



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

VANESSA DA SILVA ALVES GOSSLER

**RELAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO SISTEMA IGF, RECEPTORES
ESTEROIDAIIS NO ÚTERO E HORMÔNIOS ESTEROIDES SÉRICOS DE
CADELAS NO DIESTRO CÍCLICO**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM FISIOPATOLOGIA E SAÚDE ANIMAL**

VANESSA DA SILVA ALVES GOSSLER

**RELAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO SISTEMA IGF, RECEPTORES
ESTEROIDAIIS NO ÚTERO E HORMÔNIOS ESTEROIDES SÉRICOS DE
CADELAS NO DIESTRO CÍCLICO**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal

Orientador: Prof^a Dr^a Ines Cristina Giometti

636.089
G679r

Gossler, Vanessa da Silva Alves.

Relação dos constituintes do sistema IGF, receptores esteroidais no útero e hormônios esteroides séricos de cadelas no diestro cíclico / Vanessa da Silva Alves Gossler. – Presidente Prudente, 2019.

70f.: il.

Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Saúde Animal)
-Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Dra. Ines Cristina Giometti

1. Cães. 2. Fase luteínica. 3. Útero. I. Título.

VANESSA DA SILVA ALVES GOSSLER

**RELAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO SISTEMA IGF, RECEPTORES
ESTEROIDAIIS NO ÚTERO E HORMÔNIOS ESTEROIDES SÉRICOS DE
CADELAS NO DIESTRO CÍCLICO**

Tese apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor - Área de Concentração: Fisiopatologia e Saúde Animal

Presidente Prudente, 26 de setembro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista - Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp
Botucatu-SP

Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp
Botucatu-SP

DEDICATÓRIA

À minha orientadora Profa. Dra. Ines Cristina Giometti, que sempre esteve ao meu lado em todas as etapas desta trajetória, me incentivando e apoiando em todos os momentos, bons ou ruins. Obrigada pelos ensinamentos, conhecimentos, orientação, dedicação, confiança e paciência a mim dispensados. Agradeço ainda, pelo exemplo de profissionalismo demonstrado a cada dia. Te admiro muito. Palavras são pouco para agradecer minha profunda admiração, gratidão e respeito.

Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a minha querida orientadora Prof^a Dra Ines Cristina Giometti não só pela orientação competente nesta tese, mas pela grande contribuição para meu amadurecimento pessoal e profissional e acima de tudo pela sua grande amizade, companheirismo e compreensão.

Agradeço à minha família, em especial ao meu esposo Odair pelo apoio e incentivo, sendo um pai exemplar e um companheiro maravilhoso, ao meu filho Heitor, minha maior dádiva. Aos meus pais Nivaldo e Nilza pelo amor, educação e incentivo e ao meu irmão Fernando, minha grande inspiração para seguir seus passos como doutor.

Agradeço aos meus grandes amigos e compadres Gessyca Santos Sasso e Guilherme Sasso pelo apoio e por cuidarem do Heitor durante minhas viagens para assistir as aulas e executar o experimento.

Agradeço ao corpo docente da Instituição pela contribuição para minha formação e enriquecimento de conhecimento e informação, de forma a me preparar para esta conquista.

Agradeço aos alunos de iniciação científica que colaboraram no desenvolvimento do experimento e em especial à colega de mestrado e amiga Aline de Oliveira Santos pela grande colaboração.

Agradeço a grande amiga e aluna de doutorado da USP Francislaine Aneliza Garcia Santos pela grande contribuição na realização do experimento e por me ensinar um pouco do seu vasto conhecimento.

Agradeço à Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa e a USP por disponibilizar seu laboratório para a realização de parte do experimento.

Agradeço ao corpo de funcionários da Instituição, que sempre trabalharam de forma assídua e comprometida, a fim de dar condições e subsídio para as atividades realizadas, em especial à técnica de laboratório Mayara de Oliveira Vidotto Figueiredo pelo auxílio e a Prof^a Dr^a Luciana Machado Guaberto.

Agradeço a Deus pela grande conquista.

*“Segue o teu destino,
Rega as tuas plantas,
Ama as tuas rosas.
O resto é a sombra
De árvores alheias.*

*A realidade
Sempre é mais ou menos
Do que nós queremos.
Só nós somos sempre
Iguais a nós-próprios.*

*Suave é viver só.
Grande e nobre é sempre
Viver simplesmente.
Deixa a dor nas aras
Como ex-voto aos deuses.*

*Vê de longe a vida.
Nunca a interrogues.
Ela nada pode
Dizer-te. A resposta
Está além dos deuses.*

*Mas serenamente
Imita o Olimpo
No teu coração.
Os deuses são deuses
Porque não se pensam”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Relação dos constituintes do sistema igf, receptores esteroidais no útero e hormônios esteroides séricos de cadelas no diestro cíclico

Modificações endócrinas denotam momentos hormonais diferentes durante o diestro de cadelas. Aos 20 dias após a ovulação, observar-se um pico de progesterona (P4) e aos 40 dias elevação de estrogênio (E2). Os IGFs (fatores de crescimento semelhantes a insulina) são fatores de crescimento produzidos na maioria dos órgãos e tecidos do organismo e seus mecanismos regulatórios envolvem disponibilidade de receptores, abundância de IGFBPs (proteínas ligadoras de IGF) e atividade de proteases. Esse estudo dividiu-se em dois capítulos, primeiro uma revisão da literatura sobre o tema (Capítulo 1) e posteriormente um artigo científico (Capítulo 2) com o objetivo de verificar a correlação das variações hormonais na expressão gênica dos membros do sistema IGF1 e dos receptores de estradiol e progesterona no útero de cadelas não gestantes, durante o diestro. Foi utilizado o útero de 29 cadelas após ovariectomia eletiva aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 (n = 4 ou 5 por grupo) dias pós-ovulação. O tecido foi analisado por RT-qPCR quanto à abundância relativa de RNAm para IGF1, IGFR1, IGFBP3, IGFBP4, PAPP, PGR, ERS1 e ESR2. Foram colhidas amostras de sangue no momento da cirurgia para dosagem de E2 e P4 e a razão entre os hormônios foi calculada. As diferenças entre as variáveis nos grupos foram calculadas por meio do teste de Kruskal- Wallis seguido de Student Newman entre os grupos (P<0,05). A correlação entre as dosagens plasmáticas dos hormônios esteroides e a expressão relativa dos genes-alvos foi conduzida pelo método de Pearson. A expressão gênica relativa de ESR2 foi menor nos dias 40 e 50, comparado aos dias 10, 20 e 30 (P<0,05), e apresentou correlação positiva com P4 (r: 0.5329; P: 0.0128*). A expressão gênica relativa de IGFBP3 aumentou por todo o diestro (P<0,05) e a de IGFBP4 é maior no final do diestro (dias 50 e 60) e se correlacionou negativamente com P4 (r: -0.4622; P: 0.0174*) e positivamente com a razão E2/P4 (r: 0.5663; P: 0.0025*). Conclui-se que a expressão gênica do receptor de estrogênio β (do gene ESR2) é regulado durante o diestro no útero de cadelas, e que é positivamente correlacionado com a P4, e ainda que a sua diminuição seria um mecanismo envolvido na maior proliferação celular do endométrio após o dia 30 em resposta ao E2. Os resultados sugerem ainda que os moduladores locais do sistema IGF1 são as IGFBP3 e IGFBP4 no útero de cadelas não gestantes.

Palavras-chave: Cães; Endométrio; ESR; Fase luteínica; RT-qPCR; Útero.

ABSTRACT

Relationship of igf system constituents, steroid receptors in the uterus and serum steroid hormones of cyclical diestrus bitches

In bitches, endocrine modifications denote different hormonal moments during diestrus. At 20 days after ovulation, a progesterone peak (P4) was observed and at 40 days estrogen elevation (E2). IGFs (insulin-like growth factors) are growth factors produced in most organs and tissues of the body and their regulatory mechanisms involve receptor availability, abundance of IGFBPs (IGF-binding proteins) and protease activity. This study was divided into two chapters, first a literature review on the topic (Chapter 1) and then a scientific article (Chapter 2) to verify the correlation of hormonal variations in gene expression of IGF1 system members and estradiol and progesterone receptors in the uterus of nonpregnant bitches during diestrus. The uterus of 29 bitches, was used after elective ovariohysterectomy at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 (n = 4 or 5 per group) days after ovulation. Tissue was analyzed by RT-qPCR for relative mRNA abundance for IGF1, IGFR1, IGFBP3, IGFBP4, PAPP, PGR, ERS1 and ESR2. Blood samples were taken at the time of surgery to measure E2 and P4 and the ratio between hormones was calculated. Differences between variables in the groups were calculated using the Kruskal-Wallis test followed by Student Newman between the groups ($P < 0.05$). The correlation between steroid hormone plasma dosages and relative expression of target genes was conducted by Pearson's method. The relative gene expression of ESR2 was lower on days 40 and 50, compared to days 10, 20 and 30 ($P < 0.05$), and showed a positive correlation with P4 ($r: 0.5329$; $P: 0.0128 *$). The relative gene expression of IGFBP3 increased throughout the diestrus ($P < 0.05$) and that of IGFBP4 is higher at the end of the diestrus (days 50 and 60) and correlated negatively with P4 ($r: -0.4622$; $P: 0.0174 *$).) and positively with the ratio E2 / P4 ($r: 0.5663$; $P: 0.0025 *$). It is concluded that estrogen receptor β gene expression (of the ESR2 gene) is regulated during diestrus in the womb of bitches, and that it is positively correlated with P4, although its decrease would be a mechanism involved in greater cell proliferation. endometrium after day 30 in response to E2. The results also suggest that the local modulators of the IGF1 system are IGFBP3 and IGFBP4 in the uterus of nonpregnant bitches.

Keywords: Dogs; Endometrium; ESR; Luteal phase; RTqPCR; Uterus.

LISTA DE SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL	Corpo Lúteo
E2	Estradiol
ER α	Receptor de estrogênio alfa
ER β	Receptor de estrogênio beta
ESR1	Gene do receptor de estrogênio alfa
ESR2	Gene do receptor de estrogênio beta
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo
FSH	Hormônio folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GH	Hormônio do Crescimento
GLUT4	Transportador de glicose 4
HPRT1	Hipoxantina fosforibosil-transferase 1
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
IGF1R	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina
IGFBP	Proteína ligadora de IGF
LH	Hormônio luteinizante
MMPs	Metaloproteinases de matriz
RNA _m	RNA mensageiro
OSH	Ovariossalpingohisterectomia
P4	Progesterona
PAPPA	Proteína plasmática associada à gestação
PGR	Receptor de P4
PRLR	Receptor de prolactina
qPCR	PCR quantitativo (em tempo real)
RPL13	proteína ribossomal L13
RT-qPCR	Reação da Transcrição Reversa seguida de qPCR

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1	Ciclo estral da cadela.....	11
1.2	Receptores de Estrogênio (ER α e ER β) e receptor de Progesterona (PGR).....	14
1.3	Eixo GH – IGF.....	17
1.4	IGFs e suas proteínas ligadoras.....	17
1.5	Cascata de IGF1 e suas implicações na reprodução.....	23
2	REFERÊNCIAS.....	24

CAPÍTULO 2

3	ARTIGO NAS NORMAS DA REVISTA ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE.....	34
	ANEXO A – Aprovação do trabalho pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste).....	54
	ANEXO B – Normas de publicação da revista científica Animal Reproduction Science.....	55
	ANEXO C – Comprovante de submissão do artigo para revista Animal Reproduction Science.....	68

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Ciclo estral da cadela

A cadela é considerada monoéstrica, isto é, exibe apenas um ciclo estral por ano, não sazonal, com ovulações espontâneas. A ovulação é seguida de uma fase luteínica que dura cerca de 55 a 75 dias (média de 65 dias) caracterizada pela produção de P4 (CONCANNON *et al.*, 2009).

O proestro geralmente apresenta duração de 9 dias e se caracteriza por elevação das concentrações de E2, de 5-10 pg/mL a 45-120 pg/m, no qual se observa os sinais externos causados pelo aumento do estrógeno, como edema da vulva e corrimento sanguinolento (CONCANNON, 2009; 2011). A concentração de FSH durante o proestro é reduzida gradativamente, concomitante a uma elevação nos níveis séricos de E2 que apresenta um pico no final do proestro e então declina rapidamente antes da onda de LH e do início do estro. O fim do proestro é caracterizado pelo aumento lento da concentração de P4 (de 0,2-0,4 ng/mL a 0,6-0,8 ng/mL) e redução do E2 (CONCANNON *et al.*, 2009).

O estro tem duração variável de 5 a 10 dias, e caracteriza-se pela aceitação do macho pela fêmea. Neste período ocorre queda na concentração sérica de E2 e observa-se onda pré-ovulatória de FSH e LH, sendo que a onda de LH é um indício do início da ovulação (CONCANNON, 2011). A onda de LH ocorre um a dois dias antes da ovulação (DERUSSI *et al.*, 2012). A luteinização dos folículos ocorre antes da ovulação, dificultando distinguir por ultrassonografia os folículos pré-ovulatórios do CL (GROPETTI *et al.*, 2015). Simultaneamente ao declínio dos níveis de estrógeno, a concentração de P4 começa a aumentar antes da ovulação devido o que estimula o pico de LH (CONCANNON, 2011) e atinge a concentração plasmática de 5ng/mL no momento da ovulação (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). A combinação do decréscimo do E2 com o aumento da progesterona é responsável pela mudança do comportamento da cadela bem como pelo estímulo para o hipotálamo e a hipófise que resulta na secreção de FSH e, mais importante, LH no início do estro, levando à ovulação (CONCANNON *et al.*, 2009; CRUZ, 2011). O feedback positivo sobre o hipotálamo e hipófise é estimulado pela

queda de estrógeno e elevação de progesterona, resultando na onda pré-ovulatória de LH e também na secreção de FSH (REYNAUD *et al.*, 2005).

Na ovulação, oócitos imaturos são ovulados dois dias após a onda de LH, porém a maturação dos oócitos levará até 48 horas, e antes disso, não estão aptos à ser fecundação (FONTBONNE, 2011). O período de maior fertilidade na cadela é com concentrações de progesterona entre 10 a 37 ng/mL (GROPETTI *et al.*, 2015). Nem todos os folículos amadurecem ao mesmo tempo em espécies poliovulatórias e as ovulações em cadela ocorrem por um período de 24 a 36 horas (GROPETTI *et al.*, 2015).

O final do comportamento característico do estro marca o início do diestro, quando a cadela previamente receptiva, abruptamente se recusa a aceitar a monta. O E2, provavelmente de origem luteínica, eleva-se na fase inicial do diestro (CONCANNON *et al.*, 2009). Para a função fisiológica do CL, tanto o LH quanto a prolactina são necessários em cadelas como hormônios luteotróficos (CONCANNON *et al.*, 2009). O intervalo entre estros varia entre 5 e 13 meses, com média de 7 meses, dependendo da raça e também de variações individuais, apresentando um ciclo reprodutivo particular (CONCANNON *et al.*, 2009), e as médias não variam significativamente entre as cadelas gestantes e não gestantes (CONCANNON, 2011).

No diestro, existe uma intensa atividade do CL (medida pela da secreção de P4), a qual é longa nas cadelas gestantes quanto nas não gestantes, o que não ocorre em outras espécies. Os hormônios hipofisiários estimulam a produção de P4 pelo CL na segunda metade do diestro (CONCANNON; WEINSTEIN; WHALEY, 1987; OKKENS *et al.*, 1990; HOFFMANN *et al.*, 1992; HOFFMANN; RIESENBECK; KLEIN, 1996), a primeira metade parece transcorrer sem a influência hormonal central (HOFFMANN *et al.*, 2004).

A maior capacidade do CL para produzir de P4 medida por concentrações no sangue periférico (30 a 35 ng / ml) ocorre entre os dias 15 e 25 pós-ovulação, atingindo picos de 15 a 80 ng/mL e posteriormente diminui gradativamente para níveis inferiores a 1 ng/mL (CONCANNON, 1993; HOFFMANN *et al.*, 2004), sendo a concentração sérica de P4 já próxima a 5 ng/mL aos 40 dias pós-ovulação, que se iguala ao do dia 10 em cadelas não gestantes (FONSECA; PAPA, 2012).

Em se tratando do E2, as concentrações no diestro apresentam valores crescentes de 12 pg/mL aos 10 dias pós-ovulação. até 30 pg/ml (no dia 40 pós-

ovulação), sendo mais elevado na metade do diestro em torno do dia 40, e retornando à concentração de 12 pg/mL aos 60 dias pós-ovulação (CONCANNON, 2009; PAPA; HOFFMANN, 2011; FONSECA; PAPA, 2012).

As alterações endócrinas demarcam momentos hormonais diferentes do diestro (fase luteínica) em cadelas, nos quais há uma concentração moderada de E2 e P4 aos 10 dias pós-ovulação com aumento gradativo de ambos a partir desse momento. Com consequente pico de P4 aos 20 dias e posterior declínio, caracterizando os 30 dias como um momento de ainda moderada produção de P4 e crescente E2. Aos 40 dias, observa-se a maior concentração de E2 do diestro, com decrescente nível de P4. O dia 50 é marcado pela queda gradativa de E2 e de P4, culminando com baixas concentrações de ambos aos 60 dias, marcando assim o início do anestro (FONSECA; PAPA; CAMPOS, 2012).

O anestro, período de inatividade funcional ovarina, dura em média 18 a 20 semanas e é caracterizado pela ausência de atividade ovariana e pelo baixo nível de P4 sérica. Essa fase é importante para a completa reparação do endométrio (CONCANNON, 2011). Não é raro intervalos interestros de 8 a 10 meses, ou mais, isso é altamente influenciado pela raça e pode também ser devido ao cio silencioso (FONTBONNE, 2011).

As alterações hormonais observadas em cadelas durante o ciclo estral podem levá-las a apresentar alterações metabólicas como resistência à insulina e incapacidade de manutenção da glicemia, principalmente durante o diestro. Classicamente, a resistência insulínica observada nesta fase do ciclo estral é atribuída aos efeitos diretos da P4 (EIGENMANN *et al.*, 1983) e à ação do hormônio do crescimento (GH), cuja secreção pela glândula mamária de cadelas é estimulada pela P4 (SELMAN *et al.*, 1994; KOOISTRA *et al.*, 2000). A excessiva produção de GH em cadelas pode ser induzida pela P4 endógena ou progestágenos exógenos usados para inibição do cio (EIGENMANN *et al.*, 1983).

A influência da P4 na sensibilidade à insulina também foi observada em humanos e em equinos, durante a gestação (FOWDEN; COMLINE; SILVER, 1984; BUCHANAN; XIANG, 2005) e em mulheres durante a fase luteínica do ciclo menstrual (DIAMOND; SIMONSON; DEFRONZO, 1989). Contudo, em cadelas, o período de aumento do E2 no diestro está associado com os maiores índices de resistência insulínica e menor expressão de GLUT4 (PAPA *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2016), principal proteína carreadora de glicose estimulada pela insulina e que

possibilita o influxo de glicose via difusão facilitada, e corrobora com relatos de várias condições caracterizadas por concentrações de estrógenos elevadas que também são acompanhadas por resistência insulínica (SOLOMON *et al.*, 2001; KAAJA; GREER, 2005) como diabetes gestacional e síndrome do ovário policístico (OKUNO *et al.*, 1995). A GLUT4 é expressa principalmente no músculo esquelético e no tecido adiposo branco. A expressão, translocação ou ancoragem inapropriada dessa proteína pode levar a de resistência à insulina e conseqüentemente prejudicar a homeostase da glicose (GOULD; HOLMAN, 1993). Ropero *et al.*(2008) sugerem que o estado de resistência insulínica deve estar relacionado à atuação de ER α , pois este receptor está associado ao metabolismo da glicose em diferentes tecidos, incluindo o esquelético e o adiposo. De acordo com estudo de Barros, Machado e Gustafsson (2006), a expressão de GLUT4 na membrana de células musculares esqueléticas depende de ER α , o qual se opõe à ação ER β causando um equilíbrio entre os receptores, já que o ER β inibe a expressão de GLUT4 e quando este receptor é expresso sem oposição do ER α , a expressão de GLUT4 é quase ausente, assim o efeito do estrógeno neste tecido depende do balanço entre as isoformas de receptores. Os níveis elevados de E2 foram capazes de inibir a expressão de receptores de insulina e de SLC2A4 (gene da GLUT4) no CL canino, mesmo sob forte estímulo insulínico, podendo assim participar da resistência insulínica observada no diestro (SILVA, 2012; SOUSA *et al.*, 2016).

Flutuações hormonais durante as diferentes fases do ciclo estral é uma causa importante de resistência insulínica em fêmeas caninas (PÖPPL *et al.*, 2016) sendo a progesterona uma das causas de diabetes em cadelas não castradas (PÖPPL *et al.*, 2017).

1.2 Receptores de Estrogênio (ER α e ER β) e receptor de Progesterona (PGR)

Os efeitos mediados por E2 dependem da sua ligação aos seus receptores: receptor de estrogênio alfa (ER α) e receptor de estrogênio beta (ER β), que são codificados por dois genes distintos, ESR1 e ESR2, respectivamente (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003). Os níveis plasmáticos elevados de estrógeno resultam em elevação na quantidade de ER e PGR, enquanto concentrações plasmáticas elevadas de progesterona, resultam em redução da quantidade de ER e PGR (CHU *et al.*, 2002; GALABOVA-KOVACS *et al.*, 2004).

Os ERs pertencem à família de receptores nucleares e apresentam estrutura semelhante, embora suas proteínas tenham mostrado função reguladora distinta. Em geral, o ER α promove a proliferação celular e o ER β parece ter um papel antiproliferação (VIVAR *et al.*, 2010), nas células em que ambos os receptores são expressos, o ER β parece inibir a atividade transcricional do ER α , portanto, a sinalização da resposta E2 depende da relação ER α /ER β (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003; CARDOSO, 2016).

Os estrógenos são reconhecidos como importantes reguladores da homeostase da glicose e do metabolismo lipídico, sendo que tanto ER α quanto ER β são expressos em vários tecidos, tais como tecido adiposo, músculo esquelético, fígado e pâncreas, bem como no sistema nervoso central. Porém, o padrão de expressão de ambos os ERs diferem entre espécies, sexos, e tecidos específicos. Acredita-se que o gene ERS1 está ligado, principalmente, aos efeitos benéficos dos estrógenos como a melhoria da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, e redução de peso corporal e de massa gorda. Em contraste, a expressão do gene de ERS2 parece ser prejudicial para a manutenção normal da homeostase da glicose e lipídios (FORYST-LUDWIG; KINTSCHER, 2010).

Uma correlação negativa foi encontrada entre expressão dos ERs nos cornos uterinos e os níveis séricos de P4. A expressão nos cornos uterinos foi maior durante o proestro, diminuíram durante o estro e foram menores durante o início do diestro. Durante o anestro, foi observado uma alta expressão de ERs indicando sensibilidade para estrogênios em um estágio de quiescência sexual. As flutuações nos ERs foram mais pronunciadas nas células do estroma endometrial do que nas células epiteliais (VERMEIRSCH *et al.*, 1999). Foi observado maior expressão desses receptores nas culturas estimuladas pelo E2 associada ao maior número de células em proliferação (VERMEIRSCH *et al.*, 1999; CRUZ, 2011).

O diestro é o período do ciclo estral em que o endométrio atinge a sua maior espessura e densidade celular (REHM; STANISLAUS; WILLIAMS, 2007; CRUZ, 2011). Foi observado que durante o diestro das cadelas, há uma maior proliferação celular no endométrio aos 40 dias pós-ovulação, momento de maior concentração de E2 comparado aos 60 dias pós-ovulação. (GOSSLER *et al.*, 2017).

Foi detectada a expressão de PGR, de ER α e ER β e de receptor de ocitocina no endométrio de cadelas não prenhes aos 12 dias após a onda de LH (DERUSSI *et al.*, 2012).

Como podemos ver durante o ciclo estral, o endométrio da cadela sofre alterações morfológicas e bioquímicas que estão associadas com a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular (CRUZ, 2011). Estas mudanças morfológicas e fisiológicas são ocasionadas pelos hormônios esteroides ovarianos por meio de seus receptores nas células (SIRIVAIYAPONG; SRISUWATANASAGUL; SRISUWATANASAGUL, 2006). Os níveis de E2 foram positivamente relacionados com a proliferação celular em epitélio superficial, estroma, vasos sanguíneos e criptas (VAN CRUCHTEN *et al.*, 2004) e com o endométrio (GOSSLER *et al.*, 2017).

A P4 em diferentes tipos de células uterinas é parcialmente determinada pela disponibilidade do receptor (VERMEIRSCH *et al.*, 2000). Foi observada por imunohistoquímica a presença de PGR em células epiteliais da superfície epitélio, ductos glandulares e glândulas basais do endométrio, em células do estroma endometrial e em células musculares lisas miometriais. A intensidade de receptores observado correlacionou-se positivamente com a razão de E2/P4, e reflete o efeito positivo do E2 e a influência negativa de P4 nos receptores. Grande quantidade de receptores foram observados durante o proestro e diminuíram no estro, aumentaram novamente no final do diestro. Em anestro, foi observada maior quantidade de receptores em células epiteliais da superfície e baixa quantidade em glândulas basais. Esse achado sugere uma regulação hormonal diferente da expressão do PGR em ambos os grupos de células epiteliais. A maior quantidade de PGR em células estromais em comparação com células epiteliais pode ser explicado pelo fato de que as células estromais atuam como mediadores de alguns efeitos dos hormônios esteroides nas células epiteliais do trato genital (VERMEIRSCH *et al.*, 2000).

Os ERs e os PGRs foram imunolocalizados em útero de cadelas durante o ciclo estral (proestro, estro, diestro com CL ativo, final de diestro com P4 em torno de 1ng/mL e anestro) (VERMEIRSCH *et al.*, 1999, 2000). Nesses estudos, as alterações hormonais influenciaram o escore de coloração dos ERs e PGRs durante as fases do ciclo estral. Aparentemente, maiores escores de ERs (sem diferenciar os tipos de receptores) foram encontrados em fases final de diestro, anestro e proestro e menores no estro e diestro, demonstrando menor responsividade dos ERs ao estrógeno nas fases de maior concentração de P4 (VERMEIRSCH *et al.*, 1999). Em relação ao PGR, foi verificado o escore de coloração em diferentes tipos celulares

durante as fases do ciclo estral e foi encontrada correlação positiva de PGR com o E2 e de PGR com a razão de E2/P4 (VERMEIRSCH *et al.*, 2000).

Durante o proestro, as células uterinas mostraram uma baixa concentração tanto de ERs quanto de PGR, mas durante o estro houve um grande aumento de ERs e um aumento moderado em PGR. Já durante o diestro, as células uterinas expressaram forte reação para PGRs e reação moderada para ERs (MARINKOVIĆ *et al.*, 2018), demonstrando uma maior predominância de PGR durante o diestro em relação aos outros períodos do ciclo estral das cadelas não prenhes.

1.3 Eixo GH – IGF

O hormônio de crescimento (GH, “growth hormone”) ou somatotrofina é um peptídeo produzido pelas células da hipófise anterior, exercendo um papel de destaque no crescimento ósseo e dos tecidos moles, particularmente no período pós-natal. A pulsatilidade da secreção de GH sob condições fisiológicas é controlada pelo sistema regulatório de hormônios neuroendócrinos, enquanto o hormônio liberador de GH (GHRH) e a grelina tem efeito estimulatório, a somatostatina tem efeito inibitório na secreção de GH (MÜLLER; LOCATELLI; COCCHI, 1999). O GH estimula a síntese de outros hormônios proteicos, como os fatores de crescimento semelhante à insulina, IGF1 e IGF2 (KHATIB *et al.*, 2014).

O GH pode agir de forma direta ao se ligar aos seus receptores (GHR), ou de forma indireta, pelo estímulo da produção de IGF, também conhecidos como somatomedinas C (PARK; VANDERHOOF, 1996; JUNQUEIRA *et al.*, 2015), tendo papel importante na cascata de IGF e nas funções que os IGFs desempenham.

1.4 IGFs e suas proteínas ligadoras

Os IGFs são fatores de promoção do crescimento com estrutura molecular homóloga à da insulina, encontrados na forma de IGF1 e IGF2. Estes fatores são sintetizados pelo fígado e pela maioria das células orgânicas, em resposta à ativação promovida pelo GH ou de forma GH-independente. Os IGFs podem influenciar o crescimento, diferenciação e metabolismo celulares e encontram-se ligados a proteínas carreadoras de IGF (IGFBPs 1,2,3,4,5 e 6). A IGFBP mais

abundante no soro do homem e do rato é a IGFBP-3 (CLEMMONS, 2015; RANKE, 2015). Há um aumento do GH sérico em cadelas prenhes e não prenhes na fase luteínica, pois a P4 estimula a glândula mamária a produzir GH nessa fase (HESS, 2010). Os mecanismos que regulam as ações do IGF envolvem disponibilidade de receptores, abundância de IGFbps e atividade de proteases disponíveis para regular concentrações locais de IGF. Os hormônios esteroides regulam a expressão de IGF1 e IGF2 no endométrio, que possuem propriedades mitogênicas e de diferenciação celular, com efeitos na proliferação epitelial no endométrio do ratos e humanos (SATO *et al.*, 2002).

Os IGFs interagem com receptores (IGF1Rs) de superfície celular específicos e também podem interagir com o receptor de insulina. Os efeitos mitogênicos dos IGFs são mediados principalmente por interações com o IGF1R, que, como o receptor de insulina, é um receptor com atividade de tirosina quinase. As IGFbps atuam não apenas como carreadoras de IGFs, prolongando assim a meia-vida do IGFs, mas também funcionam como moduladores da disponibilidade e atividade (HWA; OH; ROSENFELD, 1999) .

As IGFbps são uma família de seis proteínas que têm alta afinidade para IGF1 e IGF2 (HWA; OH; ROSENFELD, 1999). Uma vez que as IGFbps estão presentes em todos os tecidos e têm alta afinidade pelo IGF1, elas funcionam na regulação das ações do IGF1, controlando o acesso aos receptores (KELLEY *et al.*, 1996). O determinante mais importante dessa capacidade de modular a ação do IGF1 é sua afinidade (CLEMMONS, 2015).

As IGFbps podem inibir ou aumentar as ações do IGF (JONES, 2004). Três variáveis alteram significativamente a afinidade de um ou mais dos IGFbps ao IGF1 sendo a proteólise, a fosforilação e a aderência a superfícies celulares ou matriz extracelular. A clivagem de IGFbps por proteases resulta em redução de suas afinidades pelo IGF1 (CLEMMONS, 2015). As proteases de IGFBP incluem metaloproteinases de matriz (MMPs), calicreínas, catepsinas, proteína plasmática associada à gestação A (PAPPA), calpaína e outras serino-proteases (HOLLY; PERKS, 2006). Em alguns casos, como a clivagem de IGFBP3, a proteína permanece ligada por ligações dissulfeto, preservando parte da afinidade pelo IGF1. Em outros casos, a afinidade pelo IGF1 é reduzida significativamente (CLEMMONS, 2015).

O IGFBP5 e o IGFBP3 são clivados por MMP2, MMP9 e PAPP. A atividade da proteólise de IGFBP3 é aumentada na gravidez, diabetes e privação nutricional. A PPAPA, um metaloprotease, cliva IGFBP4, sendo que a degradação de IGFBP4 resulta na diminuição da inibição de ações do IGF1. A IGFBP2, IGFBP3 e IGFBP5 podem se aderir a superfícies celulares e a ligação da IGFBP3 às células diminui sua afinidade ao IGF1 (CLEMMONS, 2015).

Variáveis, como a proteólise, que diminuem afinidade de IGFBP a níveis menores que do receptor de IGF1 permitem um aumento na quantidade de IGF associado ao receptor. Em contraste, variáveis, como a aderência a superfícies celulares ou matriz extracelular, que diminuem a afinidade da IGFBP a níveis que se aproximam do receptor, mas deixam a forma de IGFBP intacta pode resultar em aumento prolongado da difusão de IGF1 e IGF2 para os receptores, aumentando assim as ações do IGF1. Além disso, IGFBPs podem funcionar para alterar a taxa de IGF1 e IGF2 nos tecidos, proporcionando assim uma maior reserva estável destes peptídeos (CLEMMONS, 2015).

A proliferação de células epiteliais no lúmen endometrial e de células glandulares endometriais são reguladas pelo estrogênio e a proliferação de células estromais endometriais é regulada pelo estrogênio e P4, que estimulam a produção de fatores de crescimento em células endometriais (SUZUKI *et al.*, 2009), que, por sua vez, estimula a síntese de DNA nas células endometriais (TOMOOKA; DIAUGUSTINE; MCLACHLAN, 1986; KORACH *et al.*, 2009). O IGF1 é um dos fatores de crescimento que promovem a proliferação de células endometriais, estimulando a síntese de DNA em células epiteliais do lúmen endometrial e células estromais por meio de IGF1R (INOUE; TAKEUCHI; TAKAHASHI, 2005; ZHU; POLLARD; ROBERTS, 2007; SATO *et al.*, 2014).

Em ratas, o estrogênio estimula a expressão de RNAm de IGF1 no útero (SMITH, 1992; GHAHARY; LUO; MURPHY, 1993; MURAKAMI *et al.*, 2007; MURPHY; MURPHY; FRIESEN, 2009; TAKAHASHI, 2013), por meio de ERs (KLOTZ *et al.*, 2002). Por sua vez, a IGFBP3 modula as ações do IGF1 ao se ligar à molécula de IGF1, resultando em obstrução da ação do IGF1 ou prolongamento de sua meia-vida (HWA; OH; ROSENFELD, 1999; DUAN; XU, 2005). Em culturas de células estromais endometriais a IGFBP3 inibe a síntese de DNA induzida por IGF1 (MAEKAWA *et al.*, 2009; OGO *et al.*, 2012).

1.5 Cascata de IGF1 e suas implicações na reprodução

O IGF1 é sintetizado principalmente no fígado e expresso localmente nos tecidos periféricos (FLORINI; EWTON; ROOF, 1991). O IGF1 desempenha um papel importante no crescimento e na diferenciação de muitos tecidos (SHERLOCK; TOOGOOD, 2007) controlando a proliferação celular, diferenciação e apoptose e crescimento de tecido em todo o corpo (FRYSTYK; FREDA; CLEMMONS, 2010; DABROWSKI *et al.*, 2015).

A influência do IGF1 é relatada em animais com piometra. Uma das doenças uterinas mais frequentemente encontradas em cadelas não prenhes são a hiperplasia endometrial cística (CEH) e a piometra (JITPEAN *et al.*, 2012, 2014; MOXON; WHITESIDE; ENGLAND, 2016). A síndrome da hiperplasia endometrial cística – piometra ainda não tem uma etiologia bem definida, no entanto, é aceito que vários fatores podem ter influência, incluindo a ação conjunta de hormônios esteroides (progesterona e estrógeno) durante ciclos reprodutivos sucessivos e a influência de fatores de proliferação endometrial, como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (SCHLAFER; GIFFORD, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2016), com a influência da progesterona desempenhando um papel importante na patogênese da síndrome da hiperplasia endometrial cística – piometra (HAGMAN, 2017).

A expressão reduzida de receptor de estrógeno (ESR2) em animais com Hiperplasia Endometrial Cística, mucometra e piometra resulta em aumento da atividade mitogênica de estrógenos e consequente proliferação celular endometrial (VOORWALD, 2014). No útero de cadelas, os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) estimulam a mitose nas células do endométrio levando à hiperplasia do endométrio (FABIAN; KOPPEL; MADDOX-HYTTEL, 2005; KEMPISTY *et al.*, 2013) e os níveis de IGF dependem da concentração hormonal, principalmente de estradiol e progesterona (KEMPISTY *et al.*, 2013). No cão, há uma produção excepcionalmente alta de progestágeno induzindo IGF1, que hoje é geralmente aceito como um dos fatores de crescimento mais importantes com um alto efeito mitogênico no útero (DE COCK *et al.*, 2002). Com base no conhecimento do papel do IGF1 na proliferação endometrial, altas concentrações de IGF1 localizadas dentro e ao redor das células epiteliais do endométrio em cães podem desempenhar um

papel importante no desenvolvimento da hiperplasia endometrial cística (DE COCK *et al.*, 2002).

O IGFBP3 e IGFBP4 são inibidores do crescimento em muitos sistemas *in vitro* e *in vivo* (BACH, 2015; BAXTER, 2015). Alguns efeitos inibitórios da IGFBP3 são mediados pela indução de apoptose (GRIMBERG, 2000; JOHNSON; FIRTH, 2014; BAXTER, 2015; RANKE, 2015) e inibição da angiogênese (KIM *et al.*, 2011) enquanto IGFBP4 inibe a esteroidogênese (BACH, 2015) e angiogênese (RYAN *et al.*, 2009; BACH, 2015; MORENO *et al.*, 2015; CARDOSO, 2016). Este papel inibitório do IGFBP3 foi descrito em CL suíno e bovino (BROWN; BRADEN, 2001; GE *et al.*, 2003), enquanto IGFBP4 apenas em bovinos (SCHAMS *et al.*, 2002; CARDOSO, 2016).

Os esteroides sexuais controlam o IGFBP2. Comparando os efeitos da IGFBP2 no câncer de mama, ovário e próstata, uma associação positiva parece não existir com IGFBP1 e risco de cânceres nesses tecidos reprodutivos, porém uma relação entre IGFBP2 e câncer de mama, câncer de ovário e o câncer de próstata parece estar presente em humanos (HOEFLICH; RUSSO, 2015).

Em todas as espécies de mamíferos, o IGF1 estimula a proliferação de células da granulosa e a esteroidogênese. O IGF1 não tem efeitos no desenvolvimento dos folículos primordiais, mas tanto o IGF1 como o IGF2 estimulam o crescimento dos folículos secundários em bovinos. Dependendo dos estudos de espécies e do método utilizado, essas proteínas foram detectadas em oócitos e/ou células somáticas. Nos folículos antrais, esses IGFs estimulam a proliferação e a esteroidogênese da granulosa na maioria dos mamíferos (SILVA; FIGUEIREDO; VAN DEN HURK, 2009).

Em ruminantes, a insulina, bem como o GH e IGF1 estão envolvidos nos estágios iniciais da foliculogênese, visando à dominância folicular e a resposta destes às gonadotrofinas (SILVA, 2012). As concentrações de IGF1 e 2 não variam durante o crescimento folicular terminal e atresia. Em contraste, os níveis de IGFBP2 4 e 5 diminuem dramaticamente no crescimento folicular e aumentam durante a atresia. Essas alterações são responsáveis por um aumento da disponibilidade de IGF no crescimento folicular e sua diminuição na atresia. A PAPPa é responsável pela degradação da IGFBP4 em folículos pré-ovulatórios de animais domésticos. A expressão do RNAm da PAPPa é restrita ao compartimento das células da

granulosa e correlaciona-se positivamente com a expressão da aromatase e do receptor de LH (MONGET *et al.*, 2002).

Em bovinos, o consumo insuficiente de energia está relacionado com um baixo desempenho reprodutivo, resultando em um período prolongado de anestro pós-parto, baixa produção de P4 pelo CL e baixa taxa de concepção (LUCY *et al.*, 1991). A associação entre a nutrição e a função ovariana está relacionada principalmente com o sistema glicose-insulina e IGF (SCARAMUZZI *et al.*, 2006), como é visto quando ocorrem alterações na dieta de ruminantes modificando seu metabolismo e alterando alguns hormônios metabólicos, entre eles GH, insulina, IGF-1 e leptina, que têm grande participação na função ovariana (KRISHER, 2014).

Em ovários de cadelas no anestro e estro, IGF1 está presente no estroma cortical, na teca, granulosa e oócitos de folículos primários, secundários, terciários e pré-ovulatórios luteinizados, bem como em ovócitos de folículos primordiais sugerindo a participação de IGF1 na dinâmica folicular e formação do CL (ALMEIDA *et al.*, 2015). Reynaud *et al.* (2010) demonstraram a presença de IGF1 no fluido folicular de cadelas e que as concentrações de IGF1 e IGFBP3 no plasma e nos folículos pré-ovulatórios estão altamente correlacionados com a altura da cadela, que por sua vez está correlacionado com o número e o tamanho dos folículos. Foi identificada também a participação de IGF1 na maturação *in vitro* de oócitos caninos (MACHADO; TONIOLLO; OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA; MACHADO; TONIOLLO, 2009; CHASTANT-MAILLARD *et al.*, 2011).

Estudos indicam que o IGF1 e o IGF2 estão relacionados à decidualização do endométrio. Níveis elevados de expressão de IGF1, IGF2, receptor de prolactina (PRLR) e ER α foram observados em células estromais decidualizadas de cadela (KAUTZ *et al.*, 2015). Há um aumento de IGF2 pré-implantação, demonstrando que o IGF1 e o IGF2, estão entre os marcadores de decidualização mais proeminentes, atuando predominantemente no nível de seu receptor comum IGF1R, ambos os IGFs são fatores mitogênicos importantes, determinantes do crescimento fetal e placentário (SERHAT, 2014). O aumento da expressão de IGF1 e PGR foi verificado por Schäfer-Somi *et al.* (2008) tanto em úteros 10 dias após implantação do embrião quanto em úteros não gravídicos aos 10 dias após o diestro. Graubner *et al.* (2017) relatam aumento na expressão gênica de PGR e PRLR em células decidualizadas *in vitro* de cadelas em início de diestro, implicando assim seu envolvimento na decidualização dependente de P4 no útero canino.

A P4 é extremamente necessária para manter ambiente uterino propício para a gravidez. A IGFBP1 e IGFBP3 são regulados pela P4 no endométrio do útero dos ovinos e possui efeitos potenciais sobre a função endometrial e crescimento e desenvolvimento de blastocistos peri-implantação. A P4 ovariana é o hormônio esteroide responsável pela produção e secreção no epitélio luminal e epitélio glandular do útero de fatores histotróficos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do blastocisto (SPENCER *et al.*, 2008).

A implantação do embrião representa o passo mais crítico em todo o processo reprodutivo dos mamíferos. Para estabelecer uma implantação embrionária bem-sucedida, um blastocisto em desenvolvimento e um endométrio receptivo são necessários. Durante o período de implantação, o endométrio uterino sofre alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares para se tornar receptivo ao blastocisto. Neste período, numerosos fatores, incluindo hormônios como a P4, o IGF1 e receptores como o IGF1R facilitam a receptividade do endométrio (YU *et al.*, 2017).

A PAPPa é essencial para manter o endométrio receptivo, pois se liga e cliva a IGFBP4 liberando o IGF1 do complexo IGFBP4/IGF1, assim promovendo a ativação da via de sinalização mediada por IGF1R (YU *et al.*, 2017). As concentrações plasmáticas de IGFBP podem estar associadas a perdas tardias embrionárias e fetais precoces em bovinos. As concentrações de IGFBP2, 3 e 4 foram maiores nas vacas com morte fetal do que nas gestantes (PETER *et al.*, 2018).

Considerando as interações entre os hormônios IGF1, P4 e estrógeno e as proteínas IGFBP3 e IGFBP4 e PAPPa e seus efeitos sobre a proliferação celular e sobre a reprodução, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito dos esteroides sexuais na expressão gênica dos membros do sistema IGF1 e dos receptores de estradiol e progesterona em cornos uterinos de cadelas não prenhes, ao longo do diestro.

2 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. *et al.* Cystic endometrial hyperplasia–pyometra syndrome in bitches: identification of hemodynamic, inflammatory, and cell proliferation changes >. **Biology of Reproduction**, v. 96, p. 58–69, 2016.
- ALMEIDA, M. V. D. *et al.* Identificação imuno-histoquímica de VEGF e IGF-1 em ovários de cadelas no anestro e estro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 334–342, 2015.
- BACH, L. A. Insulin-like growth factor binding proteins-an update. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 521–530, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2015.06.002>.
- BARROS, R. P.; MACHADO, U. F.; GUSTAFSSON, J.-A. Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus. **Trends in molecular medicine**, v. 12, n. 9, p. 425–31, 2006.
- BAXTER, R. C. Nuclear actions of insulin-like growth factor binding protein-3. **Gene**, v. 569, n. 1, p. 7–13, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.028>.
- BROWN, T. A.; BRADEN, T. D. Expression of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3, and the effects of IGFBP-2 and -3 in the bovine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 20, n. 3, p. 203–216, 2001.
- BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 3, p. 485–91, 2005.
- CARDOSO, A. P. M. M. **Mecanismo de ação do 17 β -estradiol no corpo lúteo de cadelas não prenhes**. 2016. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- CHASTANT-MAILLARD, S. *et al.* The canine oocyte: uncommon features of in vivo and in vitro maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 3, p. 391, 2011.
- CHU, P. Y. *et al.* Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 467–477, 2002.
- CLEMMONS, D. R. **Insulin-Like Growth Factor-1 and Its Binding Proteins***. 7. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.
- CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **Journal of reproduction and fertility**, v. 47, p. 3–27, 1993.
- CONCANNON, P. W. *et al.* Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 172–193, 2009.
- CONCANNON, P. W. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. In: *Reproduction in Domestic Animals*, SUPPL. 2, **Anais** [...] 2009.
- CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 200–210, 2011.
- CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 39, p. 3–25, 1989.
- CONCANNON PW, WEINSTEIN R, WHALEY S, F. D. Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone-anti serum and by bromocryptine. **J Reprod Fert**, v. 81, p. 175–180, 1987.
- CRUZ, S. A. da F. **Proliferação e apoptose celular no endométrio da cadela**. 2011. Universidade Técnica de Lisboa, 2011.
- DABROWSKI, R. *et al.* Serum insulin-like growth factor-1 and C-reactive protein concentrations before and after ovariohysterectomy in bitches with pyometra.

Theriogenology, v. 83, n. 4, p. 474–477, 2015.

DE COCK, H. *et al.* Possible role for insulin-like growth factor-I in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 57, n. 9, p. 2271–2287, 2002.

DERUSSI, A. A. P. *et al.* Progesterone (PR), Oestrogen (ER- α and ER- β) and Oxytocin (OTR) Gene Expression in the Oviduct and Uterus of Pregnant and Non-pregnant Bitches. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. suppl. 6, p. 197–199, 2012.

DIAMOND, M. P.; SIMONSON, D. C.; DEFRONZO, R. A. Menstrual cyclicity has a profound effect on glucose homeostasis. **Fertility and sterility**, v. 52, n. 2, p. 204–208, 1989.

DUAN, C.; XU, Q. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. **General and Comparative Endocrinology**, v. 142, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 44–52, 2005.

EIGENMANN, J. E. *et al.* Progesterone-controlled growth hormone overproduction and naturally occurring canine diabetes and acromegaly. **Acta endocrinologica**, v. 104, n. 2, p. 167–176, 1983.

FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDOX-HYTTEL, P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 221–231, 2005.

FLORINI, J. R.; EWTON, D. Z.; ROOF, S. L. Insulin-Like Growth Factor-I Stimulates Terminal Myogenic Differentiation by Induction of Myogenin Gene Expression.

Molecular Endocrinology, v. 5, n. 5, p. 718–724, 1991. Disponível em:

<https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend-5-5-718>.

FONSECA, V. U.; PAPA, P. C. Potencial envolvimento da adiponectina e seus receptores na modulação da esteroidogênese em corpo lúteo de cadelas ao. v. 32, n. 10, p. 1055–1060, 2012.

FONSECA, V. U.; PAPA, P. C.; CAMPOS, D. B. Potencial envolvimento da adiponectina e seus receptores na modulação da esteroidogênese em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 10, p. 1055–1060, out. 2012.

FONTBONNE, A. Infertility in bitches and queens: recent advances. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2011.

FORYST-LUDWIG, A.; KINTSCHER, U. **Metabolic impact of estrogen signalling through ER α and ER β** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010. .

FOWDEN, A. L.; COMLINE, R. S.; SILVER, M. Insulin secretion and carbohydrate metabolism during pregnancy in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, n. 4, p. 239–46, jul. 1984.

FRYSTYK, J.; FREDA, P.; CLEMMONS, D. R. The current status of IGF-I assays - A 2009 update. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 20, n. 1, p. 8–18, 2010.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2009.09.004>>.

GALABOVA-KOVACS, G. *et al.* Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 963–976, 2004.

GE, Z. *et al.* Insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding proteins-2, -3, -4, -5 in porcine corpora lutea during the estrous cycle; evidence for inhibitory actions of IGFBP-3. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 183–197, 2003.

GHAHARY, A.; LUO, J.; MURPHY, L. J. Expression and regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in the rat uterus throughout estrous cycle. **Molecular**

- and Cellular Biochemistry**, v. 124, n. 1, p. 43–49, 1993.
- GOSSLER, V. da S. A. *et al.* Evaluation of cell proliferation and endometrial thickness of bitches in different periods of diestrus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 1719–1727, 2017.
- GOULD, G. W.; HOLMAN, G. D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. **The Biochemical journal**, v. 295, pt 2, n. 6, p. 329–41, out. 1993.
- GRAUBNER, F. R. *et al.* Uterine responses to early pre-attachment embryos in the domestic dog and comparisons with other domestic animal species. **Biology of Reproduction**, v. 97, n. 2, p. 197–216, 2017.
- GRIMBERG, A. p53 and IGFBP-3: Apoptosis and cancer protection. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 70, n. 2, p. 85–98, 2000.
- GROPETTI, D. *et al.* Perioovulatory time in the bitch: What's new to know? **Animal Reproduction Science**, v. 152, p. 108–116, jan. 2015.
- HAGMAN, R. Molecular aspects of uterine diseases in dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 37–42, 2017.
- HESS, R. S. **Insulin Resistance in Dogs** *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 2010. .
- HOEFLICH, A.; RUSSO, V. C. Physiology and pathophysiology of IGFBP-1 and IGFBP-2 - Consensus and dissent on metabolic control and malignant potential. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 5, p. 685–700, 2015.
- HOFFMANN, B. *et al.* Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, n. 2, p. 837–845, 1992.
- HOFFMANN, B. *et al.* **Regulation of corpus luteum-function in the bitch** *Reproduction in Domestic Animals*, 2004. .
- HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 275–288, 1996.
- HOLLY, J.; PERKS, C. The role of insulin-like growth factor binding proteins. **Neuroendocrinology**, v. 83, n. 3–4, p. 154–160, 2006.
- HWA, V.; OH, Y.; ROSENFELD, R. G. The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein (IGFBP) Superfamily¹. **Endocrine Reviews**, v. 20, n. 6, p. 761–787, 1999. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv.20.6.0382>.
- INOUE, A.; TAKEUCHI, S.; TAKAHASHI, S. Insulin-Like Growth Factor-I Stimulated DNA Replication in Mouse Endometrial Stromal Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 3, p. 305–313, 2005.
- JITPEAN, S. *et al.* Breed Variations in the Incidence of Pyometra and Mammary Tumours in Swedish Dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. suppl. 6, p. 347–350, 2012.
- JITPEAN, S. *et al.* Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 43–48, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.014>.
- JOHNSON, M. A.; FIRTH, S. M. IGFBP-3: A cell fate pivot in cancer and disease. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 24, n. 5, p. 164–173, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ghir.2014.04.007>.
- JONES, J. I. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v. 16, n. 1, p. 3–34, 2004.
- JUNQUEIRA, A. *et al.* Hormônio do crescimento e suas implicações no período pós-

- parto de bovinos. **COLLOQUIUM AGRARIAE**, v. 11, n. 1, p. 42–56, jun. 2015.
- KAAJA, R. J.; GREER, I. a. Manifestations of chronic disease during pregnancy. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 294, n. 21, p. 2751–2757, 2005.
- KAUTZ, E. *et al.* In vitro decidualisation of canine uterine stromal cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2015.
- KELLEY, K. M. *et al.* Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 28, n. 6, p. 619–637, 1996.
- KEMPISTY, B. *et al.* Endometritis and pyometra in bitches: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 6, p. 289–297, 2013.
- KHATIB, N. *et al.* Ghrelin: Ghrelin as a regulatory peptide in growth hormone secretion **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2014. .
- KIM, J. H. *et al.* Antiangiogenic antitumor activities of IGFBP-3 are mediated by IGF-independent suppression of Erk1/2 activation and Egr-1-mediated transcriptional events. **Blood**, v. 118, n. 9, p. 2622–2631, 2011.
- KLOTZ, D. M. *et al.* Requirement of estrogen receptor- α in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8531–8537, 2002.
- KOOISTRA, H. S. *et al.* Pulsatile secretion pattern of growth hormone during the luteal phase and mid-anoestrus in beagle bitches. **Journal of reproduction and fertility**, v. 119, n. 2, p. 217–222, 2000.
- KORACH, K. S. *et al.* Influence of Estrogens on Mouse Uterine Epidermal Growth Factor Precursor Protein and Messenger Ribonucleic Acid. **Endocrinology**, v. 122, n. 6, p. 2355–2363, 2009.
- KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : The effect of oocyte quality on development 1 , 2. n. May 2014, 2014.
- LUCY, M. C. *et al.* Energy Balance and Size and Number of Ovarian Follicles Detected by Ultrasonography in Early Postpartum Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 2, p. 473–482, 1991. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030291781940>.
- MACHADO, M. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, K. Influência do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) adicionado ao meio fluido sintético de tuba uterina (SOF) sobre a maturação in vitro de oócitos caninos (*Canis familiaris*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 3, p. 455–464, 2007. Disponível em: www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/.../2515.
- MAEKAWA, T. *et al.* Estradiol, Progesterone, and Transforming Growth Factor α Regulate Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP3) Expression in Mouse Endometrial Cells. **Zoological Science**, v. 26, n. 2, p. 131–138, 2009.
- MARINKOVIĆ, D. *et al.* Morphological Characteristics and Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in the Canine Endometrium During the Estrus Cycle, Cystic Endometrial Hyperplasia and Pyometra. **Acta Veterinaria**, v. 68, n. 3, p. 239–250, 2018.
- MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J. A. Extrogen signaling: A subtle balance between ER ER. **Molecular Intervention**, v. 3, n. 5, p. 281–292, 2003.
- MONGET, P. *et al.* Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1–2, p. 139–154, 2002.
- MORENO, M. J. *et al.* IGFBP-4 Anti-Angiogenic and Anti-Tumorigenic Effects Are

- Associated with Anti-Cathepsin B Activity. **Neoplasia**, v. 15, n. 5, p. 554–567, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1593/neo.13212>.
- MOXON, R.; WHITESIDE, H.; ENGLAND, G. C. W. Prevalence of ultrasound-determined cystic endometrial hyperplasia and the relationship with age in dogs. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 976–980, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.022>.
- MÜLLER, E. E.; LOCATELLI, V.; COCCHI, D. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. **Physiological reviews**, v. 79, n. 2, p. 511–607, 1999.
- MURAKAMI, Y. *et al.* Alternative Leader-Exon Usage in Mouse IGF-I mRNA Variants: Class 1 and Class 2 IGF-I mRNAs. **Zoological Science**, v. 24, n. 3, p. 241–247, 2007.
- MURPHY, L. J.; MURPHY, L. C.; FRIESEN, H. G. Estrogen Induces Insulin—Like Growth Factor—I Expression in the Rat Uterus. **Molecular Endocrinology**, v. 1, n. 7, p. 445–450, 2009.
- OGO, Y. *et al.* Transforming Growth Factor- α mRNA Expression and Its Possible Roles in Mouse Endometrial Stromal Cells. **Zoological Science**, v. 29, n. 6, p. 377–383, 2012.
- OKKENS, A. C. *et al.* Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. **Veterinary Quarterly**, v. 12, n. 4, p. 193–201, 1990.
- OKUNO, S. *et al.* Decreased expression of the GLUT4 glucose transporter protein in adipose tissue during pregnancy. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 27, n. 5, p. 231–234, 1995.
- OLIVEIRA, K. de S.; MACHADO, M. A.; TONIOLLO, G. H. Avaliação Do Fator De Crescimento Igf-I Na Maturação In Vitro De Oócitos Caninos No Meio Tcm 199. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 560–567, 2009.
- PAPA, P. C. *et al.* Corpus luteum and diestrus in the bitch: a study model for hormonal-dependent metabolic alterations. In: *Biology of Reproduction, Anais...* 2011.
- PAPA, P. C.; HOFFMANN, B. **The Corpus Luteum of the Dog: Source and Target of Steroid Hormones? Reproduction in Domestic Animals**, 2011. .
- PARK, J. H. Y.; VANDERHOOF, J. A. Growth hormone did not enhance mucosal hyperplasia after small-bowel resection. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 31, n. 4, p. 349–354, 1996.
- PETER, S. *et al.* Increased Concentrations of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP)-2, IGFBP-3, and IGFBP-4 Are Associated With Fetal Mortality in Pregnant Cows. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. June, p. 1–10, 2018.
- PÖPPL, A. G. *et al.* Canine diabetes mellitus risk factors: A matched case-control study. **Research in Veterinary Science**, v. 114, n. August, p. 469–473, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.08.003>.
- PÖPPL, Á. G. *et al.* Insulin binding characteristics in canine muscle tissue: Effects of the estrous cycle phases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 8, p. 761–766, 2016.
- RANKE, M. B. Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3). **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 5, p. 701–711, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2015.06.003>.
- REHM, S.; STANISLAUS, D. J.; WILLIAMS, A. M. **Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, 2007. .

- REYNAUD, K. *et al.* In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. **Reproduction**, v. 130, n. 2, p. 193–201, 2005.
- REYNAUD, K. *et al.* IGF system and ovarian folliculogenesis in dog breeds of various sizes: Is there a link? **Journal of Endocrinology**, v. 206, n. 1, p. 85–92, 2010.
- ROPERO, A. B. *et al.* The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. **Steroids**, v. 73, n. 9–10, p. 874–879, 2008.
- RYAN, A. J. *et al.* Expression of a protease-resistant insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits tumour growth in a murine model of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 2, p. 278–286, 2009.
- SATO, T. *et al.* Role of Systemic and Local IGF-I in the Effects of Estrogen on Growth and Epithelial Proliferation of Mouse Uterus. **Endocrinology**, v. 143, n. 7, p. 2673–2679, 2002.
- SATO, T. *et al.* Role of Systemic and Local IGF-I in the Effects of Estrogen on Growth and Epithelial Proliferation of Mouse Uterus. **Endocrinology**, v. 143, n. 7, p. 2673–2679, 2014.
- SCARAMUZZI, R. J. *et al.* A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, n. 4, p. 339–354, 2006. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/rnd:2006016>>.
- SCHÄFER-SOMI, S. *et al.* Expression of genes in the canine pre-implantation uterus and embryo: Implications for an active role of the embryo before and during invasion. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 6, p. 656–663, 2008.
- SCHAMS, D. *et al.* Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, n. 1, p. 51–72, 2002.
- SCHLAFER, D. H.; GIFFORD, A. T. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 349–358, 2008.
- SELMAN, P. J. *et al.* Progesterin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. **Endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 287–292, 1994.
- SERHAT, S. Expression of genes involved in the embryo-maternal interaction in the early pregnant canine uterus Title : Expression of genes involved in the embryo-maternal interaction in the early pregnant canine uterus Short title : Embryo-maternal interaction in th. v. 147, p. 703–717, 2014.
- SHERLOCK, M.; TOOGOOD, A. A. Aging and the growth hormone/insulin like growth factor-I axis. **Pituitary**, v. 10, n. 2, p. 189–203, 2007.
- SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1193–1208, 2009.
- SILVA, R. S. **Insulina e captação de glicose no corpo lúteo canino**. 2012. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo., 2012.
- SIRIVAIYAPONG, S.; SRISUWATANASAGUL, K.; SRISUWATANASAGUL, S. Progesterone receptors and proliferation in the bitch uterus during different stages of the oestrous cycle. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 36, n. 3, p. 46–54, 2006.
- SMITH, L. Expression of Insulin-Like Mouse Expression Growth Uterus , and and and Its Receptor of IGF-I in the Gene Regulation by Estradiol. **Biology of Reproduction**,

p. 208–219, 1992.

SOLOMON, C. G. *et al.* Long or highly irregular menstrual cycles as a marker for risk of type 2 diabetes mellitus. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 19, p. 2421–2426, 2001.

SOUSA, L. M. *et al.* Is the canine corpus luteum an insulin-sensitive tissue? **The Journal of endocrinology**, set. 2016.

SPENCER, T. E. *et al.* Progesterone Regulates FGF10, MET, IGFBP1, and IGFBP3 in the Endometrium of the Ovine Uterus1. **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 6, p. 1226–1236, 2008.

SUZUKI, Y. *et al.* Estrogen Regulates the Synthesis of Epidermal Growth Factor in Mouse Uterine Epithelial Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 510–523, 2009.

TAKAHASHI, S. Streptozotocin-treated Diabetic Mice. v. 59, n. 4, 2013.

TOMOOKA, Y.; DIAUGUSTINE, R. P.; MCLACHLAN, J. A. Proliferation of mouse uterine epithelial cells in vitro. **Endocrinology**, v. 118, n. 3, p. 1011–1018, 1986.

VAN CRUCHTEN, S. *et al.* Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 62, n. 3–4, p. 631–641, 2004.

VERMEIRSCH, H. *et al.* Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 729–743, jan. 1999.

VERMEIRSCH, H. *et al.* Immunohistochemical detection of progesterone receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 773–788, fev. 2000.

VIVAR, O. I. *et al.* Estrogen receptor β binds to and regulates three distinct classes of target genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22059–22066, 2010.

VOORWALD, F. Aspectos clínicos, histopatológicos e expressão gênica do endométrio de cadelas acometidas por hiperplasia endometrial cística, mucometra e piometra. **Aleph**, p. xviii, 274 p. : il., 2014.

YU, M. *et al.* Novel function of pregnancy-associated plasma protein A: Promotes endometrium receptivity by up-regulating N-fucosylation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

ZHU, L.; POLLARD, J. W.; ROBERTS, M. Estradiol-17_{NL} regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. v. 104, n. 40, p. 1–5, 2007. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/pnas/104/40/15847.full.pdf>.

CAPÍTULO 2

3. ARTIGO CIENTÍFICO NAS NORMAS DA REVISTA ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE (Qualis A2 na Medicina Veterinária)

3.1 Folha de título

Esteroides sexuais alteram a expressão de genes relacionados com a proliferação celular e receptores esteroideogênicos no útero ao longo do diestro de cadelas não gestantes

Vanessa da Silva Alves Gossler^a, Francislaine Anelize Garcia Santos^b, Aline de Oliveira Santos^a, Ana Paula Mattoso Miskulin Cardoso^c, Paula de Carvalho Papa^b, Natalia Caroline de Oliveira Marçal^a, Lilian Francisco Arantes de Souza^a, Caliê Castilho^a, Ines Cristina Giometti^{a*}.

^a Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Campus II, Rod. Raposo Tavares, Km 572, Bairro Limoeiro, CEP: 19067-175, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

^b Universidade de São Paulo (USP), Av. Dr. Orlando Marques Paiva, 87, CEP: 05508-270, São Paulo, São Paulo, Brasil.

^c Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rua Roberto Simonsen, 305, Centro Educacional, CEP 19060-900 Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente em: Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Campus II, Rod. Raposo Tavares, Km 572, Bairro Limoeiro, CEP: 19067-175, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

Endereço de e-mail: inesgiometti@yahoo.com.br

Destaques:

Expressão de genes ligados à proliferação celular em diestro de cadelas não gestantes;

Expressão gênica de ERS2 e IGFbps alteram durante o diestro no útero de cadelas; Correlação entre hormônios esteróides e abundância relativa de mRNA no útero de cadelas;

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar a correlação das variações hormonais na expressão gênica dos membros do sistema IGF1 e dos receptores de estradiol e progesterona em úteros de cadelas não gestantes, durante o diestro. Foram utilizados cornos uterinos de 29 cadelas após ovariectomia (OHE) eletiva aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 ($n = 4$ ou 5 por grupo) dias pós-ovulação. O tecido foi analisado por RT-qPCR quanto à abundância relativa de RNAm para IGF1, IGFR1, IGFBP3, IGFBP4, PAPP, PGR, ERS1 e ESR2. Foram colhidas amostras de sangue no momento da OHE e realizada dosagem de E2 e P4. A correlação entre as dosagens plasmáticas dos hormônios esteroides e a expressão relativa dos genes-alvos foi realizada. A expressão gênica relativa de ESR2 foi menor nos dias 40 e 50, comparado aos dias 10, 20 e 30 pós-ovulação. ($P < 0,05$), além de apresentar correlação positiva com P4. A expressão gênica relativa de IGFBP3 aumenta por todo o diestro ($P < 0,05$) e a de IGFBP4 é maior no final (dias 50 e 60) e se correlaciona negativamente com P4 e positivamente com a razão E2/P4. Conclui-se que a expressão gênica do receptor de estrogênio β (gene ESR2) é regulado durante o diestro no útero de cadelas, e que é positivamente correlacionado com a P4, sugere-se que a sua diminuição seria um mecanismo envolvido na maior proliferação celular do endométrio após o dia 30 em resposta ao E2. Sugere-se ainda que os moduladores locais do sistema IGF1 são as IGFBP3 e IGFBP4 nos cornos uterinos de cadelas não prenhes.

Palavras-chave: Cães; ESR; Fase luteínica; RT-qPCR; Útero.

3.2 Introdução

Durante o longo diestro da cadela (Concannon, 2011) ocorrem alterações endócrinas importantes, as quais foram bem caracterizadas por Fonseca et al. (2012) que observam que há uma concentração moderada de estradiol (E2) e P4 aos 10 dias pós-ovulação com aumento gradativo de ambos a partir desse momento. O pico de P4 ocorre aos 20 dias com posterior declínio, sendo que os 30 dias pós-ovulação apresenta moderada produção de P4 e crescente de E2. Aos 40 dias, observa-se a maior concentração de E2 do diestro, com decrescente nível de P4. Já aos 50 dias começa a queda gradativa de ambos, já se encontra próxima aos níveis basais, resultando nas menores concentrações desses esteroides gonodais aos 60 dias.

O sistema IGF está envolvido na proliferação celular em muitos tecidos, incluindo o útero. Os IGFs (IGF1 e IGF2) são fatores de crescimento produzidos na maioria dos órgãos e tecidos do organismo, possuindo ações autócrinas, parácrinas e endócrinas sobre o metabolismo intermediário, proliferação, crescimento e diferenciação celular. Associam-se com elevado grau de especificidade e de afinidade à família de seis proteínas ligadoras, denominadas IGFBPs (IGFBP-1 a -6), as quais modulam suas atividades. A maioria das ações conhecidas dos IGFs é exercida mediante sua ligação com o receptor tipo 1 (IGF1R, Ranke, 2015). Os mecanismos que regulam as ações do IGF envolvem disponibilidade de receptores, abundância de IGFBPs e atividade de proteases, como a proteína plasmática associada à gestação (PAPPA), disponíveis para regular concentrações locais de IGF (Sato et al., 2002).

Durante o ciclo estral, o útero canino sofre modificações morfológicas diversas sob influência de estrógeno e progesterona (Barrau et al., 1975), sendo o desenvolvimento do endométrio resultante de atividades e respostas celulares à fase proliferativa e fase secretória do ciclo estral, reguladas por esteroides ovarianos como estrógeno e progesterona (Graham et al., 1990). Podem ocorrer modificações histológicas endometriais durante os momentos diferentes do ciclo estral (Cruz, 2011; Rehm et al., 2007) e alterações patológicas ou induzidas por hormônios (Dhaliwal et al., 2002, 1999; Monteiro et al., 2009).

O diestro é o período do ciclo estral em que o endométrio atinge a sua maior espessura e densidade celular (Cruz, 2011; Rehm et al., 2007). Foi observado que

durante o diestro das cadelas, há uma maior proliferação celular no endométrio aos 40 dias após a ovulação, momento de maior concentração de E2, quando comparado aos 60 dias após a ovulação (Gossler et al., 2017).

Os hormônios esteroides regulam a expressão de fatores de crescimento como IGF1 e IGF2 no endométrio, pois possuem propriedades mitogênicas e de diferenciação celular, com efeitos na proliferação epitelial no endométrio de ratos e humanos (Sato et al., 2002). Embora alguns trabalhos em cadela relatem a influência da abundância relativa de RNAm de IGF1, IGF1R, IGFBP3, IGFBP4, proteína plasmática A associada à gestação (PAPPA), receptores de E2 (ESR1 e ESR2) e de P4 (PGR) em cadelas em diestro gestacional como a influência na decidualização do endométrio de cadelas (Graubner et al., 2017; Kautz et al., 2015) e na implantação do embrião (Schäfer-Somi et al., 2008; Serhat, 2014), não foram identificados trabalhos que verificassem a expressão desses genes em cadelas não gestantes durante o diestro, nem que correlacionassem com as fases específicas das alterações dos hormônios esteroides desse período.

Adicionalmente, a elucidação da fisiologia molecular do endométrio das cadelas no diestro contribui para a prevenção e tratamento de patologias relacionados ao endométrio não-gravídico em cadelas, como a hiperplasia endometrial cística (CEH) e a piometra, provocadas pela P4 produzida no diestro (Concannon, 2011). Com isso o estudo de alguns genes envolvidos no sistema IGF (IGF1, IGF1R, IGFBP3, IGFBP4 e PAPPA) e genes dos receptores esteroidogênicos (PGR, ESR1 e ESR2) e sua interação com as modificações hormonais que ocorrem no diestro podem ajudar a compreendermos melhor a importância desses genes no diestro não cíclico.

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito dos esteroides sexuais na expressão gênica dos membros do sistema IGF1 e dos receptores de estradiol e progesterona em cornos uterinos de cadelas não prenhes, ao longo do diestro.

3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Aspectos éticos

O presente estudo seguiu os procedimentos éticos na experimentação animal e foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais Institucional (protocolo do

CEUA número 3700). Os tutores dos animais assinaram autorização para o procedimento cirúrgico, para as colheitas de sangue e de amostras uterinas.

3.3.2 Delineamento experimental

Vinte e nove cadelas clinicamente saudáveis, de diferentes idades e sem padrão de raça definido, foram submetidas à cirurgia eletiva de OHE em clínica particular, aos 10 ($n=5$), 20 ($n=5$), 30 ($n=5$), 40 ($n=5$), 50 ($n=4$) e 60 ($n=5$) dias pós-ovulação, constituindo assim os 6 grupos deste estudo.

3.3.3 Colheita de amostras

A ovulação foi determinada realizando um acompanhamento das cadelas por meio de colheitas de amostras de sangue, em dias alternados, para dosagem sérica de P4 após o início da secreção vulvar sanguinolenta. O dia da ovulação (dia 0) foi definido como o dia em que a concentração da P4 periférica foi ≥ 5 ng/mL (Concannon et al., 1989). A cirurgia de OHE foi realizada nas cadelas de forma totalmente aleatória nos dias necessários para formar os grupos experimentais (10, 20, 30, 40, 50 e 60 pós-ovulação).

No dia determinado da OHE, o sangue foi colhido para a dosagem de P4 e E2 por quimioluminescência e foram colhidas também amostras de corno uterino no terço médio e imersas em TRIzol[®] (ThermoFisher Scientific[®]), congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para a realização da PCR em tempo real.

3.3.4 Abundância relativa dos genes

Os tecidos armazenados para qPCR foram triturados em homogeneizador de tecidos (Homomix[®], Biosystems, PR, Brasil) e submetidos ao protocolo de extração do TRIzol[®] (ThermoFisher Scientific[®], Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (BioPhotometer[®], Eppendorf, Alemanha). Todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-qPCR, (DNase I – Amplification Grade, Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA).

A transcrição reversa foi realizada utilizando o protocolo da SuperScript™III Reverse Transcriptase (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) seguindo protocolo do fabricante com oligonucleotídeos iniciadores randômicos.

A qPCR foi realizada para a análise quantitativa da expressão gênica relativa. Como controle interno das reações foram utilizados os genes de referência gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina fosforibosil-transferase 1 (HPRT1) e proteína ribossomal L13 (RPL13) a fim de normalizar os resultados obtidos para os genes-alvo. O programa NormFinder (MOMA, Aarhus, Denmark) foi usado para determinar a melhor combinação entre os genes de referência que se apresentaram mais estáveis nessas condições experimentais. Sendo utilizados a média geométrica dos genes de referência GAPDH e HPRT1 para normalização dos dados. Os oligonucleotídeos iniciadores (“*Ensaio*”) para os genes foram obtidos a partir de ensaios TaqMan® (Applied Biosystems®, Foster, USA), já padronizados (Tabela 1).

Tabela 1: “*Ensaio*” (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados na reação de qPCR para verificação da expressão gênica relativa no tecido uterino de cadelas não prenhes em diferentes momentos do diestro (10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a ovulação).

"Ensaio"	Gene	GeneBank	Produto
IGF1	Alvo	NM001313855.1	145pb
IGF1R	Alvo	XM014112396.1	82pb
IGFBP3	Alvo	XM003639557.2	85pb
IGFBP4	Alvo	XM845091.3	98pb
PAPPA	Alvo	XM538813.6	75pb
PGR	Alvo	NM001003074.1	122pb
ESR1	Alvo	NM001286958.1	108pb
ESR2	Alvo	XM005623489.2	85pb
GAPDH	Gene de referência	NM001003142.2	54pb
HPRT1	Gene de referência	NM001003357.2	136pb
RPL13	Gene de referência	XM536749.4	88pb

IGF1 = fator de crescimento semelhante à insulina; IGF1R = receptor de IGF1; IGFBP3 e 4 = proteínas ligadoras de IGF tipo 3 e 4; PAPPA = proteína plasmática A associada à gestação; PGR = receptor de progesterona; ESR1 e ESR2 = genes para os receptores de estrogênio α e β ,

respectivamente; GAPDH = gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; HPRT1 = hipoxantina fosforibosil-transferase 1; RPL13 = proteína ribossomal L13

As reações de qPCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a expressão determinada pela quantificação em relação ao gene de referência. O cálculo das eficiências para os genes alvos e os genes de referência foi feito pelo programa “LinRegPCR” (Ruijter et al., 2009). Para isso, considerou-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra. Para quantificação relativa das amplificações foi empregado o método de Pfaffl (2001), utilizando a média do grupo 10 dias como calibrador.

3.3.5 Análise Estatística

Todos os resultados foram analisados quanto ao pressuposto de normalidade empregando-se o teste de Shapiro-Wilk. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Student Newman Keuls. A correlação entre as dosagens plasmáticas dos hormônios esteroides e a expressão relativa dos genes-alvos foi feita por meio do método de Pearson. O nível de significância adotado foi de 5%.

3.4 Resultados

A expressão gênica relativa de PGR, ESR1, IGF1, IGF1R e PAPPA não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) nos períodos avaliados de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias pós-ovulação. (Figura 1).

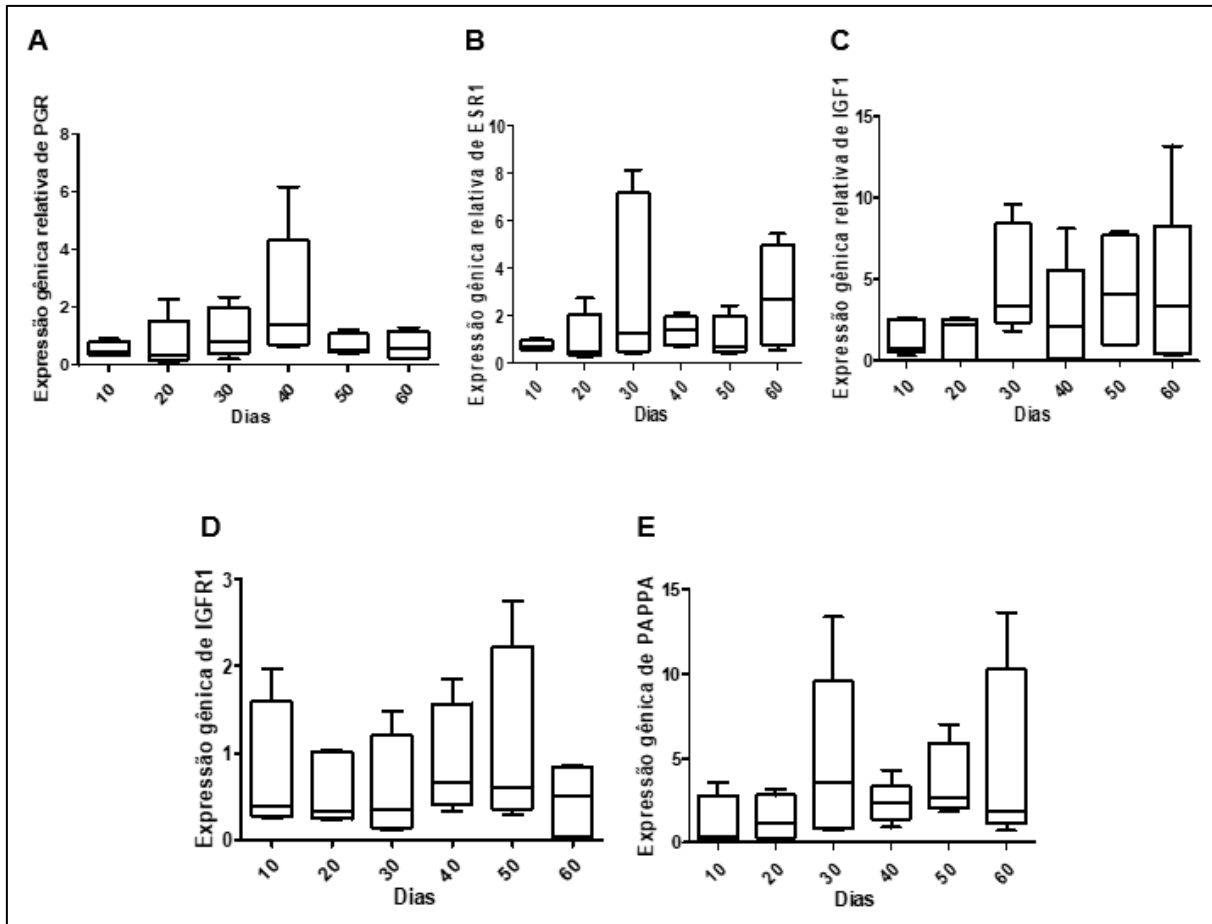


Figura 1: Abundância relativa de RNAm do PGR (A), ESR1 (B), IGF1 (C), IGF1R (D) e PAPP A (E) em cornos uterinos de cadelas colhidos aos 10 ($n=5$), 20 ($n=5$), 30 ($n=5$), 40 ($n=5$), 50 ($n=4$) e 60 ($n=5$) dias após a ovulação. Dois genes de referência (GAPDH e HPRT1) foram utilizados para normalização dos dados. Kruskal- Wallis seguido de Student Newman Keuls. Não foram encontradas diferenças entre os grupos ($P>0,05$).

Já para os genes ESR2, IGFBP3 e IGFBP4, a abundância relativa de RNAm apresentou diferenças significativas ($P<0,05$). O ESR2 apresentou maior abundância relativa aos 10, 20 e 30 dias pós-ovulação ($P<0,05$) quando comparado aos 40 e 50 dias pós-ovulação (Figura 2A).

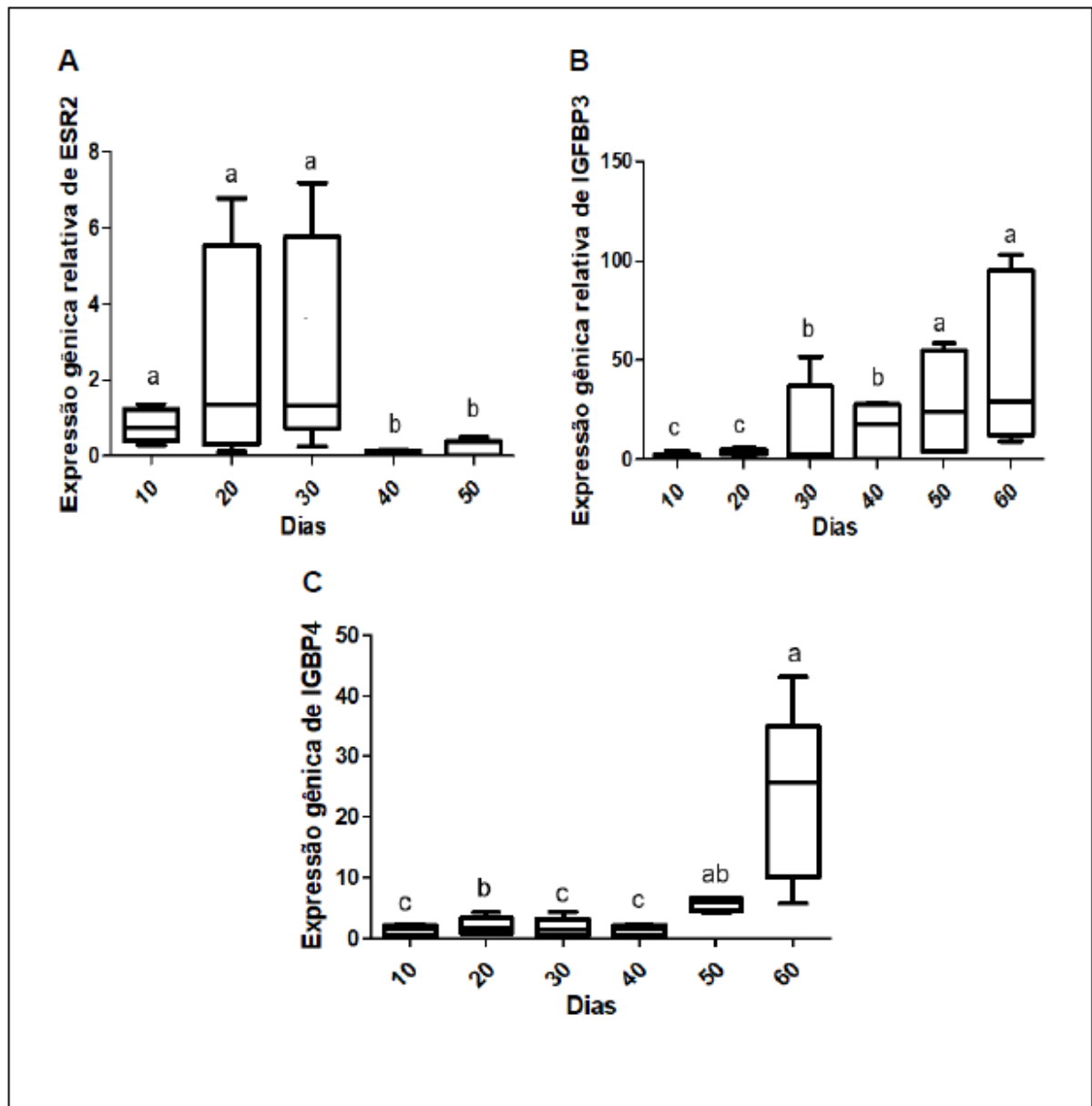


Figura 2: Abundância relativa de ESR2 (A) em cornos uterinos de cadelas colhidos aos 10 ($n=5$), 20 ($n=5$), 30 ($n=5$), 40 ($n=5$) e 50 ($n=4$) dias após a ovulação e abundância relativa de IGFBP3 (B) e IGFBP4 (C) aos 10 ($n=5$), 20 ($n=5$), 30 ($n=5$), 40 ($n=5$), 50 ($n=4$) e 60 ($n=5$) dias após a ovulação. Dois genes de referência (GAPDH e HPRT1) foram utilizados para normalização dos dados. Kruskal- Wallis seguido de Student Newman Keuls. Letras diferentes (a;b;c) indicam diferença estatística significativa ($P<0,05$).

A análise da abundância relativa de RNAm de IGFBP3 revelou que houve aumento significativo ($P<0,05$) no decorrer do diestro (Figura 2B), com menor abundância de RNAm aos 10 e 20 dias pós-ovulação, abundância intermediária aos 30 e 40 dias pós-ovulação e maior abundância aos 50 e 60 dias ($P<0,05$).

Analisando a expressão gênica relativa de IGFBP4, observou-se que houve um aumento ($P<0,05$) no dia 20 e no final do diestro (Figura 2C). Na análise de correlação de Pearson (r) entre as dosagens dos hormônios E2 e P4 das cadelas e suas respectivas análises de expressão gênica relativa dos genes-alvo, nenhuma correlação foi observada com a concentração plasmática de E2 (Tabela 2), contudo foi verificada correlação positiva ($P<0,05$) entre ESR2 e P4 plasmática e correlação negativa ($P<0,05$) entre IGFBP4 e P4 (Tabela 3). Houve correlação positiva ($P<0,05$) entre IGFBP4 e a razão entre E2/P4 (Tabela 4).

Tabela 2: Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre dosagem de estradiol (E2) e abundância relativa de RNAm de PGR, ESR1, ESR2, IGF1, IGFR1, IGFBP3, IGFBP4 e PAPPa, dados estimados por ponto e por intervalo com 95% de confiança (IC95%) e significância estatística (P) do teste t.

	Estradiol (pg/mL)			
	IC95		Correlação (r)	Valor de P
PGR	-0.49	0.27	-0.1322	0.5198
ESR1	-0.5	0.26	-0.1403	0.4942
ESR2	-0.56	0.28	-0.1752	0.4474
IGF1	-0.48	0.28	-0.1199	0.5595
IGFR1	-0.43	0.35	-0.0452	0.8265
IGFBP3	-0.34	0.43	0.0564	0.7844
IGFBP4	-0.36	0.42	0.0359	0.8619
PAPPa	-0.52	0.26	-0.1543	0.4616

Tabela 3: Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre dosagem de progesterona (P4) e abundância relativa do RNAm de PGR, ESR1, ESR2, IGF1, IGFR1, IGFBP3, IGFBP4 e PAPPa, dados estimados por ponto e por intervalo com 95% de confiança (IC95%) e significância estatística (P) do teste t. *Valores significativos $P<0,05$.

	Progesterona (ng/mL)			
	IC95		Correlação (r)	Valor de P
PGR	-0.43	0.34	-0.05	0.8083
ESR1	-0.35	0.42	0.0418	0.8394
ESR2	0.13	0.78	0.5329	0.0128*
IGF1	-0.47	0.3	-0.0976	0.6352
IGFR1	-0.38	0.39	0.0033	0.9874
IGFBP3	-0.63	0.08	-0.3142	0.1179
IGFBP4	-0.72	-0.09	-0.4622	0.0174*
PAPPa	-0.38	0.41	0.0159	0.9399

* $P<0,05$

Tabela 4: Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre razão das dosagem de estradiol e progesterona razão (E2/P4) e abundância relativa do RNAm de PGR, ESR1, ESR2, IGF1, IGFR1, IGFBP3, IGFBP4 e PAPPa, dados estimados por ponto e por intervalo com 95% de confiança (IC95%) e significância estatística (P) do teste t.*Valores significativos $P < 0,05$.

	Razão E2/P4			
	IC95		Correlação (r)	Valor de P
PGR	-0.48	0.29	-0.113	0.5824
ESR1	-0.48	0.29	-0.1137	0.5801
ESR2	-0.67	0.11	-0.3388	0.133
IGF1	-0.45	0.32	-0.0733	0.722
IGFR1	-0.47	0.3	-0.0993	0.6292
IGFBP3	-0.37	0.41	0.0257	0.901
IGFBP4	0.23	0.78	0.5663	0.0025*
PAPPa	-0.56	0.2	-0.2095	0.3149

* $P < 0,05$

3.5 Discussão

Este estudo descreveu pela primeira vez a influência de esteroides sexuais sobre a abundância relativa dos marcadores de proliferação celular IGF1, IGF1R, IGFBP3, IGFBP4, PAPPa, ESR1, ESR2 e PGR em momentos específicos do diestro (10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias pós-ovulação) das cadelas não gestantes, assim como a correlação da expressão desses genes com as flutuações hormonais do diestro.

Embora nenhuma alteração da expressão gênica de ESR1 tenha sido observada nos momentos avaliados do diestro, o ESR2 apresentou maior expressão gênica relativa no início do diestro, dos dias 10 a 30 pós-ovulação e queda aos 40 dias, o que demonstra uma regulação apenas do receptor β durante o diestro.

Além disso, foi verificada uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de P4 e a expressão relativa do gene ESR2 no útero, que não ocorre com o ESR1. Níveis plasmáticos elevados de estrógeno resultam em elevação na quantidade de ER e PGR, enquanto concentrações plasmáticas elevadas de progesterona, resultam em redução da quantidade de ER e PGR (Chu et al., 2002; Galabova-Kovacs et al., 2004). (Van Cruchten et al., 2004) relatam que a progesterona promove diferenciação e proliferação das glândulas endometriais basais, e inibição da proliferação induzida por estrógenos (proliferação das células epiteliais superficiais, células estromais, vasos sanguíneos e criptas no endométrio). Possivelmente a progesterona inibe somente o ESR1 e não ESR2, diminuindo a

proliferação celular. O corpo lúteo é o responsável pela produção de P4 e 17 β -estradiol durante o diestro nas cadelas (Papa and Hoffmann, 2011), com maior produção de P4 na fase inicial do desenvolvimento do corpo lúteo e aumento de E2 na fase de manutenção (De Carvalho Papa et al., 2014). Diferentemente de outras espécies, a duração da função do corpo lúteo é idêntica em cadelas gestantes e não gestantes, no entanto em cadelas não gestantes a regressão é mais lenta e pode durar mais tempo (Kowalewski, 2014). Apesar das médias de concentração de P4 sérica não diferirem entre cadelas gestantes e não gestantes, as cadelas prenhes, podem apresentar um segundo aumento de P4 entre os dias 25 e 30, além de ter provavelmente uma maior produção de P4, já que pode estar sendo diluída pelo aumento do volume sanguíneo e sequestrada pela placenta (Concannon, 2011, 2009).

O endométrio da cadela sofre alterações morfológicas e bioquímicas durante todo o ciclo estral, e essas alterações estão associadas com a proliferação, a apoptose e a diferenciação celular (Cruz, 2011). O diestro é o período do ciclo estral em que o endométrio atinge a sua maior espessura e densidade celular (Cruz, 2011; Rehm et al., 2007). Foi observado que durante o diestro das cadelas, há uma maior proliferação celular no endométrio aos 40 dias após a ovulação, momento de maior concentração de E2 comparado aos 60 dias pós-ovulação (Gossler et al., 2017) e momento esse em que a expressão de ESR2 esteve mais baixa nesse estudo.

A menor expressão relativa de mRNA de ESR2 aos 40 dias pós ovulação, associada a uma maior concentração de E2, pode influenciar a proliferação celular do endométrio, já que neste período há uma predominância de ESR1 e como verificado por Gossler et al. (2017) maior proliferação celular observada no útero não gestacional. Vivar et al. (2010) relatam que, em geral, o ER α promove a proliferação celular e o ER β parece ter um papel antiproliferativo. Como a expressão proteica dos receptores de 17 β -estradiol no útero não foi realizada no nosso estudo, não se pode inferir se a produção proteica acompanharia a abundância relativa de RNAm.

As doenças uterinas mais frequentemente encontradas em cadelas não prenhes são a CEH e a piometra (Jitpean et al., 2014, 2012; Moxon et al., 2016). Ambas patologias ainda não tem uma etiologia bem definida, no entanto, é aceito que vários fatores podem ter influência, incluindo a ação conjunta de hormônios esteroides (P4 e estrógeno) durante ciclos reprodutivos sucessivos e a influência de fatores de proliferação endometrial, como o IGF1 (Almeida et al., 2016; Schlafer and

Gifford, 2008), com a influência da P4 desempenhando um papel importante na patogênese dessas enfermidades (Hagman, 2017). (Voorwald, 2014) verificou uma expressão gênica reduzida do receptor de estrógeno β (ESR2), no endométrio hiperplásico, secretório e infeccioso de fêmeas caninas, em relação ao endométrio controle (endométrio normal) na fase de diestro, sugerindo que o ESR2 inibe a atividade mitogênica de estrógenos e que o ESR2 pode desenvolver papel no controle da proliferação celular. Nosso estudo mostra uma diminuição da abundância relativa de ESR2 no período de menor proliferação celular do diestro, o que corrobora com o efeito inibitório do ESR2 sobre a proliferação celular.

Não foram encontradas diferenças significativas ($P>0,05$) na expressão gênica de PGR ou de IGF1 no decorrer do diestro. Schäfer-Somi et al. (2008) detectaram a expressão gênica de IGF1 e PGR no útero aos 10 dias após implantação do embrião quanto no útero não gestante aos 10 dias do diestro, porém realizou o estudo somente neste período do diestro e em cadelas gestantes. Graubner et al. (2017) relataram um aumento na expressão gênica de PGR e PRLR em células decidualizadas *in vitro* de cadelas no início da gestação, aproximadamente 15 dias após a ovulação, implicando assim seu envolvimento na decidualização dependente de P4 no útero canino. O PGR tem menor expressão em cadelas gestantes do que nas não prenhes aos 12 dias após a onda de LH (10 dias pós-ovulação), único momento avaliado em cadelas não gestantes que foi igual ao de cadelas gestantes aos 6 dias pós-ovulação diminuindo consideravelmente até os 19 dias pós-ovulação (21 dias da onda folicular) (Derussi et al., 2012). Infelizmente, também não há como saber como se comporta a expressão de PGR em cadelas prenhes nos momentos posteriores dos 19 pós-ovulação até o momento próximo ao parto, pois não foi avaliado no estudo de Derussi et al. (2012). Porém, está clara a diferença de comportamento na expressão gênica de PGR uterina entre cadelas prenhes e não prenhes, já que a redução verificada na expressão de PGR de cadelas gestantes não foi observada em cadelas não gestantes. Nossa hipótese é que a PGR deve estar envolvida na patogênese da CEH e da piometra, já que sua abundância relativa é maior em cadelas não gestantes aos 10 dias pós-ovulação e permanece alta, como verificada em nosso estudo. Porém, estudos de expressão proteica e funcionais são necessários para a confirmação dessa hipótese.

Não foi verificada expressão gênica significativa com relação ao receptor de progesterona no endométrio normal, hiperplásico, secretório ou infeccioso, por

(Voorwald, 2014), assim como verificado por (De Bosschere et al., 2002) e (Ververidis et al., 2004), em técnicas semi quantitativas e qualitativas, o que também ocorreu em nosso estudo no caso do endométrio normal.

As IGFBPs modulam os efeitos do IGF e provavelmente influenciam na função luteínica durante o diestro (Brown and Braden, 2001). Foi verificada maior expressão gênica de IGFBP3 e IGFBP4 no final do diestro, sem acompanhamento de qualquer alteração significativa na expressão gênica de PAPP A, que é uma metaloproteinase responsável pela degradação das IGFBPs (Clemmons, 2015; Holly and Perks, 2006). Então, pode-se considerar que essas duas IGFBPs aumentam no final do período de diestro, diminuindo a biodisponibilidade dos IGF1. Há expressão gênica de IGF1 no útero de cadelas gestantes e não gestantes no dia 10 após o acasalamento, enquanto o IGF2 só é expresso nas cadelas prenhes (Beceriklisoy et al., 2009).

A expressão de PAPP A não se alterou durante o diestro, mas foi expressa em todos os momentos. A PAPP A cliva IGFBP4 e libera o IGF1 que se torna bioativo para se ligar ao seu receptor e ativar sua cascata de sinalização via IGF1R, para facilitar a receptividade do endométrio ao embrião (Yu et al., 2017). Assim como não foi verificada alteração na expressão gênica do IGF1 e do PAPP A, também nenhuma alteração foi verificada na abundância relativa de RNAm para IGF1R. O que coloca o aumento da expressão gênica dos IGFBP3 e IGFBP4 no centro da regulação da proliferação celular do endométrio. Como observado por Gossler et al. (2017), há uma maior proliferação celular no dia 40 pós-ovulação quando comparado com o dia 60 pós ovulação o que pode ser um efeito da ligação do IGF1 aos IGFBPs no dia 60 pós-ovulação, diminuindo a sua biodisponibilidade para os seus receptores e interferindo negativamente na proliferação celular.

O aumento da expressão gênica de IGFBP3 e IGFBP4 pode estar relacionado com a diminuição da proliferação celular observada por Gossler et al. (2017) no final do diestro, uma vez que eles são inibidores do crescimento em muitos sistemas *in vitro* e *in vivo* (Bach, 2015; Baxter, 2015). A IGFBP3 possui efeitos inibitórios na proliferação celular, mediados pela indução de apoptose (Baxter, 2015; Grimberg, 2000; Johnson and Firth, 2014; Ranke, 2015) e inibição da angiogênese (Kim et al., 2011), enquanto IGFBP4 inibe a esteroidogênese (Bach, 2015) e a angiogênese (Bach, 2015; Cardoso, 2016; Moreno et al., 2015; Ryan et al., 2009).

No caso do IGFBP4, uma correlação negativa com P4 foi verificada em nosso estudo. A P4 começa a declinar no meio do diestro, alcançando valores semelhantes ao dia 10 no dia 40 e depois continua diminuindo até a concentração próxima de 1 ng/mL no dia 60 (Fonseca et al., 2012; Hoffmann et al., 2004), o que coincide com os padrões de expressão gênica relativa IGFBP4 no útero de cadelas.

Uma correlação positiva ($P < 0,05$) entre IGFBP4 e a razão E2/P4 foi verificada em nosso estudo e reflete o efeito positivo do E2 e a influência negativa de P4 na expressão gênica da IGFBP4. A clivagem de IGFBP4 é aumentada pela presença de IGF, enquanto a clivagem de IGFBP5 é levemente reduzida (Søe et al., 2002). Henemyre e Markoff (1999) descrevem a expressão de RNAm de IGFBP4, IGF1 e IGF1R em todo ciclo estral no útero de ratas e sugerem que a expressão de IGFBP4 uterina pode não depender da expressão do IGF1 uterino já que o IGFBP4 sofre variações durante o ciclo estral tanto na localização celular quanto na expressão gênica. Além disso, os IGFBPs têm independência do IGF em efeitos biológicos (Ranke, 2015). O IGFBP4 pode ter papel na fisiologia uterina independente da inibição ação do IGF1, já que o IGF1R é constitutivamente expresso no útero do rato (Henemyre and Markoff, 1999).

A expressão gênica de IGFBP3, embora não tenha apresentado correlação com os hormônios esteroides, aumentou no útero das cadelas durante todo o diestro no presente estudo. Em cadelas há uma correlação positiva entre o IGF1 sérico e a concentração de IGFBP3 (Reynaud et al., 2010), sendo que outros fatores podem estar envolvidos na regulação de IGFBP3, como o GH e a prolactina. Pois em cadelas cíclicas, o padrão de secreção pulsátil de GH muda durante a progressão da fase luteínica, em que a secreção basal de GH aumenta e a secreção pulsátil de GH diminui com concentrações de P4 séricas maiores, além disso, a prolactina aumenta no diestro, quando a P4 começa a declinar, na segunda metade do diestro (Kooistra and Okkens, 2002)..

Portanto, nossos dados sugerem uma regulação do sistema IGF, juntamente com a P4 e o E2 e seus receptores no útero canino.

3.6 Conclusão

Concluimos que a expressão gênica do receptor de estrogênio β (do gene ESR2) é regulado durante o diestro no endométrio de cadelas, e que é

positivamente associado com a P4, e ainda que a sua diminuição seria um mecanismo envolvido na maior proliferação celular do endométrio após o dia 30 em resposta ao E2.

Nossos dados sugerem ainda que os moduladores locais do sistema IGF1 são as IGFBP3 e IGFBP4 nos cornos uterinos de cadelas não prenhes, pois há o aumento da sua expressão gênica durante o diestro e o IGFBP4 é correlacionado negativamente com a produção de P4.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Financiamento: Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) [Código de Financiamento 001] e Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) [2014/00739-9].

4 REFERÊNCIAS

- Almeida, G., Veiga, L., Miziara, R.H., Souza, D., Angrimani, R., Papa, P.C., Cogliati, B., Vannucchi, C.I., 2016. Cystic endometrial hyperplasia–pyometra syndrome in bitches: identification of hemodynamic, inflammatory, and cell proliferation changes^{^{<xref ref-type="fn" rid="afn1">†</xref>}. *Biol. Reprod.* 96, 58–69. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140780>}
- Bach, L.A., 2015. Insulin-like growth factor binding proteins-an update. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 13, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.06.002>
- Barrau, M.D., Abel, J.H., Verhage, H.G., Tietz, W.J., 1975. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. *Am. J. Anat.* 142, 47–65. <https://doi.org/10.1002/aja.1001420105>
- Baxter, R.C., 2015. Nuclear actions of insulin-like growth factor binding protein-3. *Gene* 569, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.028>
- Beceriklisoy, H.B., Schäfer-Somi, S., Kücükaslan, I., Agaoglu, R., Gültiken, N., Ay, S.S., Kaya, D., Aslan, S., 2009. Cytokines, growth factors and prostaglandin synthesis in the uterus of pregnant and non-pregnant bitches: The features of placental sites. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 115–119. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01443.x>
- Brown, T.A., Braden, T.D., 2001. Expression of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3, and the effects of IGFBP-2 and -3 in the bovine corpus luteum. *Domest. Anim. Endocrinol.* 20, 203–216. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(01\)00092-3](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(01)00092-3)
- Cardoso, A.P.M.M., 2016. Mecanismo de ação do 17 β -estradiol no corpo lúteo de cadelas não prenhes. Universidade de São Paulo, São Paulo. <https://doi.org/10.11606/T.10.2016.tde-16112016-155438>
- Chu, P.Y., Salamonsen, L.A., Lee, C.S., Wright, P.J., 2002. Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches. *Reproduction* 123, 467–477. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230467>
- Clemmons, D.R., 2015. Insulin-Like Growth Factor-1 and Its Binding Proteins*, Seventh Ed. ed, *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-18907-1.00021-4>
- Concannon, P.W., 2011. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim. Reprod.*

- Sci. 124, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028>
- Concannon, P.W., 2009. Endocrinologic control of normal canine ovarian function, in: *Reproduction in Domestic Animals*. pp. 3–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x>
- Concannon, P.W., McCann, J.P., Temple, M., 1989. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39, 3–25.
- Cruz, S.A. da F., 2011. Proliferação e apoptose celular no endométrio da cadela. Universidade Técnica de Lisboa.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Simoens, P., Coryn, M., 2002. Estrogen- α and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Anim. Reprod. Sci.* 70, 251–259. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00013-1)
- De Carvalho Papa, P., De Carvalho Sousa, L.M.M., Dos Santos Silva, R., De Fátima, L.A., Da Fonseca, V.U., Do Amaral, V.C., Hoffmann, B., Alves-Wagner, A.B., Machado, U.F., Kowalewski, M.P., 2014. Glucose transporter 1 expression accompanies hypoxia sensing in the cyclic canine corpus luteum. *Reproduction* 147, 81–89. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0398>
- Derussi, A.A.P., de Souza, R.W.A., Volpato, R., Guaitolini, C.R.F., Ackermann, C.L., Taffarel, M.O., Cardoso, G.S., Dal-Pai-Silva, M., Lopes, M.D., 2012. Progesterone (PR), Oestrogen (ER- α and ER- β) and Oxytocin (OTR) Gene Expression in the Oviduct and Uterus of Pregnant and Non-pregnant Bitches. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 197–199. <https://doi.org/10.1111/rda.12015>
- Dhaliwal, G.K., England, G.C.W., Noakes, D.E., 2002. The effects of endometrial scarification on uterine steroid receptors, bacterial flora and histological structure in the bitch. *Anim. Reprod. Sci.* 69, 239–249. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00183-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00183-X)
- Dhaliwal, G.K., England, G.C.W., Noakes, D.E., 1999. Oestrogen and progesterone receptors in the uterine wall of bitches with cystic endometrial hyperplasia/pyometra. *Vet. Rec.* 145, 455–457. <https://doi.org/10.1136/vr.145.16.455>
- Fonseca, V.U., Papa, P.C., Campos, D.B., 2012. Potencial envolvimento da adiponectina e seus receptores na modulação da esteroidogênese em corpo lúteo de cadelas ao longo do diestro. *Pesqui. Veterinária Bras.* 32, 1055–1060.

- <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012001000020>
- Galabova-Kovacs, G., Walter, I., Aurich, C., Aurich, J.E., 2004. Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. *Theriogenology* 61, 963–976. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.07.002>
- Gossler, V. da S.A., Santos, F.A.G., Azevedo, A.R., Gonçalves, P.C., Rigolo, H.A., Trevisan, C., Masseno, A.P.B., Cardoso, A.P.M.M., Papa, P. de C., Castilho, C., Giometti, I.C., 2017. Evaluation of cell proliferation and endometrial thickness of bitches in different periods of diestrus. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 1719–1727.
- Graham, R.A., Seif, M.W., Aplin, J.D., Li, T.C., Cooke, I.D., Rogers, A.W., Dockery, P., 1990. An endometrial factor in unexplained infertility. *Br. Med. J.* 300, 1428–1431. <https://doi.org/10.1136/bmj.300.6737.1428>
- Graubner, F.R., Gram, A., Kautz, E., Bauersachs, S., Aslan, S., Agaoglu, A.R., Boos, A., Kowalewski, M.P., 2017. Uterine responses to early pre-attachment embryos in the domestic dog and comparisons with other domestic animal species. *Biol. Reprod.* 97, 197–216. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox063>
- Grimberg, A., 2000. p53 and IGFBP-3: Apoptosis and cancer protection. *Mol. Genet. Metab.* 70, 85–98. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3008>
- Hagman, R., 2017. Molecular aspects of uterine diseases in dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 52, 37–42. <https://doi.org/10.1111/rda.13039>
- Henemyre, C., Markoff, E., 1999. Expression of insulin-like growth factor binding protein-4, insulin-like growth factor-I receptor, and insulin-like growth factor-I in the mouse uterus throughout the estrous cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 52, 350–359. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199904\)52:4<350::AID-MRD3>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199904)52:4<350::AID-MRD3>3.0.CO;2-M)
- Hoffmann, B., Büsges, F., Engel, E., Kowalewski, M.P., Papa, P., 2004. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reprod. Domest. Anim.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00508.x>
- Holly, J., Perks, C., 2006. The role of insulin-like growth factor binding proteins. *Neuroendocrinology* 83, 154–160. <https://doi.org/10.1159/000095523>
- Jitpean, S., Hagman, R., Ström Holst, B., Höglund, O. V., Pettersson, A., Egenvall, A., 2012. Breed Variations in the Incidence of Pyometra and Mammary Tumours in Swedish Dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 347–350. <https://doi.org/10.1111/rda.12103>

- Jitpean, S., Holst, B.S., Höglund, O. V., Pettersson, A., Olsson, U., Strage, E., Södersten, F., Hagman, R., 2014. Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. *Theriogenology* 82, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.014>
- Johnson, M.A., Firth, S.M., 2014. IGFBP-3: A cell fate pivot in cancer and disease. *Growth Horm. IGF Res.* 24, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2014.04.007>
- Kautz, E., de Carvalho Papa, P., Reichler, I.M., Gram, A., Boos, A., Kowalewski, M.P., 2015. In vitro decidualisation of canine uterine stromal cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0066-4>
- Kim, J.H., Choi, D.S., Lee, O.H., Oh, S.H., Lippman, S.M., Lee, H.Y., 2011. Antiangiogenic antitumor activities of IGFBP-3 are mediated by IGF-independent suppression of Erk1/2 activation and Egr-1-mediated transcriptional events. *Blood* 118, 2622–2631. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-299784>
- Kooistra, H.S., Okkens, A.C., 2002. Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197, 167–72.
- Kowalewski, M.P., 2014. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: Regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reprod. Biol.* 14, 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.11.004>
- Monteiro, C.M.R., Perri, S.H. V, de Carvalho, R.G., Koivisto, M.B., 2009. Histologia e morfometria em cornos uterinos de cadelas nul??paras, mult??paras e tratadas com contraceptivos. *Pesqui. Vet. Bras.* 29, 847–851. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2009001000012>
- Moreno, M.J., Ball, M., Rukhlova, M., Slinn, J., L'Abbe, D., Iqbal, U., Monette, R., Hagedorn, M., O'Connor-McCourt, M.D., Durocher, Y., Stanimirovic, D.B., 2015. IGFBP-4 Anti-Angiogenic and Anti-Tumorigenic Effects Are Associated with Anti-Cathepsin B Activity. *Neoplasia* 15, 554–567. <https://doi.org/10.1593/neo.13212>
- Moxon, R., Whiteside, H., England, G.C.W., 2016. Prevalence of ultrasound-determined cystic endometrial hyperplasia and the relationship with age in dogs. *Theriogenology* 86, 976–980. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.022>
- Papa, P.C., Hoffmann, B., 2011. The Corpus Luteum of the Dog: Source and Target of Steroid Hormones? *Reprod. Domest. Anim.* <https://doi.org/10.1111/j.1439->

0531.2010.01749.x

- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Ranke, M.B., 2015. Insulin-like growth factor binding-protein-3 (IGFBP-3). *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 701–711. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.06.003>
- Rehm, S., Stanislaus, D.J., Williams, A.M., 2007. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* <https://doi.org/10.1002/bdrb.20121>
- Reynaud, K., Chastant-Maillard, S., Batard, S., Thoumire, S., Monget, P., 2010. IGF system and ovarian folliculogenesis in dog breeds of various sizes: Is there a link? *J. Endocrinol.* 206, 85–92. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0450>
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M., 2009. Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp045>
- Ryan, A.J., Napoletano, S., Fitzpatrick, P.A., Currid, C.A., O'Sullivan, N.C., Harmey, J.H., 2009. Expression of a protease-resistant insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits tumour growth in a murine model of breast cancer. *Br. J. Cancer* 101, 278–286. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605141>
- Sato, T., Cunha, G.R., Kurita, T., Wang, G., Cooke, P.S., Hardy, M.P., 2002. Role of Systemic and Local IGF-I in the Effects of Estrogen on Growth and Epithelial Proliferation of Mouse Uterus. *Endocrinology* 143, 2673–2679. <https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8878>
- Schäfer-Somi, S., Beceriklisoy, H.B., Budik, S., Kanca, H., Aksoy, O.A., Polat, B., Cetin, Y., Ay, S.S., Aslan, S., 2008. Expression of genes in the canine pre-implantation uterus and embryo: Implications for an active role of the embryo before and during invasion. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 656–663. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00966.x>
- Schlafer, D.H., Gifford, A.T., 2008. Cystic endometrial hyperplasia, pseudo-placentational endometrial hyperplasia, and other cystic conditions of the canine and feline uterus. *Theriogenology* 70, 349–358. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.041>

- Serhat, S., 2014. Expression of genes involved in the embryo-maternal interaction in the early pregnant canine uterus Title : Expression of genes involved in the embryo-maternal interaction in the early pregnant canine uterus Short title : Embryo-maternal interaction in th 147, 703–717.
- Søe, R., Overgaard, M.T., Thomsen, A.R., Laursen, L.S., Olsen, I.M., Sottrup-Jensen, L., Haaning, J., Giudice, L.C., Conover, C.A., Oxvig, C., 2002. Expression of recombinant murine pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and a novel variant (PAPP-Ai) with differential proteolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 269, 2247–2256. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02883.x>
- Van Cruchten, S., Van Den Broeck, W., D’Haeseleer, M., Simoens, P., 2004. Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 62, 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.015>
- Ververidis, H.N., Boscos, C.M., Stefanakis, A., Saratsis, P., Stamou, A.I., Krambovitis, E., 2004. Serum estradiol-17 β , progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. *Theriogenology* 62, 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.011>
- Vivar, O.I., Zhao, X., Saunier, E.F., Griffin, C., Mayba, O.S., Tagliaferri, M., Cohen, I., Speed, T.P., Leitman, D.C., 2010. Estrogen receptor β binds to and regulates three distinct classes of target genes. *J. Biol. Chem.* 285, 22059–22066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.114116>
- Voorwald, F., 2014. Aspectos clínicos, histopatológicos e expressão gênica do endométrio de cadelas acometidas por hiperplasia endometrial cística, mucometra e piometra. *Aleph xviii*, 274 p. : il.
- Yu, M., Wang, J., Liu, S., Wang, X., Yan, Q., 2017. Novel function of pregnancy-associated plasma protein A: Promotes endometrium receptivity by up-regulating N-fucosylation. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04735-0>

ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)

16/05/2019

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

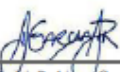
Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EXPRESSÃO GÊNICA DE GRELINA NOS CORNOS UTERINOS DE CADELAS EM DIFERENTES MOMENTOS DO DIESTRO", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 3700 e tendo como participante(s) BRUNA DA SILVA LUIZ (discente), HUGO AUGUSTO RIGOLO (discente), NATALLIA CAROLINE DE OLIVEIRA MARCAL (discente), RAISA THOME ORTEGA (discente), VANESSA DA SILVA ALVES GOSSLER (discente), MAYARA DE OLIVEIRA VIDOTTO (técnico participante), LUCIANA MACHADO GUABERTO (docente), INES CRISTINA GIOMETTI (orientador docente), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 05/04/2017.

Vigência do projeto: 07/2017 a 08/2019.

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Canis familiaris	24	10 quilos	2 anos	F	de proprietário

Presidente Prudente, 7 de Abril de 2017.



Prof. Dr. Air Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI



Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança 370d187a7602debfb232dc30e395f6f

ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIENTÍFICA A QUAL O ARTIGO FOI SUBMETIDO



ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE

An International Journal

AUTHOR

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.3



DESCRIPTION

Animal Reproduction Science publishes original research and timely reviews on topics relating to **reproduction** and **fertility** in **animals**. This includes both fundamental research and applied studies, including management practices that increase our understanding of the **biology** and **manipulation** of reproduction. The focus is on animals that are useful to humans including food- and fibre-producing; companion/recreational; captive; and endangered species including zoo animals, but excluding laboratory animals unless the study reveals new information that impacts our basic understanding of the biology or manipulation of reproduction applicable to the animals listed above.

The journal's scope includes the study of reproductive physiology and endocrinology, reproductive cycles, natural and artificial control of reproduction, preservation and use of gametes and embryos, pregnancy and parturition, infertility and sterility, diagnostic and therapeutic techniques.

Animal Reproduction Science has decided not to publish papers that exclusively examine the *in vitro* development of oocytes and embryos; however, it will consider papers that include *in vitro* studies where the source of the oocytes and/or development of the embryos beyond the blastocyst stage is part of the experimental design.

Authors with any concerns are encouraged to contact the journal to enquire about the suitability of the content of their paper for [submission](#). *Animal Reproduction Science* has no page charges and only publishes papers after rigorous peer review.

AUDIENCE

Research Workers in Animal and Human Reproduction, Animal Health Workers.

IMPACT FACTOR

2017: 1.647 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

Biological Abstracts
 Current Awareness in Biological Sciences PubMed
 MEDLINE®
 Animal Breeding Abstracts Bibliography
 of Reproduction
 Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences Scopus
 Elsevier BIOBASE

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

J.E. Kinder, Ohio State University, Wooster, OH, USA

Associate Editors

C. Aurich, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria

R.A. Cushman, USDA, Clay Center, Nebraska, USA

M. Yeste, University of Girona, Girona, Spain

Editorial Advisory Board

B.M. Alexander, Laramie, WY USA

L.L. Anderson, Ames, IA USA

F.W. Bazer, College Station, TX USA

H. Cardenas, Columbus, OH USA

J.F. Cavalieri, Townsville, QLD, Australia

D. Cavestany, Montevideo, Uruguay

P. Comizzoli, Washington, DC USA

R.A. Dailey, Morgantown, WV USA

S.P. de Graaf, Sydney, NSW, Australia

J.A. Delgadillo, Torreón, Coahuila, Mexico

M.G. Diskin, Athenry, County Galway, Ireland

M-A. Driancourt, Chateauneuf sur Sarthe, France

A.D. Ealy, Gainesville, FL USA

W.L. Flowers, Raleigh, NC USA

J. Ford, Maryville, MO, USA

D.L. Garner, Reno, NV USA

C.L. Gasser, Cedar City, UT USA

W.V Holt, London, UK

K. Imakawa, Kumamoto, Japan

A.L. Johnson, University Park, PA USA

R.J. Mapletoft, Saskatoon, SK, Canada

J.F. Mee, Fermoy, County Cork, Ireland

J.C.F. Moraes, Bage, Brazil

T. Nagai, Ibaraki, Japan

N. Parvizi, Neustadt, Germany

J.R. Pursley, East Lansing, MI USA

J.P. Ravindra, Bangalore, India

R.R. Santos, Lelystad, Netherlands

D.C. Sharp, Gainesville, FL USA

Y-L. Shiue, Kaohsiung, Taiwan

J.F. Smith, Auckland, New Zealand

D.L. Thompson, Baton Rouge, LA USA

A. Turner, Burwood, VIC Australia

S. Uzbekova, Nouzilly, France

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of Paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

Original Research Papers should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles Review manuscripts should fit within the scope for the journal and be of current interest in the realm of animal reproduction in those species on which the journal focuses. Submission of Review Manuscripts to *Animal Reproduction Science* is encouraged. The manuscripts may be submitted without invitation or be invited reviews and should be submitted using the same process as that for Original Research manuscripts.

Contact details for submission

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Animal Reproduction Science important formatting that all submitted manuscripts should adhere

1. Only the first letter of the manuscript title should be capitalized unless there are specific words that should be capitalized (e.g., breed names, species)

2. The abbreviation "et al." in the text of the manuscript should be in regular font and never be italicized
3. The letter "n" indicating number should always be lower case and italicized and the letter "P" indicating probability values needs to be upper case and italicized throughout the manuscript.
4. There should be indentation of the first line of all paragraphs except for the Abstract of the manuscript
5. There should not be a line spacing between paragraphs
6. Proper *Animal Reproduction Science* format has been used for all headings and subheadings throughout the manuscript

Revisions

Please ensure when submitting a revision to complete and include the '[Revision Checklist](#)' file.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/ANIREP>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

The description of analytical methods (e.g. hormone analysis, immunohistochemistry) must include information on quality assessment and method validation for the respective laboratory where sample analysis has been performed.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation

addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Please note:

The first letter of each of the Keywords should be capitalized and with semicolons between each word.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/animal-reproduction-science>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp.281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com> © Copyright 2018 Elsevier |

