2.4. Dosagem de progesterona sérica

As dosagens de P₄ foram realizadas no momento do exame clínico inicial, prosseguindo em dias alternados a partir do momento em que as células superficiais atingiram 80% no exame de citologia vaginal até a realização da segunda inseminação e também no dia da OSH.

2.5. Protocolo de inseminação artificial (I.A.)

Foram realizadas duas I.A. no fundo da vagina, com intervalo de 48 horas, nos dias D4 e D6 da onda pré-ovulatória de LH. O sêmen foi obtido sempre de um mesmo macho adulto, saudável, com testes negativo para brucelose e leptospirose.

2.6. Ovariosalpingohisterectomia (OSH)

As medidas pré-operatórias adotadas incluíam: jejum sólido de 12 horas e hídrico de 3 horas. O procedimento anestésico consistiu em: 0,05 mg/Kg de acepromazina e 0,5 mg/Kg de morfina, por via intramuscular como medicação pré-anestésica e após 10 minutos foi realizada a indução anestésica com 5 mg/kg de ketamina 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.

2.7. Divisão dos grupos experimentais:

As cadelas foram divididas em 02 grupos:

1 **GRUPO I (diestro ciclico)** - 20 cadelas, não inseminadas, que foram
2 submetidas à ovariectomia, em várias fases do diestro cíclico. Este
3 grupo foi subdividido em:

4 ❖ Grupo IA: 5 cadelas submetidas à OSH, 10 dias após a onda pré-ovulatória
5 de LH

6 ❖ Grupo IB: 5 cadelas submetidas à OSH, 20 dias após a onda pré-ovulatória
7 de LH

8 ❖ Grupo IC: 5 cadelas submetidas à OSH, 40 dias após a onda pré-ovulatória
9 de LH

10 ❖ Grupo ID: 5 cadelas submetidas à OSH, 60 dias após a onda pré-ovulatória
11 de LH

12 **GRUPO II (diestro gestacional)** ã 20 cadelas inseminadas, via vaginal, com
13 sêmen fresco. Após a inseminação artificial este grupo foi subdividido em:

14 ❖ Grupo IIA: constituído de 05 fêmeas inseminadas e submetidas à OSH
15 no 10º dia após a onda pré-ovulatória de LH.

16 ❖ Grupo IIB: constituído de 05 fêmeas inseminadas e submetidas à OSH
17 no 20º dia após a onda pré-ovulatória de LH.

18 ❖ Grupo IIC: constituído de 05 fêmeas inseminadas e submetidas à OSH
19 no 40º dia após a onda pré-ovulatória de LH.

20 ❖ Grupo IID: constituído de 05 fêmeas inseminadas e submetidas à OSH
21 no 60º dia após a onda pré-ovulatória de LH.

22

23 **2.8. Constatação da gestação:**

24 Após a OSH, as tubas uterinas, útero e ovários foram devidamente
25 isolados em ambos os grupos. A constatação da presença da gestação no
26 grupo IIA e IIB, diestro gestacional, foi realizada através do método de
27 *flushing*[15] das tubas uterinas e cornos uterinos. Essas estruturas foram
28 lavadas para a recuperação de embriões com solução PBS, acrescida de
29 álcool polivinil e heparina. Nos grupos IIC e IID a verificação da presença da

1 gestação foi realizada através da detecção da presença de vesículas
2 embrionárias ou fetos.

3

4 **2.9. Coleta dos ovários**

5 Os ovários foram coletados após a remoção da bursa ovárica,
6 separados e identificados para análise da expressão de fatores angiogênicos
7 por meio das técnicas de qRT-PCR e imunofluorescência

8 **2.10. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)**

9 A validação da expressão gênica, por PCR em tempo real, foi realizada
10 utilizando os fatores angiogênicos: VEGFA, endotelina, IGF2, IGFBP5, THBS2
11 e TGFB1 (Tabela 1) presentes em corpos lúteos caninos provenientes do
12 diestro cíclico e gestacional nos períodos equivalentes. Esses fatores foram
13 selecionados para validação, devido aos resultados obtidos por meio da técnica
14 de RNAseq realizada anteriormente. Foram selecionados os genes que
15 apresentaram o maior número de *reads* (Tabela 2).

16 Os pares de *primers* foram desenhados com base na sequência
17 completa do mRNA dos genes, depositados no *GenBank*
18 (www.ncbi.nlm.nih.gov) com o programa *Primer3Plus*
19 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plu.cgi>). Por meio do
20 programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>)
21 foi analisada a qualidade desses *primers* e testada a especificidade dos
22 mesmos com o uso da ferramenta BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

23 Através da reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada a
24 otimização dos *primers* e foram estabelecidas as condições ideais de
25 temperatura de anelamento para cada par de *primers*, por meio de gradientes
26 de temperaturas. Em seguida, o produto de PCR foi submetido à eletroforese
27 em gel de agarose a 1,5 % para a confirmação da amplificação.

28 Os genes selecionados para validação a partir de todas as amostras
29 coletadas foram submetidos ao PCR em tempo real em aparelho QuantStudio
30 12K Flex (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) e amplificados
31 utilizando GoTaq qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

Como controle interno das reações de PCR em tempo real foi utilizado a amplificação dos genes de referência, a fim de normalizar os resultados obtidos para os genes-alvo. Anterior a validação dos genes de interesse por qRT-PCR, os genes de referência foram selecionados e testados, sendo que todos mostraram-se adequados para utilização, como pode ser visto no Gráfico 1. Entre os genes de referência testados (GAPDH, RPL13, RPL19), foi selecionado o RPL13 por ser considerado o mais estável.

A fim de eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA total foram submetidas ao tratamento com o kit DNase I (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, o RNA total foi transcrito reversamente em cDNA com o uso do kit SuperScript III First-Strand Syntesis SuperMix (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. As reações foram realizadas utilizando o sistema TaqMan® (AppliedBiosystems, Foster, USA). Os PCRs foram conduzidos em duplicatas para cada amostra e a expressão foi determinada pela quantificação em relação ao gene controle. Foi considerada a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra.

Tabela 1. Fatores angiogênicos selecionados e validados pela técnica de qRT-PCR em amostras de C.L. canino.

GENES SELECIONADOS	GENE I.D.	SENTIDO	SEQUÊNCIA DO PRIMER
VEGFA (vascular endothelial growth factor A)	403802	Forward	CCCACTGAGGAGTTCAACATCA
		Reverse	CACAGGGATTTTCTTGCCTTGC TC
IGF2 (Insulin-like growth factor 2)	483664	Forward	TACTTCAGACTTCCAGGCAGG
		Reverse	GACACGTCCCTCTCGGACTT
IGFBP5 (insulin-like growth factor - binding protein 5)	610316	Forward	GTGACCGCAAAGGGTTCTACA
		Reverse	CACTTGGAGGTGAAGGGTTTCT
Endothelin	486161	Forward	CTATTATCTCCACACTGTCACC CC
		Reverse	TGTGACCGCCGCTTGAT
THBS 2 (thrombospondin 2)	484087	Forward	CAGGCTACATAAGGGTCTTGGT
		Reverse	GGTTTGGTCATAGATGGGTCC
TGFB1	481519	Forward	AGACGAGTCCTGACAGACGA

(transforming growth factor -
beta induced 1)

Reverse

GTGGATCTGGATGCCCGAAT

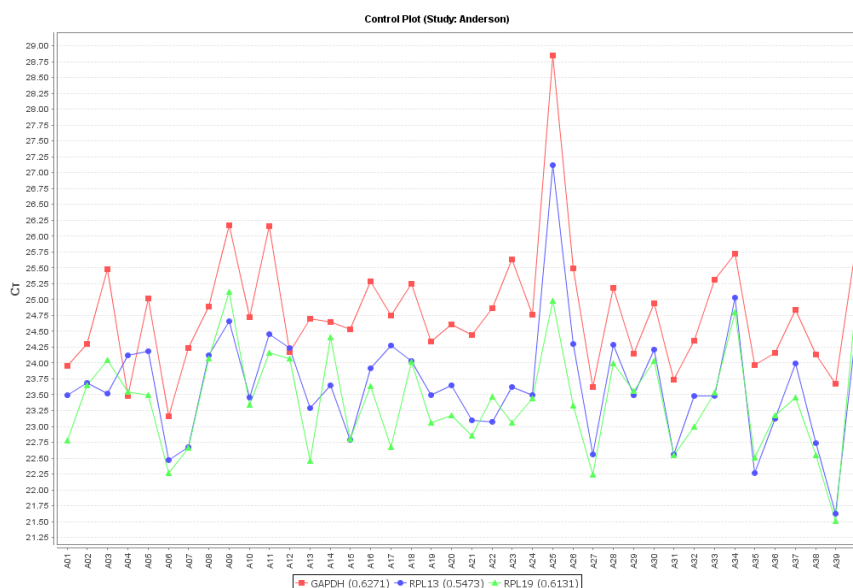
1

2 **Tabela 2.** Fatores angiogênicos com variação na expressão gênica entre o
3 diestro cíclico e gestacional avaliados pela técnica de RNAseq.

Símbolo do gene	GENE I.D.	Período	Reads
		Expressão Diferencial	
VEGFA	403802	d.40, d.60	3671
FGF7	403915	d.20, d.40	21
FGF10	612454	d.60	86
FGF9	477340	d.10, d.20	90
HBEGF	607007	d.60	224
IGFBP1	480812	d.10, d.20, d.60	13
IGFBP6	607374	d.20, d.60	1562
IGF2	483664	d.60	2342
IGFBP5	610316	d.60	455
IGFBP2	488516	d.40, d.60	302
IGDBPL1	481621	d.10, d.60	43
ANGPT1	403656	d.20, d.40, d.60	88
TGFB1	481519	d. 60	1136
IL 8	403850	d.10, d.20, d.40	212
IL 18	403796	d.20, d.40	87
Endothelin	486161	d.40, d.60	40119
THBS 2	484087	d.20, d.60	2772

4 **Negrito:** Fatores angiogênicos selecionados para validação com variação na expressão gênica
5 entre o diestro cíclico e gestacional.

- 1 **Gráfico 1.** Avaliação do gene de referência para ser utilizado como controle da
 2 técnica qRT-PCR em amostras de CLs caninos.



3

4 **2.11. Imunofluorescência:**

5 Para a técnica de imunofluorescência (IF), os corpos lúteos foram
 6 fixados em blocos de parafina e montados em lâminas de microscópio. Os
 7 cortes ovarianos foram desparafinados duas vezes em xileno durante 10
 8 minutos e reidratados em etanol 100%, 90% e 70% - 5 minutos cada. Os cortes
 9 foram então incubados em solução tampão de citrato de sódio a 95°C durante
 10 30 minutos para recuperação antigênica. Após essa etapa, foi realizado
 11 bloqueio com BSA (albumina sérica bovina) durante 1 hora em uma câmara
 12 escura a temperatura ambiente. Após o bloqueio, os cortes foram incubados
 13 com o anticorpo primário durante a noite a 4°C. Após isso, eles foram lavados
 14 com PBST (Phosphate Buffered Saline Tween 20) 3 vezes de 5 minutos e
 15 então, incubados com o anticorpo secundário apropriado CY3 - conjugado,
 16 diluição 1:300 durante 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos
 17 primários e secundários utilizados estão listados nas tabelas 3 e 4
 18 respectivamente. Os núcleos foram marcados com DAPI (diamini-2-
 19 phenylindole) na diluição 1:100 (Sigma). Finalmente, os cortes foram selados
 20 com uma gota de solução de montagem Permafluor (Thermo Scientific) e
 21 lamínulas adequadas. As imagens foram capturadas no aumento de 200x,
 22 utilizando um microscópio de fluorescência ASLMD (Leica) e visualizadas com

um Fotomicroscópio Zeiss III (Carl Zeiss, Thornwood, NJ) equipado com um conjunto de filtros de isotiocianato de fluoresceína com medidas de intensidade de fluorescência. A mensuração da intensidade da imunofluorescência foi quantificada por meio do *Software CellProfiler*

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados na técnica de imunofluorescência com amostras de CL canino para validação de fatores angiogênicos.

Gene	Companhia/Código	Isótipo	Controle Positivo
Endotelina	ABCAM - AB2786	IgG Monoclonal de Camundongo	Linfonodo canino
VEGFA	BIORBYT ORB191500	- IgG Policlonal de Coelho	Linfonodo canino
TGFB1 - proteína	ABBEXA ABX008643	- IgG Policlonal de Coelho	Linfonodo Canino
TGFB1 - receptor I	SANTA CRUZ (V-22) - SC-398	IgG Policlonal de Coelho	Linfonodo Canino
TGFB1 - receptor II	SANTA CRUZ (E-6) - SC-17792	IgG Policlonal de Coelho	Linfonodo Canino

7

Tabela 4. Anticorpos secundários utilizados na técnica de imunofluorescência com amostras de CL canino para validação dos fatores angiogênicos.

Nome	Companhia/código
Anticorpo cy3 conjugado de cabra anti-coelho	Jackson Immuno Research
Anticorpo cy3 conjugado de cabra anti-camundongo	ABCAM - AB6785

10

2.12. Análise Estatística:

Os dados obtidos a partir das técnicas de qRT-PCR e imunofluorescência foram avaliados por meio do teste t student. Esses dados de validação foram analisados através do programa estatístico GraphPadPrism

14

1 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) sendo consideradas
2 diferenças significativas quando $p < 0,05$.

3

4 **3. RESULTADOS**

5 **3.1. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real** 6 **Quantitativa(qRT-PCR)**

7 A análise dos resultados obtidos na técnica de qRT-PCR são descritas
8 nos gráficos 02 a 07.

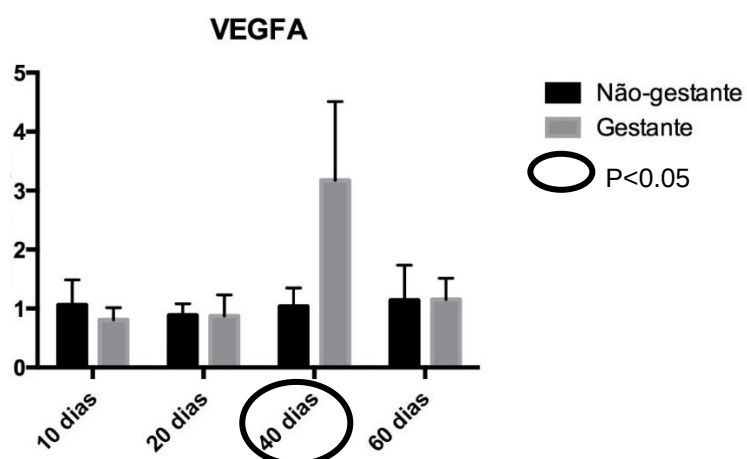


Gráfico 2 - Avaliação da expressão de VEGFA no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando qRT-PCR

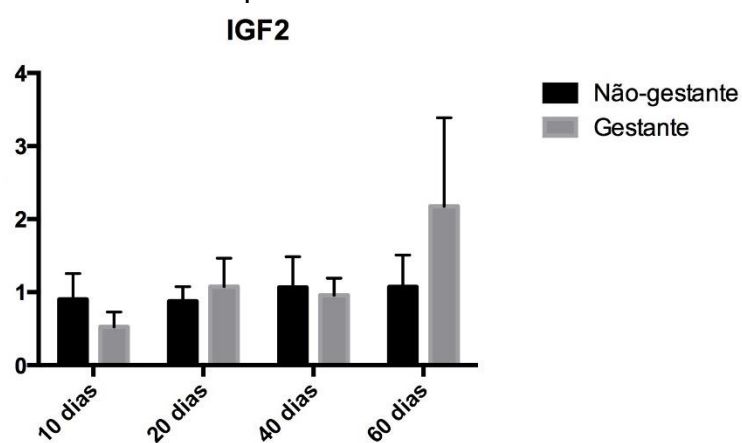


Gráfico 3 - Avaliação da expressão de IGF2 no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando qRT-PCR

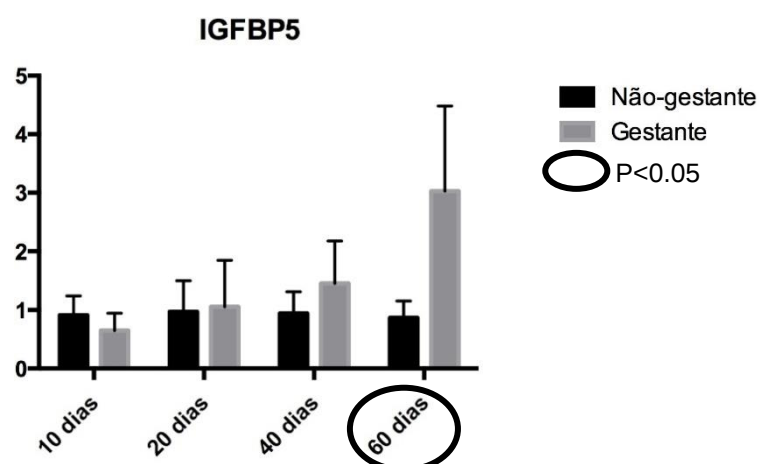


Gráfico 4 - Avaliação da expressão de IGFBP5 no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando qRT-PCR

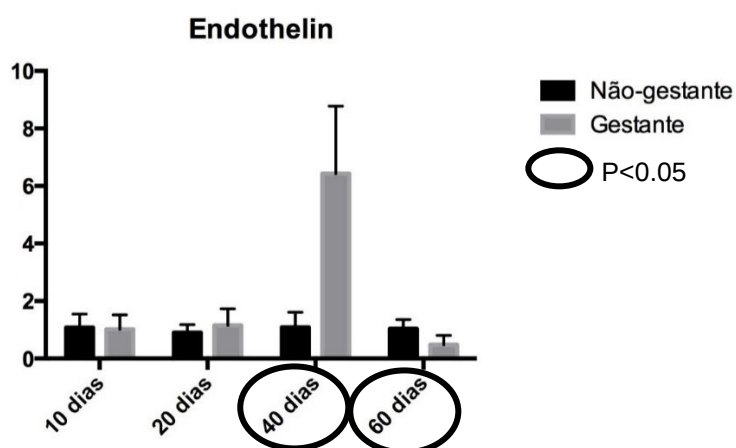


Gráfico 5 - Avaliação da expressão de Endotelina no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando qRT-PCR

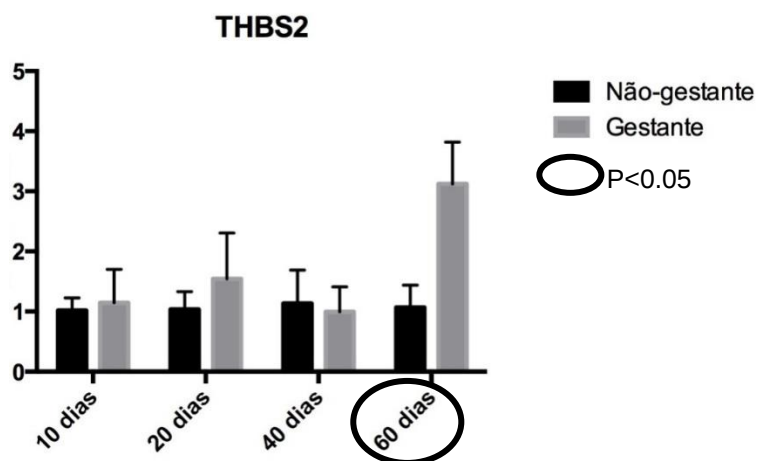


Gráfico 6 - Avaliação da expressão de THBS2 no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando qRT-PCR

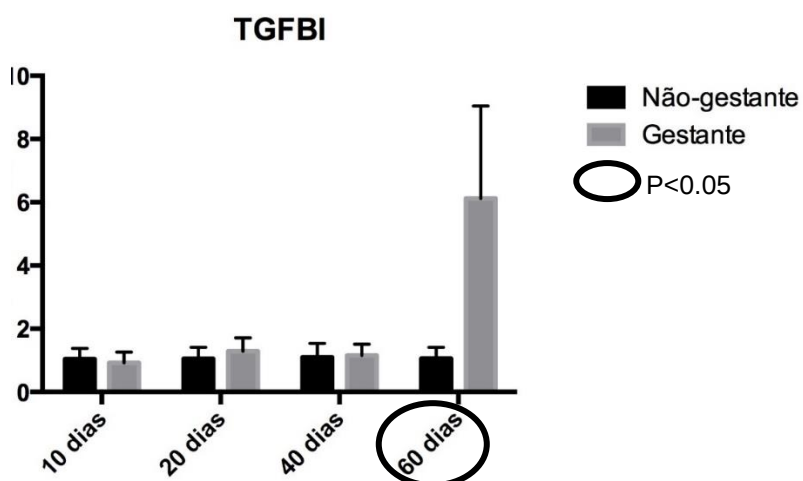


Gráfico 7 - Avaliação da expressão de TGFB1 no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando qRT-PCR

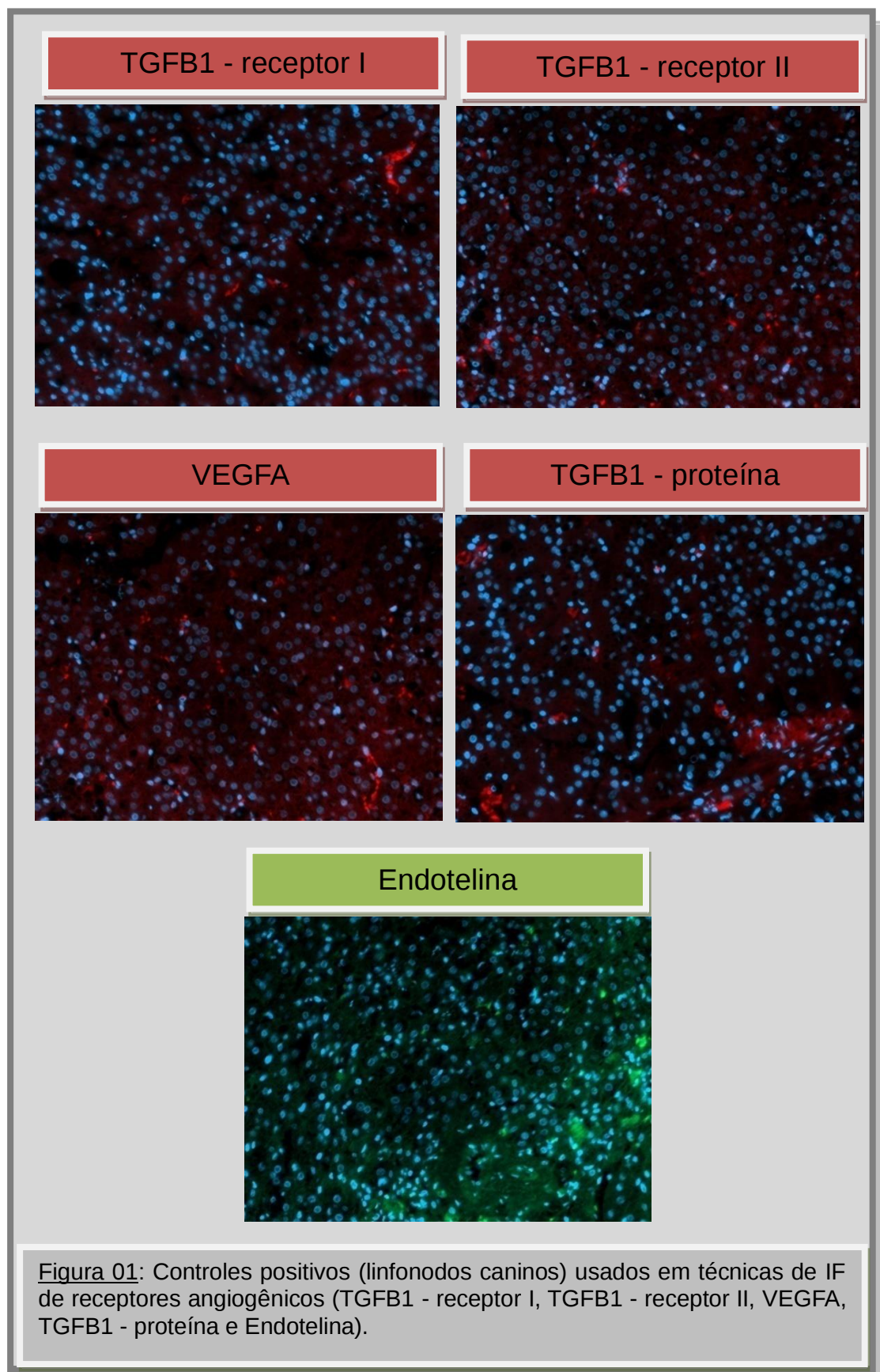
As expressões de VEGFA, IGFBP5, Endotelina, THBS2 e TGFB1 foram reguladas de maneira distinta nos períodos de tempo avaliados, principalmente no terço final (40 e 60 dias). Durante o período de 40 dias, houve diferença estatística na expressão dos fatores VEGFA e endotelina, ambos no grupo gestante. No momento 60 dias houve diferença na expressão dos genes IGFBP5, THBS2 e TGFB1 no grupo gestante, enquanto que a endotelina apresentou maior diferença no grupo diestro ciclico.

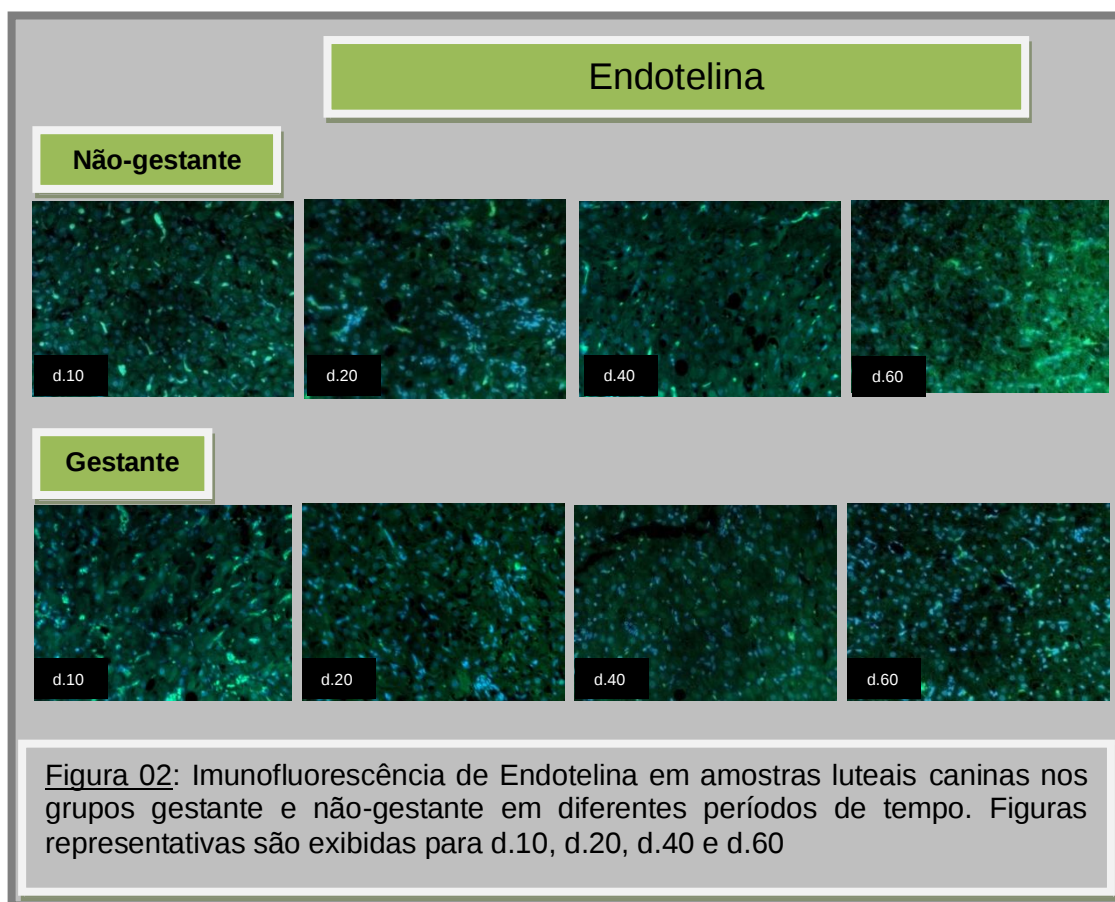
3.2 ñ Imunofluorescência (IF)

Nem todos os fatores angiogênicos testados na técnica de qRT-PCR, foram validados pela IF. As exceções foram: O IGF2 não foi empregado na técnica de IF por não apresentar diferença estatística no qRT-PCR; o IGBP5 e THBS2, não foram validados pela técnica de IF pois não foram encontrados os anticorpos primários com reatividade para a espécie canina, já os receptores I e II de TGFB1 foram incluídos e avaliados pela técnica de IF.

Os controles positivos utilizados na IF estão representados na figura 01. As imagens resultantes da técnica de IF estão expostos nas figuras 02 a 06 e a análise dos resultados são descritas nos gráficos 08 a 12.

Controles positivos:





Mensuração da intensidade da imunofluorescência de Endotelina utilizando o *Software CellProfiler*

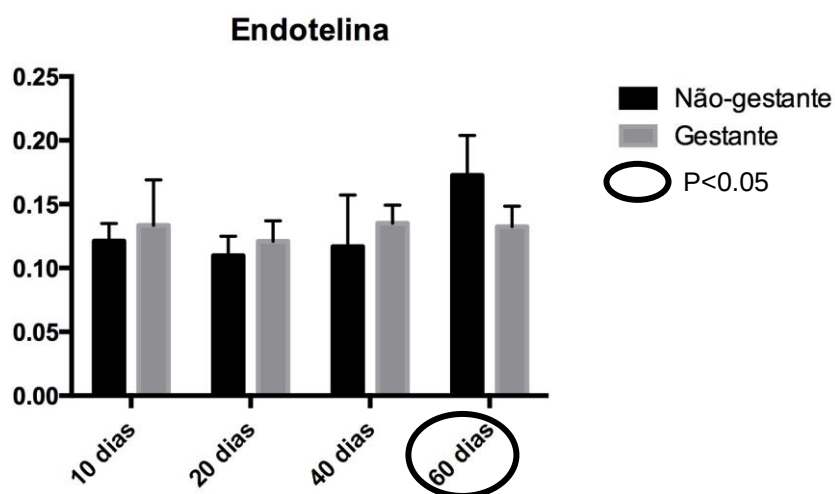
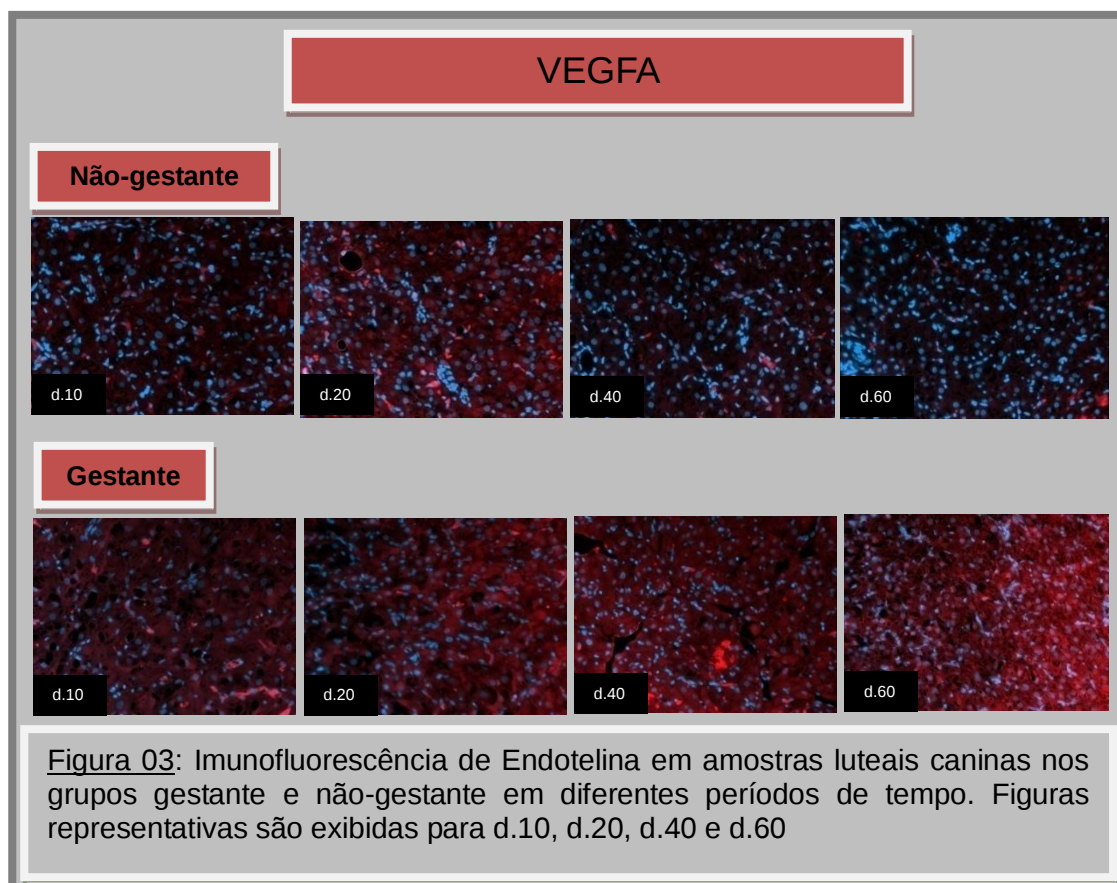


Gráfico 08 - Avaliação da expressão de Endotelina no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando IF



Mensuração da intensidade da imunofluorescência de VEGFA utilizando o *Software CellProfiler*

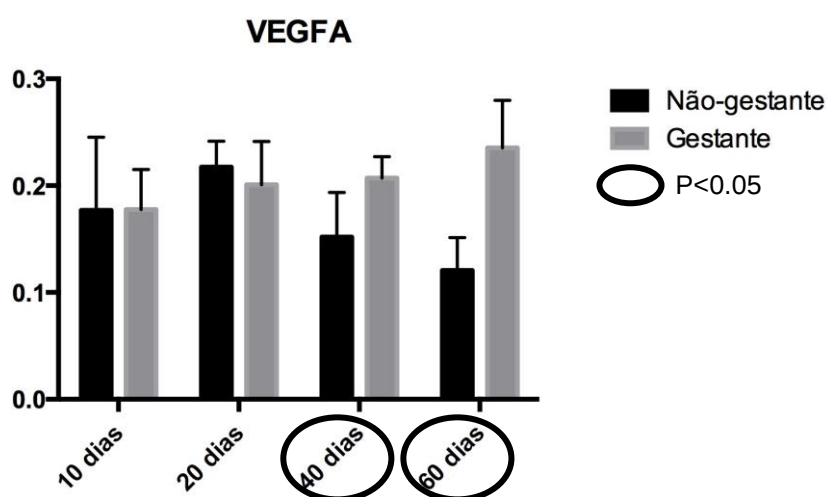
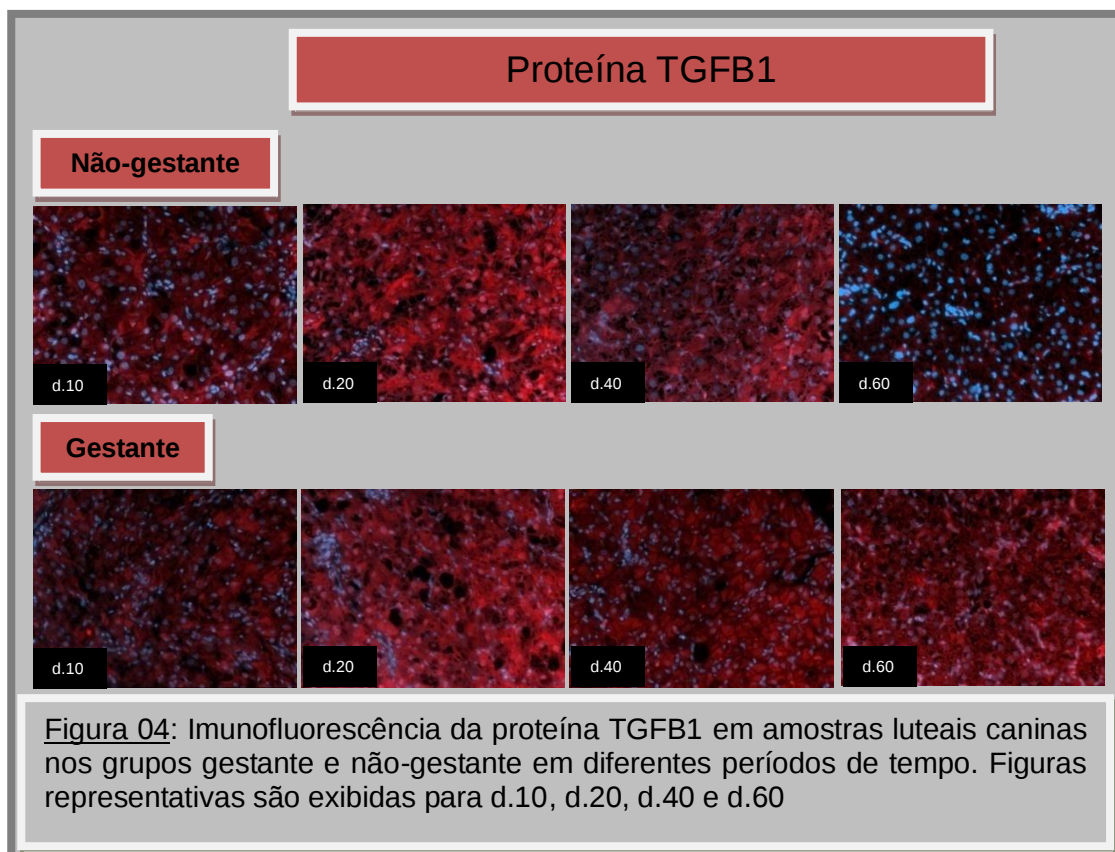


Gráfico 09 - Avaliação da expressão de VEGFA no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando IF



Mensuração da intensidade da imunofluorescência da proteína TGFB1 utilizando o *Software CellProfiler*

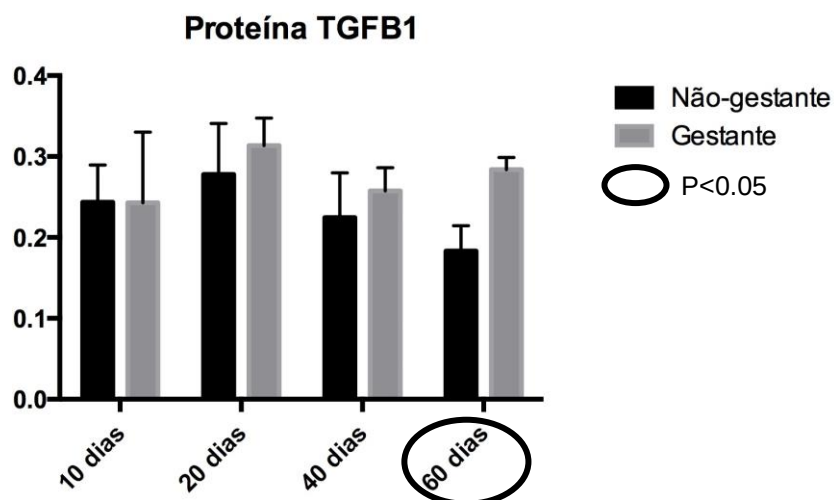
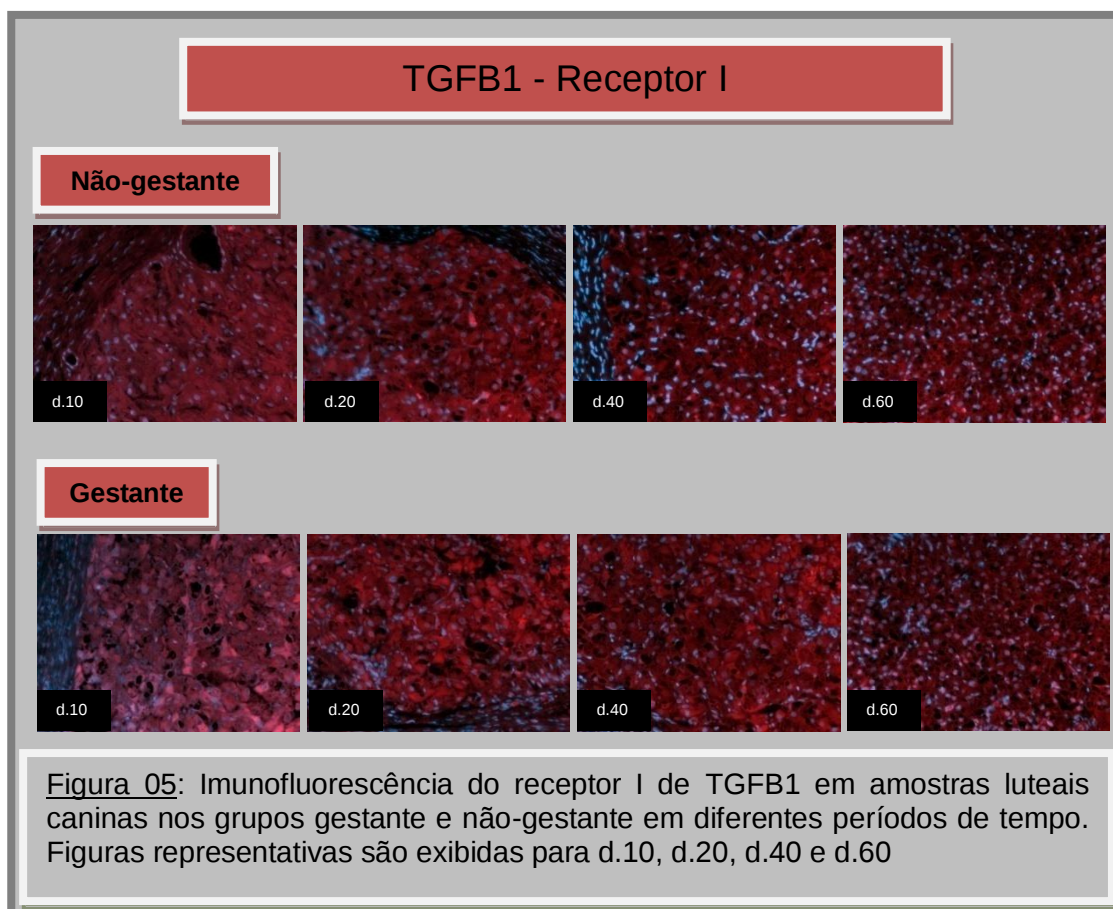


Gráfico 10 - Avaliação da expressão da proteína TGFB1 no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando IF.



Mensuração da intensidade da imunofluorescência do receptor I de TGFB1 utilizando o *Software CellProfiler*

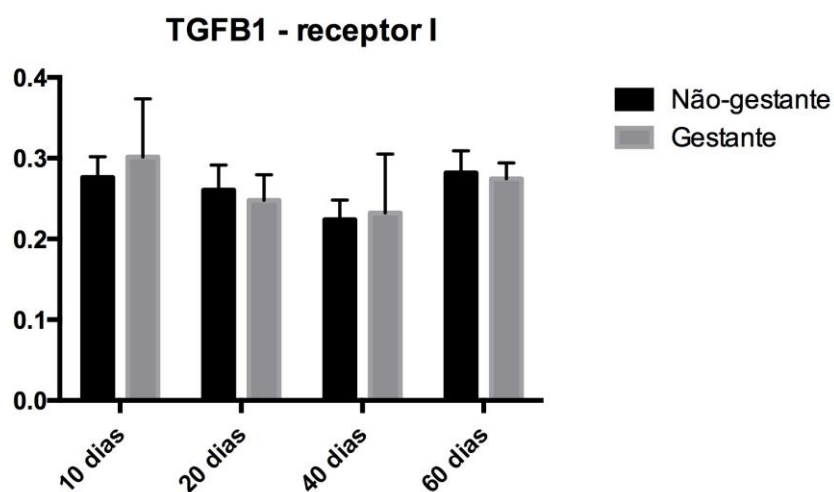
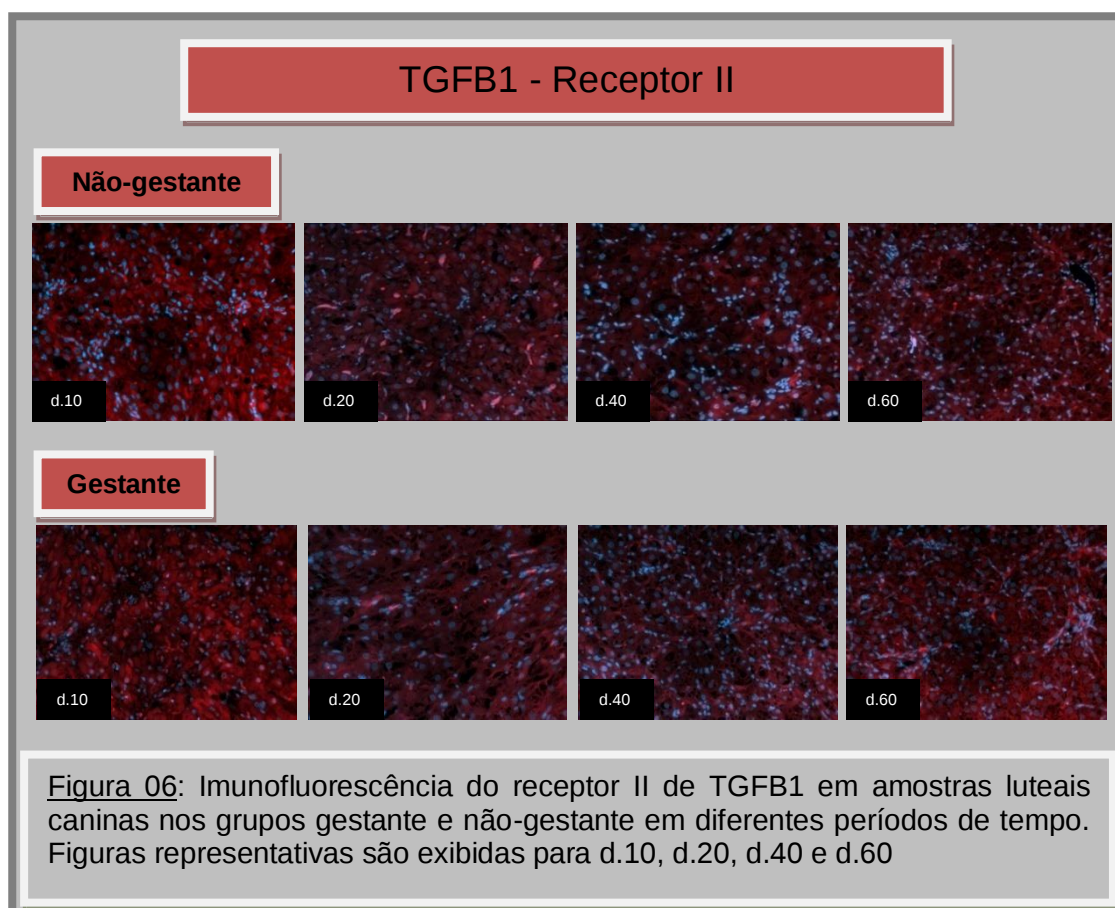


Gráfico 11 - Avaliação da expressão de TGFB1 - receptor I no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando IF.



Mensuração da intensidade da imunofluorescência do receptor II de TGFB1 utilizando o *Software*

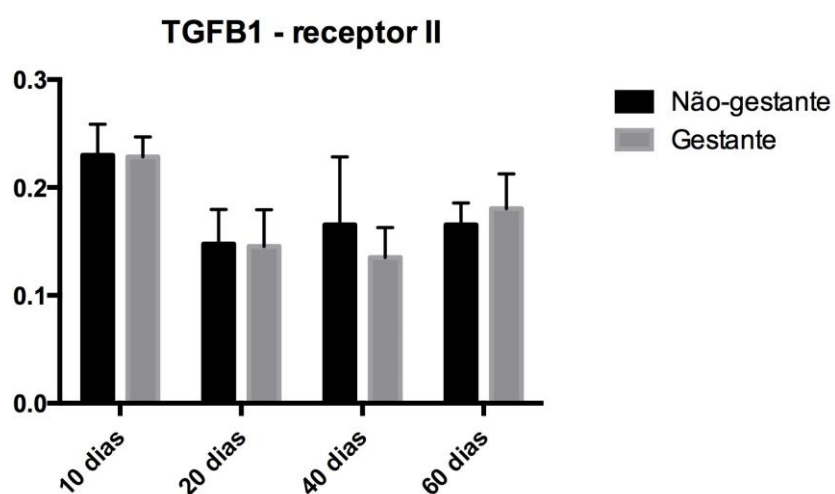


Gráfico 12 - Avaliação da expressão de TGFB1 - receptor II no C.L. nos grupos gestante e não-gestante em diferentes períodos do diestro canino usando IF.

1 Os receptores I e II de TGFB1 avaliados pela técnica de IF, não
2 apresentaram diferenças estatísticas em nenhum dos momentos avaliados (10,
3 20, 40, 60). No entanto, a proteína TGFB1 apresentou diferença estatística no
4 dia 60, tanto no qRT-PCR quanto na IF. Esses resultados mostram que a
5 proteína TGFB1 é diferentemente expressa entre os grupos gestante e não-
6 gestante, mas a expressão dos seus receptores I e II não se alteraram.
7 Acredita-se que nesse caso, um outro receptor de TGFB1 possa estar
8 associado, possivelmente o receptor III.

9 As técnicas de validação utilizadas, qRT-PCR e imunofluorescência
10 foram consideradas apropriadas e satisfatórias foram observados resultados
11 compatíveis no qRT-PCR e IF realizados, confirmando e tornando os
12 resultados mais seguros e fidedignos. Todos resultados apresentaram
13 resultados semelhantes e compatíveis em ambas as técnicas empregadas. A
14 maioria dos fatores angiogênicos testados apresentaram variações na
15 expressão no dia 60 ($p < 0.05$), as únicas duas exceções foram: VEGFA na
16 técnica qRT-PCR (gráfico 2), outra exceção foi com a endotelina no dia 40 na
17 IF (figura 2 e gráfico 8).

18 **4. DISCUSSÃO**

19 No presente trabalho foram avaliadas as expressões de fatores
20 angiogênicos e antiangiogênicos presentes em CLs de cadelas gestantes e não
21 gestantes em momentos distintos do diestro (10, 20, 40 e 60 dias). Esses
22 fatores foram selecionados com base nos resultados que apresentaram maior
23 expressão gênica na técnica de RNAseq, portanto, a seleção dos genes
24 avaliados foi baseada em um método seguro e não apenas na literatura
25 pertinente. Muitas vezes os genes selecionados para avaliação partem de
26 estudos realizados em outras espécies ou evidenciados em trabalhos
27 realizados em outros laboratórios.

28 No presente estudo os resultados mais significativos apontam para a
29 expressão gênica dos inibidores da angiogênese. O THBS2 e o TGFB1
30 desempenham um papel importante na inibição da angiogênese. Ambos os
31 genes apresentaram maior expressão gênica em cadelas prenhes no momento
32 60 dias. Esses resultados revelam um efeito direto do THBS2 e TGFB1 no
33 processo de regressão e lise do CL, nas cadelas gestantes. Esses mesmos

genes a despeito de estarem presentes no grupo de cadelas não gestantes são menos expressos quando comparados com o grupo de fêmeas gestantes. Essa situação talvez esteja relacionada com um processo de luteólise mais rápida e aguda no grupo gestante do que nas pseudogestantes.

O VEGFA é considerado um potente fator de regulação da angiogênese e é expresso em diversos tecidos, cérebro, rim, fígado, coração. Durante a fase lútea esse fator é requisitado para manutenção da função e estrutura vascular, sendo predominantemente encontrado nas células lúteas originárias da teca e granulosa [12]. No corpo lúteo de cadelas, a proteína do VEGFA foi detectada por imunohistoquímica nas células lúteas ao longo do diestro cíclico e gestacional [16, 17]. Neste estudo, observou-se que a expressão de VEGFA foi maior no dia 40 do grupo gestante em ambas as técnicas aplicadas e apresentou diferença significativa no dia 60, apenas na técnica de IF também no grupo gestante. Esse resultado reforça a ideia de que o sistema VEGF além de ser importante na formação do CL, também participa da regressão estrutural [18]. Existem duas isoformas do VEGFA: a e b, a isoforma b é pouco conhecida, mas acredita-se que possa funcionar como um fator antiangiogênico. Recentes estudos demonstraram que essa isoforma b foi expressa em maior quantidade no processo de regressão luteal [19]. Nesse trabalho não foi possível diferenciar as isoformas, talvez nossos resultados estejam mais relacionados com a isoforma b, uma vez que a maior expressão foi vista aos 40 e 60 dias em cadelas gestantes gestação onde a luteólise é mais aguda.

A endotelina é um peptídeo vasoativo, produzida por células endoteliais e que apresenta um potente efeito vasoconstritor. Nossos resultados mostram o gene da endotelina expresso em dois momentos: 40 e 60 dias, apresentando maior expressão no grupo gestante em 40 dias e no grupo controle em 60 dias. Em 60 dias foi observada diferença estatística em ambas as técnicas, no entanto em 40 dias houve diferença apenas no qRT-PCR. A partir desses dados, nota-se uma relação estreita entre a endotelina e a luteólise levando a uma vasoconstrição da rede vascular que compõem o CL [12]. As prostaglandinas influenciam a secreção de endotelina e evidências sugerem que a endotelina promova a regressão lútea, modulando o tônus vascular, a produção de progesterona e morte de células lúteas [20].

1 Outros elementos envolvidos no desenvolvimento do corpo lúteo das
2 espécies domésticas são os IGFs e suas proteínas de ligação (IGFBPs). Em
3 nosso estudo, apenas o IGFBP5 apresentou maior expressão gênica no
4 período de 60 dias, no grupo das cadelas prenhes. Isso revela que esse
5 sistema pode ter efeitos diretos e indiretos na angiogênese do corpo lúteo,
6 atuando diretamente sob as células endoteliais e lúteas [12].

7 Os resultados obtidos neste estudo fornecem informações importantes
8 que colaboram no entendimento dos mecanismos luteolíticos na espécie
9 canina. O processo de regressão lútea parece estar diretamente relacionado
10 com o suprimento sanguíneo do CL pela inibição e vasoconstrição dos vasos
11 sanguíneos, uma vez que a maior expressão dos genes reguladores da
12 angiogênese foi identificada no terço final dos tempos avaliados (60 dias), com
13 destaque para os agentes inibidores (THBS2 e TGFB1). Essa elevação na
14 expressão gênica dos fatores THBS2 e TGFB1 no momento do parto pode
15 estar diretamente relacionada com a ação de PGF2 α . A expressão dos fatores
16 inibidores foi semelhante nos momentos 10, 20 e 40 dias mas superior no
17 período de 60 dias. Evidências convincentes sugerem que as prostaglandinas
18 estimulam os genes anti-angiogênicos a promoverem a regressão lútea e que
19 esses mecanismos culminam com a morte celular [20].

20 Segundo Kowalewski et al. [3, 21] a luteólise observada em cadelas pré
21 parto parece estar relacionada a um processo imunológico agudo guiado pela
22 PGF2 α proveniente da complexo útero/placenta, controle negativo da
23 angiogênese e esteroidogênese, degradação de mitocôndrias e apoptose,
24 contrastando com um processo lento de remodelamento morfológico e
25 funcional do *corpo albicans* em cadelas não gestantes, sem o envolvimento do
26 sistema imune. Essa descrição nos parece lógica quando confrontamos os
27 resultados obtidos nesse experimento onde fatores anti-angiogênicos - THBS2
28 e TGFB1, IGFBP5 e VEGFA são mais expressos no grupo de fêmeas
29 gestantes no dia 60 que poderiam ser controlados pela PGF2 α , iniciando assim
30 uma das vias importantes da luteólise gestacional canina.

31

32 **5. CONCLUSÕES**

Os fatores angiogênicos selecionados foram diferencialmente expressos nos dias 40 e 60, especialmente no grupo das cadelas gestantes. Nos outros momentos avaliados não foram observadas diferenças na expressão dos fatores angiogênicos selecionados

Os fatores anti-angiogênicos THBS2, TGFB1, VEGFA e IGFBP5 apresentaram acentuada expressão no momento 60 dias do diestro gestacional. A endotelina foi mais expressa no dia 60, no grupo das cadelas pseudogestantes.

As técnicas de RT-PCR e imunofluorescência foram satisfatórias e apresentaram resultados compatíveis entre si.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa com bolsa no país, mas também pela bolsa de intercâmbio no Canadá.

7. REFERÊNCIAS

[1] Kowalewski MP. Endocrine and molecular control of luteal and placental function in dogs: a review. *Reprod Domest Anim.* 2012;47:19-24.<https://doi.org/10.1111/rda.12036>.

[2] Kowalewski MP. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reproduction Biology* 2014;14:89-102.<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.11.004>

[3] Kowalewski MP, Zatta S, Gram A. The crafty and cunning canine CL: understanding its development and regulation. *Proceedings of the 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction ISCVR June 22-25,* 2016.<https://www.ivis.org/proceedings/iscvr/2016/7>.

[4] Concannon PW, Powers ME, Hansel W. Pregnancy and Parturition in the

- 1 bitch. Biology of Reproduction 1977; 16:517-526.
2
- 3 [5] Concannon PW. Endocrinologic control of normal canine ovarian function.
4 Reprod Domest Anim 2009; 44:3-15.[https://doi.org/10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01414)
5 0531.2009.01414.
6
- 7 [6] Concannon PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. Anim Reprod Sci
8 2011; 124:200-210.<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028>
9
- 10 [7] Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of
11 ovulation, pregnancy and parturition in the dog. J Reprod Fertil Suppl 1989;
12 39:3-25.
13
- 14 [8] Hoffmann B, Hoveler R, Hasan SH, Failing K. Ovarian and pituitary function
15 in dogs after hysterectomy. Journal of Reproduction and Fertility 1992; 96:837-
16 845.
17
- 18 [9] Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. Canine and Feline Theriogenology..
19 Philadelphia: Saunders; 2001.
20
- 21 [10] La Paz MN, Fonseca VU, Campos DB, Artoni LP, Sousa LMMC, Papa PC.
22 Produção de progesterona *in vitro* pelas células do corpo lúteo bovino ao longo
23 da gestação. Pesq Vet Bras 2007; 27:370-
24 376.<http://www.scielo.br/pvbr/v27n9/v27n9a03.pdf>
25
- 26 [11] Reynolds L, Grazul-Bilska A, Redmer D. Angiogenesis in the corpus
27 luteum. Endocrine 2000; 12:1-9. <http://doi.org/10.1385/ENDO:12:1:1>
- 28 [12] Schams D, Berisha B. Regulation of corpus luteum functions in cattle: an
29 overview. Reprod Domest Anim 2004; 39:241-251.
30 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00509>.
31
- 32 [13] Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW.
33 Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum.

- 1 Physiological reviews 2000; 80:1-29.
2 <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1>
3
- 4 [14] Hase M, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T. Plasma LH and progesterone
5 levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by
6 ultrasonographic diagnosis system in dogs. Journal Veterinary Medical Science
7 2000; 62:243-248. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.243>
8
- 9 [15] Derussi AP, Chirinea VH, Karaccas Y, Araujo, GHM Alvarenga, FC Lopes,
10 MD. Efeito do benzoato de estradiol na recuperação de oócitos, embriões e nos
11 parâmetros hematológicos de cadelas recém-acasaladas. Ars veterinária 2012;
12 28:60-65. <http://hdl.handle.net/11449/137116>
13
- 14 [16] Mariani TC, Do Prado C, Silva LG, Paarman FA, Lima MC, Carvalho I,
15 Campos DB, Artoni LP, Hernandez-Blazquez FJ, Papa PC.
16 Immunohistochemical localization of VEGF and its receptors in the corpus
17 luteum of the bitch during diestrus and anestrus. Theriogenology 2006;
18 66:1715-1720.
19 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.030>
20
- 21 [17] Ribeiro AA, Martin I, Derussi AA, Ferioli RB, Laufer-Amorim R, Lopes MD.
22 Histological Characterization and Immunohistochemical Localization of Ki-67
23 and VEGF Factors in Bitches' Corpus Luteum at Cyclic and Early and Late
24 Gestational Diestrus. Reproduction in Domestic Animals 2012; 47:61-65.
25 <https://doi.org/10.1111/rda.12056>
26
- 27 [18] Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW. Involvement of pro-
28 inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth
29 factor in prostaglandin F2 α -induced luteolysis in bovine corpus luteum. Biol
30 Reprod 2004; 70:473-480. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016154>
31
- 32 [19] Robinson RS, Woad KJ. Luteal Angiogenesis. The Life Cycle of the Corpus
33 Luteum; 2017, p. 01-21.

1

2 [20] Smith GW, Meidan R. Ever-changing cell interactions during the life span of
3 the corpus luteum: relevance to luteal regression. Reproductive Biology 2014;
4 14:75-82. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.12.004>

5

6 [21] Kowalewski MP. Regulation of corpus luteum in the domestic dog (*Canis*
7 *familiaris*) and comparative aspects of luteal function in the domestic cat (*Felis*
8 *catus*). The life cycle of the corpus luteum; 2017, p. 133-157.

9 [22] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific
10 article. J Sci Commun 2010;163:51ñ9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.