

Estradiol-17 β altera expressão proteica endometrial em fêmeas bovinas tratadas no 17^o dia do ciclo estral

17 β -estradiol alters endometrial protein expression in bovine females treated at the 17th day of estrous cycle

Sérgio Silva ALVES JUNIOR¹; Fernanda Cavallari de CASTRO²; Natália SOARES²; Flávia Thomaz Verechia PEREIRA²; Júlio Cesar de Carvalho BALIEIRO³; Flávia Simone MUNIN³; Marcelo de Cerqueira CESAR³; Mario BINELLI⁴; Claudia Maria Bertan MEMBRIVE²

¹Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba-SP, Brasil

²Faculdade de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Dracena-SP, Brasil

³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, Brasil

⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP, Brasil

Resumo

Em fêmeas bovinas, a liberação de prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) é induzida *in vivo* pelo estradiol (E₂). Acredita-se que o E₂ estimule a síntese de proteínas essenciais na produção de PGF_{2 α} . Objetivou-se avaliar o efeito do E₂ no incremento da concentração de proteínas totais e na modificação da composição proteica em explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E₂ no 17^o dia do ciclo estral. Novilhas cruzadas foram tratadas no 17^o dia do ciclo estral, via intravenosa, com 0 mg (Grupo Controle; n = 6) ou 3 mg de E₂ (Grupo E₂; n = 6) e abatidas duas horas após. Explantes endometriais foram isolados, submetidos à extração de proteínas totais, quantificados e avaliados por Eletroforese Unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE. A concentração de proteínas totais não diferiu entre os grupos, 6296,10 \pm 439,90 μ g/mL para o Grupo Controle e 8426,56 \pm 1156,00 μ g/mL para o Grupo E₂ (p = 0,1158). Não houve diferença significativa (p > 0,05) no perfil proteico dos explantes endometriais em géis corados com Coomassie Blue. Em géis corados com Nitrato de Prata verificou-se no Grupo E₂ maior porcentagem relativa das bandas referentes ao peso molecular de 75 a 76 kDa (8,40% vs. 4,89%; no Grupo E₂ e Controle respectivamente; p < 0,05) e 108 a 110 kDa (6,85% vs. 3,84%; no Grupo E₂ e Controle respectivamente; p < 0,05). Observou-se no Grupo E₂ menor porcentagem relativa da banda referente ao peso molecular de 90 kDa (5,78% vs. 9,83%; no Grupo E₂ e Controle respectivamente; p < 0,05). Conclui-se que o E₂ não incrementa a concentração de proteínas no endométrio, entretanto, altera a composição proteica nos explantes endometriais, indicando que o E₂ altera a expressão de proteínas específicas.

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

Abstract

In bovine females the release of prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) is induced *in vivo* by estradiol (E₂). It is believed that E₂ stimulates the synthesis of essential proteins for the production of PGF_{2 α} . This study aimed to evaluate the effect of E₂ in increasing the concentration of total protein and modifying the protein composition of endometrial explants from bovine females treated with E₂ at the 17th day of estrous cycle. Crossbred heifers were treated at 17th day of estrous cycle intravenously with 0 mg (Control Group; n = 6) or 3 mg of E₂ (E₂ Group; n = 6) and killed two hours after. Endometrial explants were isolated, subjected to extraction of total protein, quantified and were analyzed by one-dimensional electrophoresis on polyacrylamide gel 10% SDS-PAGE. The concentration of total protein did not differ between groups, 6296.10 \pm 439.90 μ g/mL for the Control Group and 8426.56 \pm 1156.00 μ g/mL for E₂ Group (p = 0.1158). There was no significant difference (p > 0.05) in the protein profile of endometrial explants in gels stained with Coomassie Blue. In gels stained with Silver Nitrate it was verified in E₂ Group greater relative percentage of the bands referring to the molecular weight of 75 to 76 kDa (8.40% vs. 4.89% in E₂ Group and Control respectively; p < 0.05) and 108 to 110 Kda (6.85% vs. 3.84% in E₂ Group and Control respectively; p < 0.05). It was observed in E₂ Group lower relative percentage of the band referring to the molecular weight of 90 kDa (5.78% vs. 9.83% in E₂ Group and control respectively; p < 0.05). We concluded that the E₂ does not increase the protein concentration in the endometrium, however, it modifies the proteinic composition in the endometrial explants, indicating that E₂ alters the expression of specific proteins.

Keywords: Bovine. Estradiol. Luteolysis. Prostaglandin F_{2 α} .

Correspondência para:

Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive
Faculdade de Zootecnia - UNESP, Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros (SP 294),
Km 651, Campus da UNESP, Dracena/SP

CEP 17900-000, Tel (18) 38218200 - Ramal 8241
cbertan@dracena.unesp.br

Recebido: 01/03/2009

Aprovado: 09/12/2010

Introdução

A luteólise é caracterizada pela falência do corpo lúteo (CL) na síntese de progesterona (P_4) e pelo decréscimo nas concentrações séricas de P_4 ¹. Tal evento fisiológico torna-se imprescindível para o crescimento final do folículo dominante, manifestação de estro e ovulação. A prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) é a principal molécula luteolítica em fêmeas ruminantes. A luteólise é determinada pela ligação da $PGF_{2\alpha}$ a receptores localizados nas células luteais esteroidogênicas^{2,3}. A luteólise é desencadeada pela ocorrência de cinco a oito pulsos de $PGF_{2\alpha}$, liberados pelo endométrio durante um período de dois a três dias, compreendido entre o 15º e 19º dias do ciclo estral^{4,5,6,7}. A produção de $PGF_{2\alpha}$ é mensurada *in vivo* por meio do seu principal metabólito, a 13,14-dihidro-15-ceto- $PGF_{2\alpha}$ (PGFM)⁸. Em fêmeas bovinas, durante a fase luteínica, a concentração basal de PGFM varia de 10 a 100 pg/mL. Durante a luteólise, a PGFM é produzida em picos com duração de duas a cinco horas, em intervalos que variam de duas a 30 horas e atinge concentrações plasmáticas de 150 a 500 pg/mL^{9,10}.

A síntese de $PGF_{2\alpha}$ no endométrio de fêmeas bovinas resulta de uma complexa cascata de eventos intracelulares que ocorrem de maneira altamente coordenada. O modelo celular da biosíntese de $PGF_{2\alpha}$ a partir do ácido araquidônico (AA) foi descrito por Burns et al.¹¹. Neste modelo, a ocitocina (OT) se liga ao seu receptor nas células endometriais, e este associado à proteína G ativa a enzima fosfolipase C (PLC). A PLC ao ser ativada cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de cálcio do interior do retículo endoplasmático para o citosol. O DAG ativa resíduos de serina/treonina da proteína quinase C (PKC). A PKC pertence a uma família de enzimas que está envolvida no controle da função de outras proteínas, por meio da fosforilação

dos grupos hidroxilo dos resíduos de aminoácidos serina e treonina^{12,13}. Nas células endometriais, a PKC uma vez ativada, fosforila a fosfolipase A2 (PLA2). O aumento da concentração de cálcio no citosol, induzido pelo IP_3 age estimulando a atividade da PLA2, enzima cálcio-dependente¹⁴. A PLA2 cliva a fosfatidilcolina preferencialmente na posição Sn-2, liberando o ácido araquidônico (AA)¹⁵. A forma inativa da PLA2c localiza-se no citosol, no entanto, quando a PLA2c torna-se ativada, se transfere do citosol para a membrana para mobilizar AA¹⁶. A hidrólise do AA da membrana fosfolipídica pela PLA2 é fundamental na síntese de $PGF_{2\alpha}$ ¹⁷. A seguir, o AA livre é convertido a prostaglandina H_2 (PGH_2) pela enzima cicloxigenase 2 (COX-2). Há duas isoformas de cicloxigenase que catalisam a conversão do AA em PGH_2 , a cicloxigenase 1 (COX-1) e a COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos¹⁸, enquanto a COX-2 é expressa apenas em alguns tecidos do organismo¹⁹. A PGH_2 por ação da enzima prostaglandina endoperoxidase H sintase (PGHS) é convertida em $PGF_{2\alpha}$ ¹⁸. Em ovinos, um mecanismo de “feedback” positivo estimulado pela OT parece promover a liberação pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio²⁰. A OT proveniente da neurohipófise estimula a produção de $PGF_{2\alpha}$ endometrial e esta por sua vez, estimula a liberação de OT pelo CL, que atua estimulando ainda mais a liberação de $PGF_{2\alpha}$ endometrial, caracterizando um sistema de retroalimentação positiva. Até recentemente este mecanismo de desencadeamento da luteólise também era aceito para bovinos. Porém, a utilização do CAP-527 (um antagonista para receptor de OT), antes e durante o período da luteólise, não alterou a duração da fase luteínica e do ciclo estral em bovinos^{21,22}. Esses resultados permitiram evidenciar que a OT desempenharia um papel facilitador e não essencial no desencadeamento da luteólise. Acredita-se que a OT atue modulando a amplitude dos pulsos de $PGF_{2\alpha}$ durante a luteólise em bovinos²³. Visto que a OT não é imprescindível para a ocorrência da luteólise

se, muitos pesquisadores vêm focalizando o E_2 como principal indutor da luteólise em bovinos.

Em alguns estudos *in vivo* verificou-se que o estradiol-17 β (E_2) é capaz de estimular a expressão dos receptores endometriais de OT^{24,25,26}. Foi proposto que o estradiol produzido nos folículos ovarianos interage com os receptores de estradiol no endométrio e ocasiona o aumento da expressão gênica dos receptores de ocitocina nas células endometriais, determinante para conduzir a liberação pulsátil de PGF_{2 α} ¹⁸. A administração de E_2 no 15º dia do ciclo estral promove a luteólise em bovinos^{27,28}. De fato, a administração de E_2 em novilhas no 13º dia do ciclo, promoveu a luteólise e o aumento nas concentrações de PGFM²⁹. O E_2 endógeno ou exógeno é capaz de induzir a produção de PGF_{2 α} e promover uma diminuição nas concentrações de P₄ circulante em razão da regressão do CL³⁰. Em contrapartida, a extirpação de folículos ovarianos por irradiação ou cauterização, procedimentos que ocasionam uma supressão temporária do E_2 circulante, retardam a luteólise em bovinos^{31,32,33}. Salfen et al.³⁴ evidenciaram um atraso na luteólise em vacas cujo desenvolvimento da segunda onda folicular foi inibido. Neste estudo, a remoção de E_2 resultou no prolongamento do ciclo estral e na ausência da luteólise. A partir dos dados reportados na literatura, admite-se que o E_2 assume um papel fundamental na luteólise, entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não foram elucidados.

Em experimentos *in vivo*, verificou-se que a concentração sérica de PGFM aumentou 15 minutos após a injeção de OT e somente 3,5 horas após a injeção de E_2 ³⁵. Sugere-se por tais evidências, que o E_2 estimularia a síntese de proteínas envolvidas na cascata geradora de PGF_{2 α} , enquanto a OT ativaria enzimas presentes no meio intracelular. Cunha³⁶ sugeriu que a produção de PGF_{2 α} *in vitro* parece não ser resultado unicamente da ativação de enzimas, mas da dependência de eventos complexos responsáveis pela expressão de proteínas celulares. De acordo com Bertan³⁷, o tratamento com E_2 *in vivo*, duas horas antes das vacas serem

abatidas no 17º dia do ciclo estral, associado à adição de CI *in vitro* em explantes endometriais provenientes desses animais exacerbou a síntese de PGF_{2 α} quando comparado ao grupo de vacas não tratadas com E_2 *in vivo* e em explantes não tratados com CI. O mesmo foi observado em experimentos utilizando células endometriais bovinas expostas ao E_2 e CI simultaneamente³⁷. Bertan³⁷ sugere que o E_2 estimularia a síntese das enzimas PKC e PLA2, ambas determinantes na síntese de PGF_{2 α} . Hipotetizou-se que a administração de E_2 em fêmeas bovinas no 17º dia do ciclo estral incrementa a concentração de proteínas no endométrio e modifica a composição proteica nos explantes endometriais. Para testar esta hipótese, avaliou-se o efeito do estradiol no incremento da concentração de proteínas totais no endométrio e na modificação da composição proteica nos explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E_2 no 17º dia do ciclo estral. Para estabelecer tal análise comparativa foi empregada a técnica de separação das proteínas por eletroforese unidimensional.

Material e Método

Animais. Foram utilizadas 12 novilhas mestiças (*Bos taurus taurus x Bos taurus indicus*), de idade variável (entre 36 a 48 meses), não gestantes. Os animais foram mantidos em piquetes, com água à disposição. A alimentação foi baseada no pastejo (*Brachiaria decumbens* var. *marandu*) complementada com suplementação mineral. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 273/ 2003). Os animais utilizados obrigatoriamente seriam abatidos pela prefeitura do Campus de Pirassununga, condição que viabilizou o aproveitamento dos mesmos na execução do presente estudo.

Sincronização dos estros. Para a indução dos estros, as novilhas receberam 150 μ g de D-cloprostenol

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

Tratamento *in vivo*. Novilhas pareadas de acordo com a data de apresentação dos estros foram, no 17º dia do ciclo estral, tratadas via intravenosa com 0 mg (Grupo Controle; n = 6) ou 3 mg de estradiol-17 β (Grupo E₂; n = 6). Duas horas após a administração dos tratamentos a novilhas foram abatidas por concussão cerebral pelo uso de pistola pneumática. O sistema reprodutivo foi isolado e transportado ao laboratório a 4 °C.

Isolamento e conservação dos explantes endometriais. No laboratório, os fragmentos de endométrio foram isolados da região intercaruncular, do corpo e ambos os cornos uterinos. Os explantes endometriais foram acondicionados em placas de Petri contendo Meio Bicarbonato Krebs-Henseleit [KHB; NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,56 mM, MgCl₂ 1,13 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1,15 mM, glicose 5,55 mM, Hepes 20 mM e vermelho fenol 0,013 mM; pH 7,4]. No mesmo meio, os explantes foram submetidos a quatro lavagens consecutivas. Os explantes foram acondicionados em criotubos e armazenados a -20 °C.

Extração de proteínas do tecido endometrial. Os explantes endometriais foram descongelados a 4 °C e pesados. Para cada dois gramas de endométrio foram acrescidos 10 mL de solução para a extração de proteínas (EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM; NaCl 300 mM; NP-40 1%; Tris 50 mM pH

8,0; Glicerol 10%; Aprotinina 10 μ g/mL; Leupeptina 10 μ g/mL e Pepstatina 10 μ g/mL). Tal mistura, foi submetida à maceração com o auxílio de um homogeneizador de tecidos com velocidade de 1200 rpm, até que as estruturas teciduais fossem completamente desintegradas. A solução contendo o macerado foi centrifugada a 800 g a 4 °C, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante submetido a uma segunda centrifugação a 15000 g a 4 °C, durante 20 minutos. A concentração de proteínas totais contidas nas diferentes amostras de extratos endometriais foi estimada pelo Método de Bradford³⁸.

Delineamento Experimental. As amostras contendo as proteínas totais extraídas dos explantes endometriais foram submetidas à técnica de eletroforese unidimensional em Gel de Poliacrilamida 10% com SDS-PAGE. Utilizou-se o padrão de peso molecular RPN800E (GE Healthcare) contendo proteínas com os pesos moleculares de 225; 150; 102; 76; 52; 38; 31; 24; 17 e 12 kDa. Posteriormente, os géis foram corados com Nitrato de Prata e Coomassie Blue. A quantidade de proteína total administrada em cada poço de eletroforese foi de 20 μ g e 40 μ g, para os géis corados com Nitrato de Prata e Coomassie Blue, respectivamente. Os géis foram confeccionados em triplicata.

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

pela densidade óptica total da amostra e o resultado multiplicado por 100.

Análise Estatística. Realizou-se uma análise comparativa da concentração total de proteínas dos explantes endometriais no grupo controle e grupo tratado com E_2 . Foram estimados a média e o erro padrão da média por meio do programa GraphPad InStat Versão 3.0. Foram realizadas análises descritivas para as variáveis percentagens das bandas (P_BANDAS) e Peso Molecular (PES_MOL) relacionadas às avaliações obtidas por eletroforese. As análises descritivas foram realizadas por meio de procedimento PROC MEANS do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3³⁹. Para a porcentagem das bandas (P_BANDAS) foi utilizada a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz da porcentagem” (ASPBANDA), procedendo-se à análise de variância e os demais procedimentos com os dados transformados. Para apresentação dos resultados, os dados foram retornados à escala original. Para avaliação das percentagens das bandas em escala original (P_BANDAS) e transformada (ASPBANDA), bem como para o Peso Molecular (PES_MOL), segundo os diferentes gru-

pos comparativos, utilizou-se o procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3³⁹. No modelo estatístico, foi considerado o efeito principal do gel, tratamento e o efeito das avaliações serem repetidas nos mesmos animais. Quando foram verificados resultados significativos ($p < 0,05$) para fonte de variação “tratamentos”, foi utilizado como procedimento de comparação múltipla o Teste *t* de *Student*.

Resultados

Concentração de proteína total dos explantes endometriais. As concentrações proteicas variaram entre os animais de um mesmo grupo, e foram de 4678,22 a 7973,33 $\mu\text{g/mL}$ para o grupo controle e de 5428,00 a 11351,56 $\mu\text{g/mL}$ no grupo E_2 . As médias e erro padrão da média das concentrações de proteínas totais nos explantes endometriais foram de 6296 ± 440 $\mu\text{g/mL}$ para o grupo controle e 8426 ± 1156 $\mu\text{g/mL}$ para o grupo E_2 (Figura 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p > 0,05$).

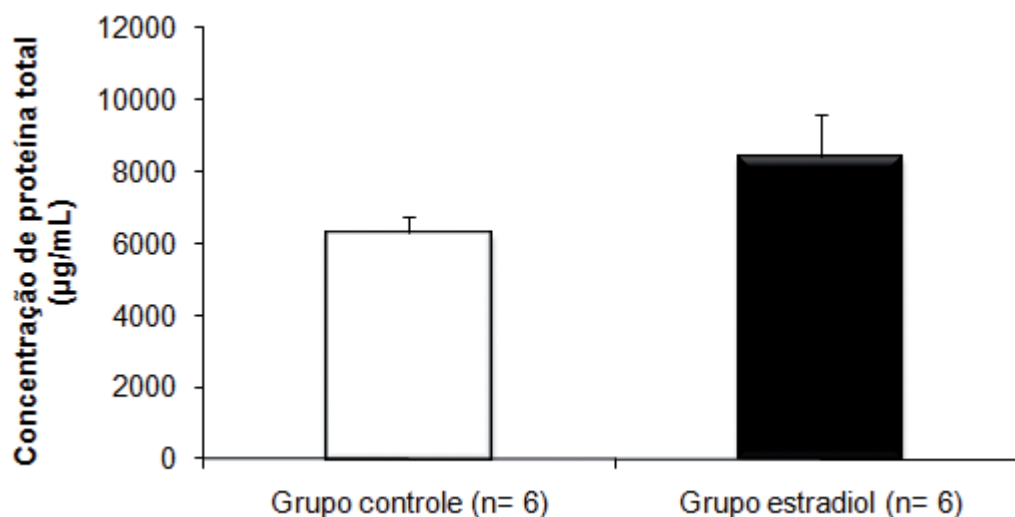


Figura 1 - Média e erro padrão da média da quantidade de proteína total ($\mu\text{g/mL}$) mensurada em extratos de explantes endometriais obtidos de novilhas não tratadas (Grupo Controle; $n = 6$) ou tratadas, via intravenosa, com 3 mg de estradiol-17 β (Grupo E_2 ; $n = 6$) no 17º dia do ciclo estral – Dracena - 2010

Perfil proteico dos explantes endometriais em géis corados por Coomassie Blue. O número de bandas identificadas nas amostras diferiu entre os animais pertencentes a um mesmo grupo de tratamento. Desta maneira, para fins estatísticos foram comparadas as bandas do animal que apresentou o menor número de bandas formadas, descartando as bandas excedentes das demais. Foram verificadas 18 bandas proteicas. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre animais controles ou tratados com estradiol.

Perfil proteico dos explantes endometriais em géis corados por Nitrato de Prata. Foram verifica-

das 12 bandas proteicas (Figura 2). As porcentagens relativas de cada banda identificada com seu respectivo peso molecular estão representadas na tabela 1. Verificou-se no Grupo E_2 maior porcentagem relativa das bandas referentes ao peso molecular de 75 a 76 kDa (8,40% vs. 4,89%; no Grupo E_2 e Controle respectivamente; $p < 0,05$) e 108 a 110 kDa (6,85% vs. 3,84%; no Grupo E_2 e Controle respectivamente; $p < 0,05$). Observou-se no Grupo E_2 menor porcentagem relativa da banda referente ao peso molecular de 90 kDa (5,78% vs. 9,83%; no Grupo E_2 e Controle respectivamente; $p < 0,05$).

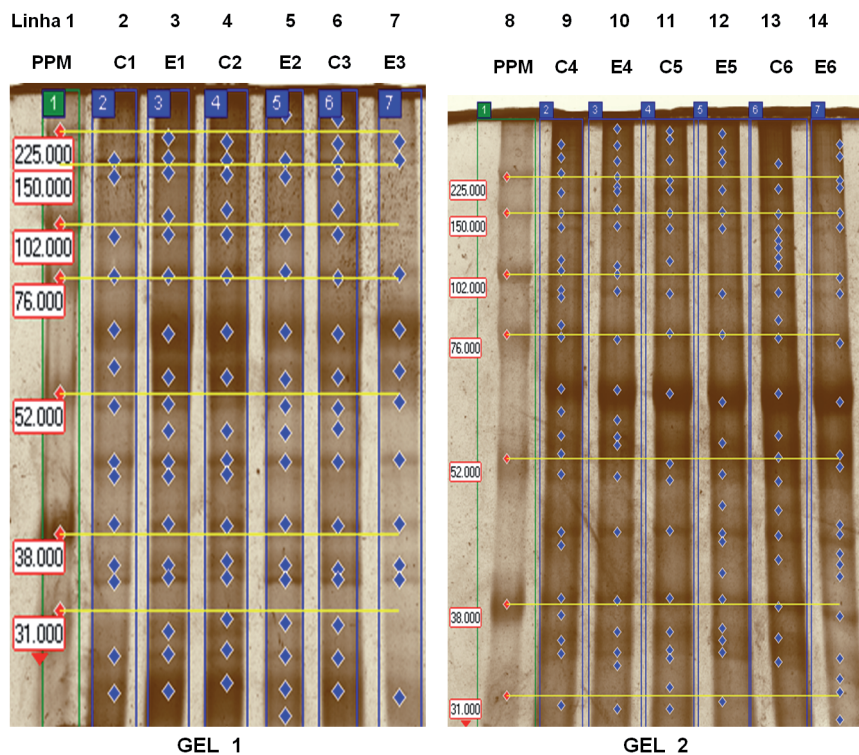


Figura 2 - Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE corado com Nitrato de Prata. GEL 1: Padrão de Peso Molecular (PPM) onde os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31 kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (Linha 1); Animal C1 (Linha 2); Animal E1 (Linha 3); Animal C2 (Linha 4); Animal E2 (Linha 5); Animal C3 (Linha 6) e Animal E3 (Linha 7). GEL 2: PPM idem Gel 1 (Linha 8); Animal C4 (Linha 9); Animal E4 (Linha 10); Animal C5 (Linha 11); Animal E5 (Linha 12); Animal C6 (Linha 13) e Animal E6 (Linha 14). Foram aplicados 20 μ g de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animais C1, C2, C3, C4, C5 e C6; Grupo Controle) e tratadas com 3 mg de estradiol-17 β (Animais E1, E2, E3, E4, E5 e E6; Grupo E_2) no 17 $^\circ$ dia do ciclo estral - representativo de 3 (três) repetições - Draçena - 2010

Tabela 1 - Número de bandas identificadas nas amostras de cada linha, pesos moleculares das bandas (kDa) e porcentagem relativa de proteína referente a cada banda em relação à proteína total extraída de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Grupo Controle; n = 6) e tratadas com estradiol-17 β (Grupo E₂; n = 6) no 17º dia do ciclo estral, submetidas à eletroforese unidimensional em Gel de Poliacrilamida a 10% SDS-PAGE coradas por Nitrato de Prata – Dracena - 2010

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

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

Discussão

Embora tenha sido suficientemente reportada a importância do E₂ na luteólise de fêmeas bovinas^{18,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34}; os mecanismos pelos quais o E₂ desempenha tal função permanecem desconhecidos. Considerando que a ação do E₂ requer de 3 a 3,5 horas para que as concentrações de PGFM sejam aumentadas e 6 a 6,5 horas para que atinjam o pico³⁷, acredita-se que a ação do E₂ envolva a síntese de proteínas endometriais. De fato, Cunha³⁶ sugeriu que a produção de PGF_{2 α} *in vitro* seja dependente da expressão de proteínas celulares. No presente estudo, explantes endometriais de novilhas tratadas com E₂ não apresentaram incremento na concentração das proteínas totais que constituem o endométrio. Entretanto, neste estudo, foram verificadas modificações no perfil proteico dos explantes endometriais quando as amostras submetidas à eletroforese unidimensional foram coradas com Nitrato de Prata. Assim, embora o E₂ não tenha incrementado o conjunto de proteí-

nas totais do tecido endometrial, verificou-se que o E₂ promove o aumento de duas proteínas específicas. Tais proteínas poderiam ser determinantes na síntese de PGF_{2 α} .

No presente estudo, diferenças na porcentagem relativa de tais proteínas foram verificadas apenas na coloração com Nitrato de Prata. De fato, Berg, Tymoczko e Stryer⁴⁰ sugeriram que a coloração com Coomassie Blue detecta as proteínas existentes em uma amostra com concentração mínima de 0,1 μ g, enquanto a coloração com Nitrato de Prata detecta proteínas com concentração a partir de 0,02 μ g, o que a torna uma coloração mais sensível.

Nos géis corados com Nitrato de Prata verificou-se que a banda com peso molecular de 75 a 76 kDa, apresentou maior porcentagem relativa no grupo E₂ em comparação ao grupo controle (8,40% vs. 4,89%; no Grupo E₂ e Controle respectivamente; $p < 0,05$). Bertan³⁷ sugere que o E₂ estimularia a síntese das enzimas PKC e PLA2, ambas determinantes na síntese

de $\text{PGF}_{2\alpha}$. No presente estudo, considerando o peso molecular da proteína em questão, admite-se que tal proteína possa se referir a enzima PKC. Segundo Hofmann⁴¹ a família PKC pode ser dividida em subtipos: PKCs clássicas ou convencionais, dependentes de cálcio e fosfolipídios para sua ativação; novas PKCs, que embora possuam um domínio para o cálcio não requerem o mesmo para sua ativação e as PKCs atípicas que não são dependentes de cálcio e fosfolipídios para sua ativação. Tal proteína é composta de duas subunidades, designadas de α e β . A subunidade α é caracterizada como regulatória e apresenta os domínios C1 e C2. O domínio C1 é responsável pela ligação da molécula ao diacilglicerol (DAG) e ao éster de forbol. O domínio C2 possibilita a ligação da molécula com o cálcio. A subunidade β representa a porção catalítica, altamente conservada dentre as diferentes isoformas. Tal subunidade apresenta os domínios C3 e C4, responsáveis pela ligação do ATP e do substrato, respectivamente⁴². De acordo com Michie e Nakagawa⁴², a família das proteínas quinases C é composta por mais de 10 isoformas, que inicialmente foram subdivididas em 3 classes ou subfamílias. A classe α , com peso molecular de 76,83 kDa é formada por uma sequência de 672 aminoácidos. A classe β , subdividida em βI e βII , apresenta peso molecular de 76,91 kDa e é formada por uma sequência de 673 aminoácidos. A classe γ , com peso molecular de 77,15 kDa, é formada por uma sequência de 682 aminoácidos. Estas três isoenzimas apresentam como característica sítios de ligação para o éster de forbol e para o cálcio. Alberts et al.¹² relatam que a degradação do PIP₂ a IP₃ e DAG é realizada pela PKC isotipo β , dependente de cálcio e fosfolipídeos para sua ativação, entretanto, tal isotipo não foi identificado em células BEND. Nestas células predomina a PKC α e está dependente de cálcio⁴³. Hu, Braileanu e Miranda⁴⁴ utilizando inibidores específicos para as diferentes isoformas de PKC verificaram que a PKC α , PKC βII , PKC γ e PKC ϵ estavam presentes em células epiteliais luminais do endomé-

trio. A ativação da PKC pode ser farmacologicamente induzida pelo uso de fórbol ésters. Tais compostos têm sido utilizados para induzir a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células endometriais primárias ou explantes cultivados^{43,45,46}. A ativação da PKC por fórbol éster resultou no aumento de RNAm e na expressão da COX-2 em células endometriais bovinas BEND^{47,48}. Para a identificação da tal banda proteica com densidade relativa maior quando comparada ao grupo controle, com 75 a 76 kDa, em continuidade a este estudo, as amostras endometriais avaliadas serão submetidas à técnica de Western Blotting.

Nos géis corados com Nitrato de Prata, verificou-se que a banda com peso molecular de 108 a 110 kDa, apresentou maior porcentagem relativa no grupo E₂ em comparação ao grupo controle (6,85% vs. 3,84%; no Grupo E₂ e Controle respectivamente; $p < 0,05$). Sugere-se que tal proteína possa se referir a enzima PLA2, proteína integrante da cascata de formação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. A PLA2 é formada por uma sequência de 749 aminoácidos⁴⁹. Godkin et al.⁵⁰, realizaram um estudo em que verificaram o papel da PLA2 na regulação da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células endometriais bovinas. Analisando as proteínas obtidas dos extratos celulares por Western Blotting, No endométrio bovino foram identificadas a PLA2 do grupo IV (PLA2G4A e PLA2G4C) e do grupo VI (PLA2G6). Os mesmos autores, observaram que o anticorpo PLA2G4A reconhece uma proteína com aproximadamente 110 kDa e uma proteína de massa ligeiramente inferior, de aproximadamente 107 kDa, que pode ter sido um produto de sua degradação. De fato, Burns et al.¹⁶ identificaram a PLA2 como uma proteína com peso molecular de aproximadamente 100-110kDa. A família da PLA2 é subdividida em três subfamílias: as isoformas cálcio independentes (iPLA2); as enzimas citosólicas de alto peso molecular cálcio-dependentes (cPLA2s) e as enzimas secretórias de baixo peso molecular cálcio-dependentes (sPLA2-IB, sPLA2-IIA). A subfamília cPLA2 é composta por

três enzimas que dividem as mesmas características estruturais sem se tornarem funcionalmente redundantes: PLA2G4A (cPLA2a), PLA2G4B (cPLA2b) e PLA2G4C (cPLA2c)⁵¹.

Evidenciou-se em alguns estudos que a melitina, um estimulador da atividade da PLA2, promoveu a liberação de PGF_{2α} no endométrio bovino; enquanto que o ácido aristolóquico, um inibidor da atividade da PLA2, bloqueou a liberação de PGF_{2α} induzida por OT, por melitina e por AIF-4, um estimulador inespecífico de proteína G, porém não completamente. A partir dos efeitos da melitina e do ácido aristolóquico sugeriu-se que a PLA2 poderia mediar os efeitos estimulatórios da OT sobre a secreção de PGF_{2α}¹¹. As enzimas PLA2 podem exercer diferentes funções, dentre estas, remove das membranas fosfolipídicas o AA, ácido graxo essencial à síntese de PGF_{2α}, através da catalização da hidrólise na posição Sn-2 da membrana glicerofosfolipídica, essencial para a disponibilização de AA para a síntese de PGF_{2α}¹⁴.

A partir da determinação das alterações verificadas no perfil proteico dos explantes endometriais, em

concordância a Bertan³⁷, sugere que o E₂ estimularia a síntese das enzimas PKC e PLA2, ambas determinantes na síntese de PGF_{2α}. Tal hipótese poderá ser confirmada em um próximo estudo, pela utilização de anticorpos específicos para a PLA2 e PKC, pelo emprego da técnica de Western Blotting.

Conclusão

Conclui-se que não houve efeito do estradiol no incremento da concentração de proteínas totais no endométrio. Houve modificações na composição proteica dos explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E₂ no 17º dia do ciclo estral, indicando que o E₂ altera a expressão de proteínas específicas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

Referências

1. GORAVANAHALLY, M. P.; SEN, A.; INSKEEP, E. K.; FLORES, J. A. PKC epsilon and an increase in intracellular calcium concentration are necessary for PGF_{2α} to inhibit LH-stimulated progesterone secretion in cultured bovine steroidogenic luteal cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 5, p. 37, 2007.
2. CHEN, D. B.; WESTFALL, S. D.; FONG, H. W.; ROBERSON, M. S.; DAVIS, J. S. Prostaglandin F_{2α} stimulates the Raf/MEK1/Mitogen-activated protein kinase signaling cascade in bovine luteal cells. **Endocrinology**, v. 139, n. 9, p. 3876-3885, 1998.
3. ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F (2alpha) receptor in the corpus luteum, recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 4, p. 1041-1047, 2001.
4. NANCARROW, C. D.; BUCKMASTER, J.; CHAMLEY, W.; COX, R. I.; CUMMING, I. A.; CUMMINS, L.; DRINAN, J. P.; FINDLAY, J. K.; GODING, J. R.; RESTALL, B. J.; SCHNEIDER, W.; THORBURN, G. D. Hormonal changes around oestrous in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, n. 2, p. 320-321, 1973.
5. THORBURN, G. D.; COX, R. I.; CURRIE, W. B.; RESTALL, B. J.; SCHNEIDER, W. Prostaglandin F and progesterone concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the ewe during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 18, p. 151-158, 1973.
6. KINDAHL, H.; EDQUIST, L. E.; BANE, A.; GRANSTRÖM, E. Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F_{2α} during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers. **Acta Endocrinologica**, v. 82, n. 1, p. 134-149, 1976.
7. FREDRIKSSON, G.; KINDAHL, H.; EDQVIST, L. E. 11-Ketotetranor PGF metabolites, a suitable indicator for measuring protstaglandin release during the normal oestrous cycle and early pregnancy in the goat. **Animal Reproduction Science**, v. 7, n. 6, p. 537-545, 1984.
8. PIPER, P. J.; VANE, J. R.; WYLLIE, J. H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature**, v. 225, n. 5233, p. 600-604, 1970.
9. BASU, S.; KINDAHL, H. Development of a continuous blood collection technique and a detailed study of prostaglandin F_{2α} release during luteolysis and early pregnancy in heifers. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 34, n. 7, p. 487-500, 1987.
10. KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; JAROSZEWSKI, J.; WILLIAMS, G. L.; BOGACKI, M. Uterine secretion of prostaglandin F_{2α} stimulated by different doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 38, n. 3, p. 217-226, 1998.

11. BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S. H.; SILVA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF_{2α} synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 181-191, 1997.
12. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.
13. SEN, A.; CHOUDHARY, E.; INSKEEP, E. K.; FLORES, J. A. Effects of selective protein kinase C isozymes in prostaglandin F_{2α} induced Ca²⁺ signaling and luteinizing hormone induced progesterone accumulation in the mid-phase bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 4, p. 976-984, 2005.
14. CLARK, J. D.; LIN, L. L.; KRIZ, R. W.; RAMESH, C. S.; SULTZMAN, L. A.; LIN, A. Y.; MILONA, N.; KNOPF, J. L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, v. 65, n. 6, p. 1043-1051, 1991.
15. GIJON, M. A.; LESLIE, C. C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 3, p. 330-336, 1999.
16. BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S. H.; SILVA, W. J. Effect of oxytocin on expression of cytosolic phospholipase A₂ mRNA and protein in ovine endometrial tissue *in vivo*. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 19, n. 4, p. 237-246, 2000.
17. COYNE, G. S.; KENNY, D. A.; CHILDS, S.; SCREENAN, J. M.; WATERS, S. M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. **Theriogenology**, v. 70, n. 5, p. 772-782, 2008.
18. BALAGUER, S. A.; PERSHING, R. A.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L. Effects of bovine somatotropin on uterine genes related to the prostaglandin cascade in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 543-552, 2005.
19. SIMON, L. S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **American Journal of Medicine**, v. 106, n. 5B, p. 375-425, 1999.
20. McCracken, J. A.; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF_{2α} from ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 31-55. 1984.
21. KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; BOGACKI, M.; MELIN, P.; STAROSTKA, B. The use of an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 8, p. 1287-1299, 1997.
22. KOTWICA, G.; FRANCAZAK, A.; OKRASA, S.; KORWICA, J. Effect of an oxytocin antagonist on prostaglandin F_{2α} secretion and the course of luteolysis in sows. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 47, n. 2, p. 249-262, 1999.
23. OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J. Regulation of endometrial prostaglandin F_{2α} synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 255-264, 2002.
24. HIXON, J. E.; FLINT, A. P. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2 alpha secretion in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, n. 2, p. 457-567, 1987.
25. BEARD, A. P.; LAMMING, G. E. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF_{2α} release in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, n. 2, p. 469-475, 1994.
26. SPENCER, T. E.; BECKER, W. C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M. A.; OGLE, T. F.; BAZER, F. W. Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. **Endocrinology**, v. 136, n. 11, p. 4932-4944, 1995.
27. HANSEL, W.; CONCANNON, P. W.; LUKASZEWSKA, J. H. Corpora lutea of the large domestic animals. **Biology of Reproduction**, v. 8, p. 222-245, 1973.
28. GENGENBACH, D. R.; HIXON, J. E.; HANSEL, W. A luteolytic entanglement between estradiol and prostaglandin F_{2α} in hysterectomized ewes. **Biology of Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 571-576, 1977.
29. WOCLAWEK-POTOCA, I.; BOBER, A.; KORZEKWA, A.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D. J. Equol and para-ethyl-phenol stimulate prostaglandin F(2alpha) secretion in bovine corpus luteum: intracellular mechanisms of action. **Prostaglandins & Other Lipids Mediators**, v. 79, n. 3-4, p. 287-297, 2006.
30. AULETTA, F. J.; FLINT, A. P. F. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, non human primates and women, especially in relation to the time of luteolysis. **Endocrine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 88-105, 1988.
31. HUGHES, T. L.; VILLA-GODOY, A.; KESNER, J. S.; FOGWELL, R. L. Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin F_{2α} secretion in luteal regression. **Biology of Reproduction**, v. 36, n. 3, p. 523-529, 1987.
32. KARSH, F. J.; NOVEROSKE, J. W.; ROCHE, J. F.; NORTON, H. W.; NALBANDOV, A. V. Maintenance of ovine corpora lutea in absence of ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 87, n. 6, p. 1228-1236, 1970.
33. VILLA-GODOY, A.; IRELAND, J. J.; WORTMAN, J. A.; AMES, N. K.; FOGWELL, R. L. Luteal function in heifers following destruction of ovarian follicles. **Journal of Animal Science**, v. 53, p. 372, 1981. Supplement 1.
34. SALFEN, B. E.; CRESSWELL, J. R.; XU, Z. Z.; BAO, B.; GAVERICK, H. A. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of bovine estrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 15-21, 1999.
35. CASTRO E PAULA, L. A. **As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o papel da ocitocina na produção de PGF_{2α}**. 2003. 202 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
36. CUNHA, P. M. **O estímulo do estradiol na produção de PGF_{2α} endometrial é dependente da síntese de proteínas?** 2004. 146 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
37. BERTAN, C. M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F_{2α} no endométrio de fêmeas bovinas**. 2004. 180 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
38. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
39. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS user's guide: statistic. Release 6.03. Cary, NC: SAS, 1998. 1CD-ROM.
40. BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1059 p.
41. HOFMANN, J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. **The FASEB Journal**, v. 11, p. 649-669, 1997.

42. MICHIE, A. M.; NAKAGAWA, R. "The link between PKC alpha regulation and cellular transformation." **Immunology Letter**, v. 2, n. 96, p. 155-162, 2005.
43. GUZELUGLU, A.; MICHEL, F.; THATCHER, W. W. Differential effects of interferon- τ on the prostaglandin synthetic pathway in bovine endometrial cells treated with phorbol ester. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2032-2041, 2004.
44. HU, J.; BRAILEANU, G. T.; MIRANDO, M. A. Oxytocin stimulates prostaglandin F₂alpha secretion from porcine endometrial cells through activation of calcium-dependent protein kinase C. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 65, n. 2-3, p. 85-101, 2001.
45. ARNOLD, D. R.; BINELLI, M.; VONK, J.; ALEXENKO, A. P.; DROST, M.; WILCOX, C. J.; THATCHER, W. W. Intracellular regulation of endometrial PGF₂ α and PGE₂ production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon- τ . **Domestic Animal Endocrinology**, v. 18, p. 199-216, 2000.
46. PRU, J. K.; AUSTIN, K. J.; HAAS, A. L.; HANSEN, T. R. Pregnancy and interferon- τ upregulate gene expression of members of the 1-8 family in bovine uterus. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1471-1480, 2001.
47. XIAO, C. W.; GOFF, A. K. Hormonal regulation of estrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 101-109, 1999.
48. BINELLI, M.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; ARNOLD, D. R.; SIROIS, J.; HANSEN, T. R.; THATCHER, W. W. Interferon- τ modulates phorbol Ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase-2 from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 417-424, 2000.
49. DIOUF, M. N.; SAYASITH, K.; LEFEBVRE, R.; SILVERSIDES, D. W.; SIROIS, J.; LUSSIER, J. G. Expression of phospholipase A2 group IVA (PLA2G4A) is upregulated by human chorionic gonadotropin in bovine granulosa cells of ovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 1096-1103, 2006.
50. GODKIN, J. D.; ROBERTS, M. P.; ELGAYYAR, M.; GUAN, W.; TITHOF, P. K. Phospholipase A2 regulation of bovine endometrial (BEND) cell prostaglandin production. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, p. 44, 2008.
51. MURAKAMI, M.; KUDO, I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A2s. **Advances Experimental Medicine and Biology**, v. 525, p. 87-92, 2003.