

# Estradiol-17 $\beta$ altera expressão proteica endometrial em fêmeas bovinas tratadas no 17<sup>o</sup> dia do ciclo estral

## 17 $\beta$ -estradiol alters endometrial protein expression in bovine females treated at the 17<sup>th</sup> day of estrous cycle

Sérgio Silva ALVES JUNIOR<sup>1</sup>; Fernanda Cavallari de CASTRO<sup>2</sup>; Natália SOARES<sup>2</sup>; Flávia Thomaz Verechia PEREIRA<sup>2</sup>; Júlio Cesar de Carvalho BALIEIRO<sup>3</sup>; Flávia Simone MUNIN<sup>3</sup>; Marcelo de Cerqueira CESAR<sup>3</sup>; Mario BINELLI<sup>4</sup>; Claudia Maria Bertan MEMBRIVE<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Dracena-SP, Brasil

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

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

### Resumo

Em fêmeas bovinas, a liberação de prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) é induzida *in vivo* pelo estradiol (E<sub>2</sub>). Acredita-se que o E<sub>2</sub> estimule a síntese de proteínas essenciais na produção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Objetivou-se avaliar o efeito do E<sub>2</sub> no incremento da concentração de proteínas totais e na modificação da composição proteica em explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E<sub>2</sub> no 17<sup>o</sup> dia do ciclo estral. Novilhas cruzadas foram tratadas no 17<sup>o</sup> dia do ciclo estral, via intravenosa, com 0 mg (Grupo Controle; n = 6) ou 3 mg de E<sub>2</sub> (Grupo E<sub>2</sub>; 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  $\mu$ g/mL para o Grupo Controle e 8426,56  $\pm$  1156,00  $\mu$ g/mL para o Grupo E<sub>2</sub> (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 E<sub>2</sub> maior porcentagem relativa das bandas referentes ao peso molecular de 75 a 76 kDa (8,40% vs. 4,89%; no Grupo E<sub>2</sub> e Controle respectivamente; p < 0,05) e 108 a 110 kDa (6,85% vs. 3,84%; no Grupo E<sub>2</sub> e Controle respectivamente; p < 0,05). Observou-se no Grupo E<sub>2</sub> menor porcentagem relativa da banda referente ao peso molecular de 90 kDa (5,78% vs. 9,83%; no Grupo E<sub>2</sub> e Controle respectivamente; p < 0,05). Conclui-se que o E<sub>2</sub> não incrementa a concentração de proteínas no endométrio, entretanto, altera a composição proteica nos explantes endometriais, indicando que o E<sub>2</sub> altera a expressão de proteínas específicas.

**Palavras-chave:** Bovino. Estradiol. Luteólise. Prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub> .

### Abstract

In bovine females the release of prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) is induced *in vivo* by estradiol (E<sub>2</sub>). It is believed that E<sub>2</sub> stimulates the synthesis of essential proteins for the production of PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . This study aimed to evaluate the effect of E<sub>2</sub> in increasing the concentration of total protein and modifying the protein composition of endometrial explants from bovine females treated with E<sub>2</sub> at the 17<sup>th</sup> day of estrous cycle. Crossbred heifers were treated at 17<sup>th</sup> day of estrous cycle intravenously with 0 mg (Control Group; n = 6) or 3 mg of E<sub>2</sub> (E<sub>2</sub> 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  $\mu$ g/mL for the Control Group and 8426.56  $\pm$  1156.00  $\mu$ g/mL for E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> Group greater relative percentage of the bands referring to the molecular weight of 75 to 76 kDa (8.40% vs. 4.89% in E<sub>2</sub> Group and Control respectively; p < 0.05) and 108 to 110 Kda (6.85% vs. 3.84% in E<sub>2</sub> Group and Control respectively; p < 0.05). It was observed in E<sub>2</sub> Group lower relative percentage of the band referring to the molecular weight of 90 kDa (5.78% vs. 9.83% in E<sub>2</sub> Group and control respectively; p < 0.05). We concluded that the E<sub>2</sub> does not increase the protein concentration in the endometrium, however, it modifies the proteinic composition in the endometrial explants, indicating that E<sub>2</sub> alters the expression of specific proteins.

**Keywords:** Bovine. Estradiol. Luteolysis. Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub> .

#### 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  $P_4$ <sup>1</sup>. 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<sup>2,3</sup>. 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<sup>4,5,6,7</sup>. 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)<sup>8</sup>. 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<sup>9,10</sup>.

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.<sup>11</sup>. 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<sup>12,13</sup>. Nas células endometriais, a PKC uma vez ativada, fosforila a fosfolipase A2 (PLA2). O aumento da concentração de cálcio no citosol, induzido pelo  $IP_3$  age estimulando a atividade da PLA2, enzima cálcio-dependente<sup>14</sup>. A PLA2 cliva a fosfatidilcolina preferencialmente na posição Sn-2, liberando o ácido araquidônico (AA)<sup>15</sup>. 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 AA<sup>16</sup>. A hidrólise do AA da membrana fosfolipídica pela PLA2 é fundamental na síntese de  $PGF_{2\alpha}$ <sup>17</sup>. 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 tecidos<sup>18</sup>, enquanto a COX-2 é expressa apenas em alguns tecidos do organismo<sup>19</sup>. A  $PGH_2$  por ação da enzima prostaglandina endoperoxidase H sintase (PGHS) é convertida em  $PGF_{2\alpha}$ <sup>18</sup>. Em ovinos, um mecanismo de “feedback” positivo estimulado pela OT parece promover a liberação pulsátil de  $PGF_{2\alpha}$  pelo endométrio<sup>20</sup>. 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<sup>21,22</sup>. Esses resultados permitiram evidenciar que a OT desempenharia um papel facilitador e não essencial no desencadeamento da luteólise. Acreditase que a OT atue modulando a amplitude dos pulsos de  $PGF_{2\alpha}$  durante a luteólise em bovinos<sup>23</sup>. Visto que a OT não é imprescindível para a ocorrência da luteóli-

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 $\beta$  ( $E_2$ ) é capaz de estimular a expressão dos receptores endometriais de OT<sup>24,25,26</sup>. 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<sub>2 $\alpha$</sub> <sup>18</sup>. A administração de  $E_2$  no 15º dia do ciclo estral promove a luteólise em bovinos<sup>27,28</sup>. De fato, a administração de  $E_2$  em novilhas no 13º dia do ciclo, promoveu a luteólise e o aumento nas concentrações de PGFM<sup>29</sup>. O  $E_2$  endógeno ou exógeno é capaz de induzir a produção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e promover uma diminuição nas concentrações de P<sub>4</sub> circulante em razão da regressão do CL<sup>30</sup>. 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<sup>31,32,33</sup>. Salfen et al.<sup>34</sup> 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  $E_2$ <sup>35</sup>. Sugere-se por tais evidências, que o  $E_2$  estimularia a síntese de proteínas envolvidas na cascata geradora de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , enquanto a OT ativaria enzimas presentes no meio intracelular. Cunha<sup>36</sup> sugeriu que a produção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  *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 Bertan<sup>37</sup>, 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<sub>2 $\alpha$</sub>  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 simultaneamente<sup>37</sup>. Bertan<sup>37</sup> sugere que o  $E_2$  estimularia a síntese das enzimas PKC e PLA2, ambas determinantes na síntese de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 $\beta$  (Grupo E<sub>2</sub>; 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, CaCl<sub>2</sub> 2,56 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,13 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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  $\mu$ g/mL; Leupeptina 10  $\mu$ g/mL e Pepstatina 10  $\mu$ 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 Bradford<sup>38</sup>.

**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 $\mu$ g e 40 $\mu$ 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 9.1.3<sup>39</sup>. 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 9.1.3<sup>39</sup>. 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  $6296 \pm 440 \mu\text{g/mL}$  para o grupo controle e  $8426 \pm 1156 \mu\text{g/mL}$  para o grupo  $E_2$  (Figura 1). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ( $p > 0,05$ ).

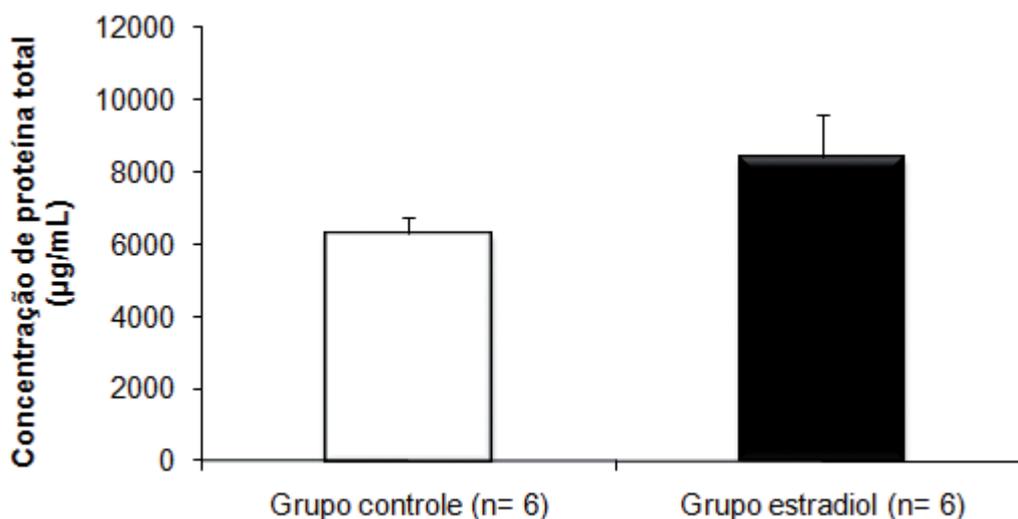


Figura 1 - Média e erro padrão da média da quantidade de proteína total ( $\mu\text{g/mL}$ ) mensurada em extratos de explantes endometriais obtidos de novilhas não tratadas (Grupo Controle;  $n = 6$ ) ou tratadas, via intravenosa, com 3 mg de estradiol-17 $\beta$  (Grupo  $E_2$ ;  $n = 6$ ) no 17º dia 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;  $p < 0,05$ ).

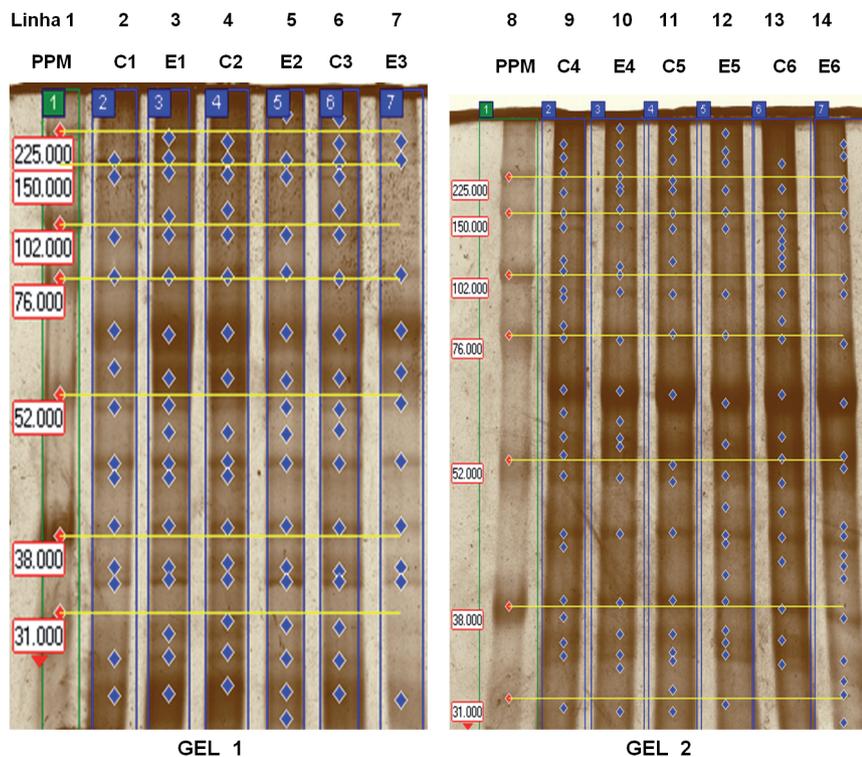


Figura 2 - Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE corado com Nitrato de Prata. GEL 1: Padrão de Peso Molecular (PPM) onde os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31 kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (Linha 1); Animal 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  $\mu$ 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 $\beta$  (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 $\beta$  (Grupo E<sub>2</sub>; 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 <sub>2</sub> (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
<b>6</b>	<b>108 – 110</b>	<b>3,84<sup>b</sup></b>	<b>6,85<sup>a</sup></b>	<b>0,0426</b>
7	98 – 99	5,70	7,18	0,3099
<b>8</b>	<b>90</b>	<b>9,83<sup>a</sup></b>	<b>5,78<sup>b</sup></b>	<b>0,0107</b>
9	82	6,51	5,09	0,3088
<b>10</b>	<b>75 – 76</b>	<b>4,89<sup>b</sup></b>	<b>8,40<sup>a</sup></b>	<b>0,0183</b>
11	69 – 70	6,25	7,03	0,7719
12	63 – 65	5,39	5,31	0,9415

<sup>a,b</sup> 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 E<sub>2</sub> na luteólise de fêmeas bovinas<sup>18,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34</sup>; os mecanismos pelos quais o E<sub>2</sub> desempenha tal função permanecem desconhecidos. Considerando que a ação do E<sub>2</sub> 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 pico<sup>37</sup>, acredita-se que a ação do E<sub>2</sub> envolva a síntese de proteínas endometriais. De fato, Cunha<sup>36</sup> sugeriu que a produção de PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  *in vitro* seja dependente da expressão de proteínas celulares. No presente estudo, explantes endometriais de novilhas tratadas com E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> não tenha incrementado o conjunto de proteí-

nas totais do tecido endometrial, verificou-se que o E<sub>2</sub> promove o aumento de duas proteínas específicas. Tais proteínas poderiam ser determinantes na síntese de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

No presente estudo, diferenças na porcentagem relativa de tais proteínas foram verificadas apenas na coloração com Nitrato de Prata. De fato, Berg, Tymoczko e Stryer<sup>40</sup> sugeriram que a coloração com Coomassie Blue detecta as proteínas existentes em uma amostra com concentração mínima de 0,1  $\mu$ g, enquanto a coloração com Nitrato de Prata detecta proteínas com concentração a partir de 0,02  $\mu$ 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 E<sub>2</sub> em comparação ao grupo controle (8,40% vs. 4,89%; no Grupo E<sub>2</sub> e Controle respectivamente;  $p < 0,05$ . Bertan<sup>37</sup> sugere que o E<sub>2</sub> 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 Hofmann<sup>41</sup> 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  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  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  $\beta$  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, respectivamente<sup>42</sup>. De acordo com Michie e Nakagawa<sup>42</sup>, a família das proteínas quinases C é composta por mais de 10 isoformas, que inicialmente foram subdivididas em 3 classes ou subfamílias. A classe  $\alpha$ , com peso molecular de 76,83 kDa é formada por uma sequência de 672 aminoácidos. A classe  $\beta$ , subdividida em  $\beta\text{I}$  e  $\beta\text{II}$ , apresenta peso molecular de 76,91 kDa e é formada por uma sequência de 673 aminoácidos. A classe  $\gamma$ , 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.<sup>12</sup> relatam que a degradação do PIP<sub>2</sub> a IP<sub>3</sub> e DAG é realizada pela PKC isotipo  $\beta$ , dependente de cálcio e fosfolipídeos para sua ativação, entretanto, tal isotipo não foi identificado em células BEND. Nestas células predomina a PKC $\alpha$  e está dependente de cálcio<sup>43</sup>. Hu, Braileanu e Miranda<sup>44</sup> utilizando inibidores específicos para as diferentes isoformas de PKC verificaram que a PKC $\alpha$ , PKC $\beta\text{II}$ , PKC $\gamma$  e PKC $\epsilon$  estavam presentes em células epiteliais luminais do endomé-

trio. A ativação da PKC pode ser farmacologicamente induzida pelo uso de forbol ésters. Tais compostos têm sido utilizados para induzir a síntese de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  em células endometriais primárias ou explantes cultivados<sup>43,45,46</sup>. A ativação da PKC por forbol éster resultou no aumento de RNAm e na expressão da COX-2 em células endometriais bovinas BEND<sup>47,48</sup>. 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 E<sub>2</sub> em comparação ao grupo controle (6,85% vs. 3,84%; no Grupo E<sub>2</sub> 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 aminoácidos<sup>49</sup>. Godkin et al.<sup>50</sup>, 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.<sup>16</sup> 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)<sup>51</sup>.

Evidenciou-se em alguns estudos que a melitina, um estimulador da atividade da PLA2, promoveu a liberação de PGF<sub>2α</sub> no endométrio bovino; enquanto que o ácido aristolóquico, um inibidor da atividade da PLA2, bloqueou a liberação de PGF<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub><sup>11</sup>. As enzimas PLA2 podem exercer diferentes funções, dentre estas, remove das membranas fosfolipídicas o AA, ácido graxo essencial à síntese de PGF<sub>2α</sub>, através da catalização da hidrólise na posição Sn-2 da membrana glicerofosfolipídica, essencial para a disponibilização de AA para a síntese de PGF<sub>2α</sub><sup>14</sup>.

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

concordância a Bertan<sup>37</sup>, sugere que o E<sub>2</sub> estimularia a síntese das enzimas PKC e PLA2, ambas determinantes na síntese de PGF<sub>2α</sub>. 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 E<sub>2</sub> no 17º dia do ciclo estral, indicando que o E<sub>2</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> induced Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>-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 A<sub>2</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub>**. 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<sub>2α</sub> 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<sub>2α</sub> 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- $\tau$  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 F<sub>2</sub>alpha 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 PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon- $\tau$ . **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- $\tau$  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- $\tau$  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.