ESTELA ROSE ARAÚJO

**Distribuição espacial de transcritos no trato reprodutivo e sua relação
com o ambiente endócrino periovulatório no início do diestro de bovinos de
corte**

São Paulo

2014

ESTELA ROSE ARAÚJO

**Distribuição espacial de transcritos no trato reprodutivo e sua relação com
o ambiente endócrino periovulatório no início do diestro de bovinos de
corte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Mário Binelli

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2966
FMVZ

Araújo, Estela Rose

Distribuição espacial de transcritos no trato reprodutivo e sua relação com o ambiente endócrino periovulatório no início do diestro de bovinos de corte / Estela Rose Araújo. -- 2014.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mário Binelli.

1. Estradiol. 2. Progesterona. 3. Útero. 4. Vagina. 5. Bovinos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Assinaturas da receptividade", protocolado sob o nº 2281/2011, utilizando 160 (cento e sessenta) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Mario Binelli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Signatures of receptivity", protocol number 2281/2011, utilizing 160 (one hundred and sixty) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Mario Binelli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 22 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Araújo, Estela Rose

Título: **Distribuição espacial de transcritos no trato reprodutivo e sua relação com o ambiente endócrino periovulatório no início do diestro de bovinos de corte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr.(a): _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“First learn stand, then learn fly.
Nature’s rule, Daniel-san, not
mine”

The karate kid movie.

AGRADECIMENTOS

Essas letras, palavras, frases e folhas são muito mais que a busca pelo conhecimento e formação de uma Mestre em Medicina Veterinária. Essas singelas linhas, são humildemente uma batalha contra tudo que é imposto e todo o pré-conceito existente.

Agradeço, em lágrimas sinceras, a todos que acreditaram e investiram em mim, mesmo quando as pesquisas científicas indicavam que ia dar errado. Pai, eu sei que você investiu em mim, mesmo quando as pesquisas científicas indicavam que ia dar errado. Pai, eu sei que você estava descrente, você investiu em não colocar limites. Todas as vezes que até você estava descrente, você investiu em não colocar limites. Investiu em tempo e dinheiro. Sacrificou saúde e regalias. Eu sei, agradeço e dedico a você. Ermã (ermã, porque falar irmã é “entedioso”) você estava lá. Só você sabe. Muito obrigada. Essa dissertação também é sua. Mãe, muito obrigada. Padrinhos dedico essa dissertação a vocês, por terem sido minha “musa” inspiradora. Família, muito obrigada. Família que escolhi, muito obrigada. Aqueles que não estão mais presentes mas que participaram dessa batalha chamada mestrado, muito obrigada. Não serão esquecidos.

Encontrei anjos tortos e alguns que não tiveram tanta chance de conhecer a paz no dia a dia do VRA. Todos de alguma forma me ensinaram. Esses que convivi diariamente nesses últimos meses, obrigada pelo bom dia e sorriso sincero às 7 horas da manhã de um domingo chuvoso (Seu João, o senhor mudou meu jeito de pensar a hora que acordo), obrigada pelo ombro amigo quando precisei (Saara e Mariana, Milena, Moana, Ângela, Mariana S., Prof. Kiki, Veerle, Milton), obrigada por me ouvir falar besteira e mesmo assim não perder a paciência (Fernando, Guilherme), obrigada pela cultura do cafezinho (Prof. Ed e Rubens), obrigada por tantas outras coisas que se listar são muitas árvores perdidas. Obrigada LFEM (Cláudia, Everton, Roney, Fábio, Rafa, estagiários, ICs) pelo convívio nem tão sempre harmonioso mas sempre tão gostoso de voltar. Obrigada Clayton, Seu Zé, Márcio, Alexandra, Sandra, amigos e colegas. A todos que perderam seus minutos tão preciosos que nunca voltam comigo.

Prof. Mário, obrigada pela oportunidade. Obrigada por ser tão responsável quanto eu nessa pequena batalha. Por ter insistido nas três disciplinas de estatística, por ter confiado em mim, por ter investido dinheiro e ter me ensinado a engatinhar e caminhar passos trêmulos nesse ambiente de pesquisa.

Agradeço em papel e tinta aqueles que agradeço em pensamento todos os dias. Deus e todos que não vejo porém sinto, muito obrigada. A todos os animais, a todas as vacas que aguentaram minha voz estridente, a todos seres vivos que tem a magia de uma vida sincera dentro de si, muito obrigada. Continuo a comprar a briga de vocês.

A batalha interna e externa continua. Mas continua com seu combatente mais forte.

RESUMO

ARAÚJO, E. R. **Distribuição espacial de transcritos no trato reprodutivo e sua relação com o ambiente endócrino periovulatório no início do diestro de bovinos de corte.** [Different periovulatory endocrine milieus modulate spatial distribution of transcripts in the reproductive tract of beef cows]. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Em bovinos, as flutuações nas concentrações de estradiol (E2) e progesterona (P4) que ocorrem em torno do estro modulam a expressão gênica do endométrio, a composição histotrofo, o desenvolvimento do conceito e assim afetam o resultado da prenhez. Durante o ciclo estral, ações endócrinas bem orquestradas afetam o endométrio bovino (BAUERSACHS et al., 2005). No presente trabalho, a hipótese sustentada é que alterações endócrinas associadas ao crescimento e ovulação de folículos de diferentes tamanhos modulam a distribuição espacial das transcrições no trato reprodutivo de vacas da raça Nelore. O crescimento folicular de vacas Nelore multíparas e não lactantes foi farmacologicamente manipulado a fim de gerar grupos com folículos pré-ovulatórios e subsequente corpo lúteo (ou seja, diferentes ambientes endócrinos periovulatórios) grande (FG – CLG; n = 6) ou pequeno (FP – CLP, n = 6). Os animais foram abatidos, sete dias após a indução da ovulação e fragmentos das regiões anterior, média e posterior de ambos os cornos uterinos e da vagina foram coletados para a avaliação de expressão gênica por PCR quantitativo. A expressão gênica foi normalizada utilizando os genes referência ciclofilina A e beta actina, como indicado pelo *software* GeNorm. Os dados foram analisados utilizando-se o procedimento PROC MIXED do SAS (versão 9.2; Instituto SAS) em dois modelos independentes. O primeiro modelo incluiu os efeitos de grupo (FG – CLG e FP – CLP), lado do corno uterino (ipsolateral ou contralateral ao ovário contendo o CL) e sua interação, o segundo modelo incluiu os efeitos de grupo, região (anterior, médio e posterior) do corno ipsolateral e suas interações. Vacas do grupo FP – CLP apresentou maiores folículos pré-ovulatórios e concentrações de E2 durante proestro e maiores CL e níveis de P4 no diestro inicial, quando comparados com os do grupo FG – CLG. Animais do grupo FP – CLP apresentaram uma maior abundância de transcritos que codificam o receptor de E2 (ESR2; 130%), a aldolase família 1, membro C4 (AKR1C4; 232%), a lipoproteína lipase (LPL; 116%), o carreador de soluto família 2, membro 1 (SLC2A1; 24%) e inibidor da peptidase da serina, subtipo A, membro 14 (SERPINA14; 75%). Por outro lado, a expressão de genes que codificam o receptor de P4 e receptor de oxitocina foi regulada positivamente no tecido

endometrial do grupo FP – CLP (36 % e 966 %, respectivamente). Além disso, a abundância da transcrição desse genes foi maior no corno contralateral ao CL. Além disso, a região anterior do corno uterino ipsolateral apresentou aumentada expressão de PGR, ESR2, LPL, SLC2A1 e SERPINA14 em comparação com a região posterior. Com exceção da OXTR que apresentou interação grupo e lado, não houve interações grupo por lado ou região. Não houve efeito de grupo sobre a expressão de qualquer um dos genes na vagina. Em conclusão, o presente estudo mostrou que o padrão de expressão de genes específicos em resposta variou quanto a grupo e entre as regiões do trato reprodutivo de fêmeas bovinas. No entanto, os distintos ambientes endócrino periovulatórios não afetaram a distribuição regional de transcritos.

Palavras-chave: Estradiol. Progesterona. Útero. Vagina. Bovinos.

ABSTRACT

ARAÚJO, E. R. **Different periovulatory endocrine milieus modulate spatial distribution of transcripts in the reproductive tract of beef cows.** [Distribuição espacial de transcritos no trato reprodutivo e sua relação com o ambiente endócrino periovulatório no início do diestro de bovinos de corte]. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

In cattle, fluctuations of progesterone (P4) and estradiol (E2) concentrations that occur around estrus modulate endometrial gene expression, histotroph composition, conceptus development and, thereby affect pregnancy outcome. During the estrous cycle, well-orchestrated endocrine actions affect the bovine endometrium (BAUERSACHS et al., 2005). In the present work, we hypothesized that endocrine changes associated with growth and ovulation of follicles of different sizes modulate the spatial distribution of transcripts in the reproductive tract of Nelore cows. The follicular growth of multiparous non-lactating Nelore cows was pharmacologically manipulated in order to generate groups with large (LF – LCL; n=6) or small (SF – SCL; n=6) preovulatory follicles and subsequent corpus luteum (i.e., different periovulatory endocrine milieus). Cows were slaughtered seven days after the induction of ovulation and fragments from the anterior, middle and posterior regions from both uterine horns and the vagina were collected. Gene expression assessment was performed by quantitative PCR. Gene expression was normalized using cyclophilin A and actin, beta as reference genes, as indicated by the GeNorm software. Data were analysed using the PROC MIXED procedure of SAS (Version 9.2; SAS Institute) in two independent models. The first model included the effects of group (LF – LCL and SF – SCL), side of the uterine horn (ipsilateral or contralateral to the ovary containing the CL) and interaction and the second model included the effects of group, region of the ipsilateral horn (anterior, middle and posterior) and interaction. Cows in the LF – LCL group presented larger preovulatory follicles and E2 concentrations during proestrus and larger CL and P4 levels during early diestrus when compared to animals from SF – SCL group. Animals in the LF – LCL group had a greater abundance of transcripts coding the estrogen receptor (ESR2; 130%), aldo-keto reductase family 1, member C4 (AKR1C4; 232%), lipoprotein lipase (LPL; 116%), solute carrier family 2, member 1 (SLC2A1; 24%) and serpin peptidase inhibitor, clade A member 14 (SERPINA14; 75%). Conversely, the expression of genes coding the progesterone receptor and oxytocin receptor was upregulated in the SF–SCL endometrial tissue (36% and 966% respectively). Furthermore, transcript abundance of the later genes was observed in the

contralateral horn. In addition, the anterior region of the ipsilateral horn showed increased expression of PGR, ESR2, LPL, SLC2A1 and SERPINA14 compared to the posterior region. Except for a group by side interaction for the expression of OXTR, there were no group by region or group by side interactions. There was no effect of group on the expression of any of the genes in the vagina. In conclusion, our study showed that the expression pattern of specific genes varied in response to group and among regions of the female reproductive tract. However, distinct endocrine periovulatory milieus did not affect regional distribution of transcripts.

Keywords: Progesterone. Estradiol. Uterus. Vagina. Cow.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo hipotético gráfico.....	20
Figure 2 -	Representative pictures of the bovine reproductive system and dissected uterine horn showing the regions studied.....	40
Figure 3 -	Geometric mean of the abundance of relative mRNA expression levels normalized by the PPIA (peptidylprolyl isomerase A; cyclophilin A) and ACTB (actin, beta). Values are expressed as means $\pm$ standard error of the mean.....	49
Figura 4 -	Geometric mean of the abundance of relative mRNA expression levels normalized by the PPIA (peptidylprolyl isomerase A; cyclophilin A) and ACTB (actin, beta). Values are expressed as means $\pm$ standard error of the mean.....	50
Figure 5 -	Relative mRNA expression levels normalized by the PPIA (peptidylprolyl isomerase A; cyclophilin A) and ACTB (actin, beta). Values are expressed as means $\pm$ standard error of the mean.....	51

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Symbols of genes, accession numbers, primer pair sequences, amplicon size and literature references used to generate primers.....	44
Table 2 - Primers validation data for qPCR.....	45
Table 3 - Follicle, CL and P4 measurements of cows ovulating within the first 48 hours post GnRH. Values are expressed as means $\pm$ standard error of the means.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	MODELO HIPOTÉTICO GRÁFICO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	RECEPTIVIDADE UTERINA E SUA RELAÇÃO COM OS HORMÔNIOS ESTEROIDES	21
2.2	GENES RELACIONADOS A RECEPTIVIDADE UTERINA EM BOVINOS.....	24
2.2.1	Receptores de E2, P4 e OT	24
2.2.2	Genes relacionados à manutenção do embrião	25
2.3	ANATOMIA VASCULAR E DIFERENÇAS ESPACIAIS NO TRATO REPRODUTIVO DE FÊMEAS	28
2.4	LOCAL DA TRANSFERÊNCIA DO EMBRIÃO E SUA RELAÇÃO COM A PRENHEZ	33
3	DIFFERENT PERIOVULATORY ENDOCRINE MILIEUS MODULATE SPATIAL DISTRIBUTION OF TRANSCRIPTS IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF BEEF COWS.....	37
3.1	RATIONALE.....	37
3.2	MATERIALS AND METHODS.....	37
3.2.1	Animal model and reproductive management.....	37
3.2.2	Sample collection	38
3.2.3	Sample processing.....	40
3.2.3.1	Radioimmunoassay for measuring P4 and E2 concentrations.....	40
3.2.3.2	RNA extraction and cDNA synthesis	41
3.2.4	Quantitative PCR.....	41
3.2.5	Statistics	46
3.3	RESULTS	46
3.3.1	Animal model	46
3.3.2	qPCR Results	48
3.3.2.1	Side of the uterine horn	48
3.3.2.2	Region of the uterine horn ipsilateral to CL	48
3.3.2.3	Vagina.....	51
3.4	DISCUSSION	51
3.4.1	The animal model: morphologic and endocrine changes.....	53
3.4.2	The animal model: effects on endometrial transcript abundance.....	53

3.4.3	The effect of side of the uterine horn relative to the ovary containing the CL	57
3.4.4	The effect of region of the ipsilateral uterine horn relative to the ovary containing the CL	59
3.4.5	Vagina	61
4	CONCLUSION	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO	76

1 INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é o fator que mais influencia a produtividade e a lucratividade de rebanhos bovinos comerciais. Dentre as estratégias utilizadas mundialmente para que se aumente a taxa de serviço está o uso programado de análogos aos hormônios reprodutivos para prática de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Esta prática possibilita a indução da ovulação de forma precisa e a inseminação de 100% dos animais possíveis de serem inseminados, o que leva a uma taxa de serviço de 100%. Entretanto, as taxas de prenhez (produto da taxa de serviço pela taxa de concepção) à primeira inseminação artificial permanecem por volta de 50% (BARUSELLI et al., 2012; WILTBANK; PURSLEY, 2014) indicando que uma proporção significativa de fêmeas inseminadas falhou em se tornar prenhe. Parte do insucesso gestacional pode estar ligada a uma baixa receptividade uterina.

Receptividade uterina é o termo utilizado para caracterizar o estado em que o útero se prepara favoravelmente para uma possível gestação. Mudanças funcionais ocorrem para que o embrião, que mantém-se no lúmen uterino, possa sobreviver até a implantação que ocorre após o dia 18 da gestação (BAUERSACHS; WOLF, 2012). Até o dia 16 da gestação, mudanças no transcriptoma endometrial são independentes da presença do embrião (FORDE et al., 2011). Durante esse período, mudanças na fisiologia do endométrio permitem que este se adeque às necessidades do embrião (SPENCER; BAZER, 2004). A chave para a receptividade do endométrio são os eventos bioquímicos dinâmicos, precisamente controlados por moléculas que conduzem à implantação e ao estabelecimento da prenhez. Este processo envolve os efeitos coordenados de fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos. O fenótipo da receptividade uterina é resultado do acúmulo de tais efeitos cuja coordenação é atribuída primordialmente aos hormônios ovarianos e à produção local de mensageiros químicos (SALILEW-WONDIM et al., 2012). No entanto, a composição bioquímica do ambiente uterino está apenas começando a ser decifrada e condições associadas com o desenvolvimento ideal do conceito são praticamente desconhecidas (MESQUITA et al., 2012).

De modo geral, as oscilações hormonais fisiológicas que ocorrem no ciclo estral em ruminantes determinam fases distintas de dominância entre os hormônios esteroides sexuais, estradiol (E2) e progesterona (P4; SPENCER et al., 2004). Estes dois hormônios são considerados os principais agentes na coordenação da receptividade uterina (SALILEW-WONDIM et al., 2012). Além disso, a sequência e amplitude da exposição aos hormônios

esteroides E2 e P4 é igualmente importante no controle da receptividade. Folículos ovulatórios maiores tem maior capacidade de produção de E2 e o tamanho deste folículo é positivamente correlacionado com o tamanho do corpo lúteo (CL) formado a partir de sua ovulação, bem como sua capacidade de produzir P4 (VASCONCELOS et al., 2001; LOPES et al., 2007). Tais associações foram recentemente confirmadas em vacas Nelore (MESQUITA et al., 2014). Assume-se, portanto, que a sequência de exposição ao E2 e à P4 seja um conjunto de eventos fisiológicos que devem ser considerados como um todo.

Mesquita et al. (2014) usando estratégias de manejo reprodutivo, geraram dois grupos de animais, com fenótipos diferentes associados com maior ou menor fertilidade. Os grupos apresentaram ambientes endócrinos periovulatórios distintos, sendo que o grupo denominado folículo e CL grande (FG – CLG) teve maiores concentrações plasmáticas de E2 no proestro e de P4 no diestro subsequente à ovulação, enquanto o grupo folículo e CL pequeno (FP – CLP) apresentou menores concentrações plasmáticas de E2 e P4. O modelo experimental proposto foi capaz de modular a expressão gênica no útero e foi usado na presente dissertação. Para o estudo da expressão gênica no trato reprodutivo, foram escolhidos sete genes de vias metabólicas distintas e sabidamente expressos no útero de fêmeas bovinas.

Sugere-se que a P4 tem um importante papel no desenvolvimento embrionário precoce, mais precisamente dentro da primeira semana de gestação. De fato, Demetrio et al. (2007) demonstrou a existência de uma associação positiva linear entre a probabilidade de sucesso gestacional e a concentração plasmática de P4 no dia sete pós-estro em vacas Holandesas em lactação submetidas à IATF. As alterações nas concentrações séricas de P4 no início da fase luteal são capazes de provocar variações temporais na composição e quantidade de transcritos no endométrio de vacas (FORDE et al., 2011; MESQUITA et al., 2014). Em condições de baixa P4, tais mudanças podem resultar em um ambiente uterino de qualidade inferior e, conseqüentemente, com reduzida capacidade de suporte para elongação do concepto. De fato, usando dispositivo de liberação de P4 intravaginal no dia três após IA, Carter et al. (2008) mostrou um aumento do alongamento do concepto no dia 13. Em um experimento realizado por Ferguson, Kesler e Godke (2012), embriões foram cultivados *in vitro* com a presença ou ausência de P4. No dia 7 do cultivo *in vitro* foi verificado maior número de embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocistos quando cultivados na presença da P4. Além disso, o diâmetro dos blastocistos foi maior que o do grupo controle. Porém, Clemente et al. (2009) demonstraram que embriões produzidos *in vitro* com a presença da P4 e transferidos no dia 7 não demonstraram aumento do alongamento medido no

dia 14. Porém, a transferência de embriões produzidos *in vitro* em receptoras suplementadas com P4 no período pré-transferência resultou num aumento de quatro vezes no comprimento do concepto no dia 14 (CLEMENTE et al., 2009).

Uma das questões fundamentais para o entendimento da receptividade uterina é como o ambiente uterino é modulado para o recebimento e desenvolvimento do embrião (SALILEW-WONDIM et al., 2012). O oócito oriundo do folículo dominante será fecundado na tuba uterina e entrará no corno ipsolateral ao CL por volta do dia quatro após a estro (SENGER, 2003). Neste momento, o útero deve estar pronto para receber o embrião. Os embriões crescem e se diferenciam a partir de uma forma microscópica esférica denominada mórula até a uma forma filamentosa totalmente alongada que se estende ao comprimento de ambos os cornos uterinos (MESQUITA et al., 2012). Até o início do processo de alongação o embrião encontra-se na região anterior do corno ipsolateral ao CL. O processo de alongação tem início aproximadamente no dia 12 e fim por volta do dia 18 após a fertilização (PEIPPO; MACHATY; PETER, 2011). Bauersachs et al. (2005) em um estudo de análise global por transcriptoma, demonstrou que diferenças regionais ocorrem no endométrio de fêmeas bovinas nas fases de estro e diestro. Porém essas diferenças não foram relacionadas a um modelo de fertilidade e ou receptividade em vacas Nelore. A **hipótese** sustentada nessa dissertação é que **ambientes endócrinos periovulatórios distintos modulam diferentemente a abundância de transcritos no endométrio de diferentes regiões do útero em vacas Nelore no início do diestro.**

É amplamente sabido que embriões transferidos para o corno ipsolateral ao ovário contendo o CL tem mais chances de sobrevivência do que os transferidos no corno contralateral (CHRISTIE; NEWCOMB; ROWSON, 1979). Porém, Reichenbach et al. (1992) demonstrou que as taxas de prenhez são similares em transferências de um ou dois embriões no corno ipsolateral ao CL e transferência de um embrião em cada corno uterino. Estudos envolvendo a distribuição espacial de moléculas ao longo do trato reprodutivos de fêmeas já foram realizados em vacas (POPE; MAURER; STORMSHAK, 1982; BAUERSACHS et al., 2005; DEEVER et al., 2013), ovelhas (MEIKLE et al., 1997, 2001), ratos (HICKEY; FAHEY; WIRA, 2012), camundongos (LIN et al., 2012; YANG et al., 2013), suínos (BUHI et al., 2003), jacarés (BUHI et al., 1999) entre outros. Trabalhos com oviduto ratificaram que a proximidade com o folículo dominante ou com o CL funcional altera a expressão gênica (BAUERSACHS et al., 2003), proteica (BINELLI et al., 1999) e concentrações hormonais desse tecido (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 1998), na espécie bovina. O primeiro

objetivo é comparar a abundância dos transcritos para os genes receptor de P4 (PGR), receptor de E2 (ESR2), receptor de ocitocina (OXTR), carreador de soluto família 2, membro 1 (SLC2A1), aldo-ceto redutase família 1, membro C4 (AKR1C4), inibidor da serina peptidase, subtipo A, membro 14 (SERPINA14), lipoproteína lipase (LPL) entre a) entre os cornos ipsolateral e contralateral ao CL b) diferentes regiões do corno ipsolateral ao CL, nas regiões anterior, média e posterior.

Para determinar a composição do ambiente uterino o primeiro passo é a amostragem. Amostragem do trato reprodutivo de vacas em experimentos *in vivo* pode prejudicar o desempenho reprodutivo (MESQUITA et al., 2012). Diversas técnicas para amostragem do ambiente uterino como lavagem e biópsia uterina tem sido utilizadas. Biópsia uterina é utilizada há muitos anos como ferramenta para diagnóstico clínico (MILLER, 1951; MANSPEAKER; HAALAND, 1983) e propósitos de pesquisa (MORAITIS et al., 2004; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2004). Porém, muitos estudos mostram que afetam negativamente variáveis reprodutiva em vacas leiteiras (BONNETT et al., 1993; LeBLANC et al., 2002; SHELDON et al., 2006) e vacas de corte (PUGLIESI et al., 2014, no prelo)¹. Em adição a isso, a manipulação do útero durante o procedimento de biópsia aumenta o fluxo sanguíneo (PUGLIESI et al., 2014, no prelo)², o que pode contribuir com danos teciduais e inflamação.

Um modo indireto para acessar a composição do ambiente uterino e sua relação com ambientes endócrinos periovulatório distintos foi testada nessa dissertação. A vagina é um órgão do trato reprodutivo de fácil acesso e sua amostragem não afeta diretamente a fisiologia uterina. Estudos com vagina tem sido realizados com cadelas durante o ciclo estral (VERMEIRSCH; VAN DEN BROECK; SIMOENS, 2002), camundongas prenhes (TAKEUCHI et al., 2013) e ciclando (HICKEY; FAHEY; WIRA, 2012), ratas (OHTA; SATO; IGUCHI, 1993), entre outras espécies. Em bovinos, Sagzös et al. (2010) detectou a

^{1,2} PUGLIESI G.; SCOLARI, S. C.; MESQUITA, F. S.; MATURANA FILHO, M.; ARAÚJO, E. R.; CARDOSO, D. S.; SALES, J. N.; MARTIN, I.; Sá FILHO, M.; BERTAN, C. M.; BINELLI, M. Impact of probing the reproductive tract during early pregnancy on fertility of beef cows. **Reproduction in Domestic Animals**. (No prelo).

presença do receptor de estradiol beta (ESR2) e do receptor B de P4, na cérvix e na vagina nas fases folicular e luteal. **O estudo da expressão gênica na vagina e sua relação com o E2 e P4 foi o segundo objetivo de estudo nessa dissertação**, pensando em uma alternativa de amostragem do trato reprodutivo. **A segunda hipótese sustentada nessa dissertação é que ambientes endócrinos periovulatórios distintos modulam a abundância de transcritos na vagina em vacas Nelore no início do diestro.** Pensando nisso, amostras de vagina foram coletadas para determinar se ambientes endócrinos periovulatórios distintos modulam a expressão gênica também nesse órgão.

1.1 MODELO HIPOTÉTICO GRÁFICO

Figura 1 - Modelo hipotético gráfico

(Fonte: ARAÚJO, E. R, 2013)

Legenda: Ambientes endócrinos periovulatórios distintos e sua relação com a distribuição de transcritos no trato reprodutivo de vacas Nelore. Distintas concentrações plasmáticas de estradiol (E2) no dia zero (D0; dia da indução da ovulação) e progesterona (P4) no dia sete (D7) modulam a distribuição de transcritos diferentemente em cada região do trato reprodutivo. Região anterior do corno ipsilateral ao corpo lúteo (A). Região média do corno ipsilateral ao corpo lúteo (M). Região posterior do corno ipsilateral ao corpo lúteo (P). Corno contralateral ao corpo lúteo (C). A amostra representativa do corno contralateral ao CL (C) foi composta pelo agrupamento de sub amostras colhidas das regiões anterior, média e posterior daquele corno. Vagina (V). Útero (UT). Cérvix (CX). Vulva (VU).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na presente revisão de literatura serão abordados tópicos relacionados à receptividade uterina ao embrião, fertilidade de fêmeas bovinas, hormônios esteroides sexuais envolvidos com esses processos, genes responsivos aos hormônios ovarianos no endométrio e características anatômicas no útero que afetam seu funcionamento.

2.1 RECEPTIVIDADE UTERINA E SUA RELAÇÃO COM OS HORMÔNIOS ESTEROIDES

Bovinos são animais monovulatórios de ovulação espontânea sendo que a migração intra-uterina é considerada um evento raro (SCALON, 1972; McMILLAN; PETERSON, 1999). O oócito é fecundado no oviduto e permanece nele até o estágio de mórula. Por volta do dia cinco após o estro o embrião entra na região anterior do corno ipsilateral ao CL onde permanece até o início do processo de elongação no dia 12 (CHAVATTE-PALMER; GUILLOMOT, 2007). O embrião alongado irá alcançar o corno contralateral ao CL em torno do dia 18 (PEIPPO; MACHATY; PETER, 2011). O alongamento do conceito não ocorre *in vitro* e também não ocorre *in vivo* na ausência de glândulas uterinas (MAMO et al., 2012). Em vacas, a implantação ocorre em torno do dia 19 após o estro. O trofoblasto anexa ao epitélio caruncular e principalmente a mucosa intercaruncular de forma superficial. Nessas áreas, vilosidades transitórios crescem no trofoblasto e invadem as glândulas uterinas. Este processo garante uma ancoragem do conceito na cavidade uterina e/ou os locais de absorção localizadas das secreções glandulares (CHAVATTE-PALMER; GUILLOMOT, 2007).

Enquanto o conceito passa por alterações morfológicas, o endométrio sofre alterações para estabelecer a receptividade uterina, possibilitando o crescimento conceito, a implantação e o estabelecimento da prenhez (BAUERSACHS; WOLF, 2012). Até o reconhecimento materno da gestação, mudanças no transcriptoma endometrial ocorrem mesmo na ausência do conceito (CLEMENTE et al., 2009; FORDE et al., 2011). No período pré-implantação o

embrião encontra-se flutuante no lúmen uterino e depende do histotrofo para seu desenvolvimento (BAZER et al., 2012). O histotrofo é sintetizado e secretado pelas glândulas endometriais (SPENCER; BAZER, 2004) e é fonte de vitaminas, minerais, enzimas e outra miríade de nutrientes necessários ao embrião em desenvolvimento antes da implantação (MULLEN et al., 2012). Em análise proteômica do histotrofo nos dias sete e 13, proteínas relacionadas ao metabolismo, transporte, desenvolvimento e transdução de sinal foram identificadas (MULLEN et al., 2012).

O reconhecimento materno da prenhez em bovinos ocorre em torno dos dias 16 e 17 e é mediada pelo interferon-tau (IFN- τ) secretado pelo conceito (BAZER; SPENCER; OTT, 1997). Em bovinos, a secreção máxima de IFN- τ pelo conceito, foi observada no dia 17 (BAZER; SPENCER; OTT, 1997). O sucesso gestacional após esse período inicial, depende do IFN- τ , a fim de inibir a produção da prostaglandina F $_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) pelo endométrio (FORDE; LONERGAN, 2012) e por conseguinte, a produção de P4 pelo CL mantém-se. O IFN- τ suprime os receptores de estradiol e o OXTR, mas não o PGR, resultando na prevenção da liberação pulsátil da PGF $_{2\alpha}$ pelo endométrio (SPENCER et al., 1995).

Estudos conseguintes comprovaram mudanças temporais no perfil transcricional do endométrio de bovinos no período peri-ovulatório e sua relação com a P4 (FORDE et al., 2009, 2010, 2011, 2012). Tais alterações levaram à conclusão de que condições de baixa P4 levam a um ambiente uterino sub-ótimo e uma habilidade reduzida de promover o alongamento do conceito (FORDE et al., 2011). Em contraste a suplementação com P4, por meio de um dispositivo liberador de P4, após a ovulação altera a abundância de transcritos no endométrio no período peri-implantação do conceito bovino (FORDE et al., 2009).

O modelo animal proposto por Mesquita et al. (2014) foi capaz de gerar dois grupos distintos com estruturas ovarianas (folículo e CL) e capacidade esteroidogênica diferentes em vacas Nelore. O grupo FG – CLG apresentou maiores concentrações plasmáticas de E2 no proestro e P4 no início do diestro do que o grupo FP – CLP. Os ambientes periovulatórios distintos afetaram a abundância de transcritos no endométrio, de genes responsivos a hormônios esteroides como OXTR, ESR2, LPL, AKR1C4 e PI3 (inibidor da peptidase 3). A expressão de enzimas esteroidogênicas e fatores angiogênicos no CL (e.g. STAR - proteína reguladora aguda esteroidogênica e VEGF - fator de crescimento endotelial vascular) não foram alterados, levando a conclusão que a maior produção de P4 se deve a maior massa luteal. O tamanho do folículo ovariano e concentrações plasmáticas de E2 tem sido

relacionadas à fertilidade em vacas de corte e de leite (PERRY et al., 2005; LOPES et al., 2007; PERRY et al., 2007; MENEGETI et al., 2009; PERES et al., 2009). Além disso, a deficiência de E2 tem sido citada como uma possível causa para a diminuição da fertilidade em vacas leiteiras (WILTBANK et al., 2006). Proestro curto e consequentemente menores concentrações de E2 em vacas de corte acarretam em baixas taxas de prenhez (BRIDGES et al., 2012). Ovelhas induzidas a ovular após uma sequência curta de proestro, tiveram a concentração de E2 pré-ovulatório reduzida. Ademais, o CL foi menor, continha menos células da granulosa, menos células luteínicas maiores e produziu menores quantidades de P4, tanto *in vivo* como *in vitro* (MURDOCH; VAN KURK, 1998).

Em vacas Holandesas, estudos similares compararam o tamanho do POF com concentrações plasmáticas de E2 e P4 (VASCONCELOS et al., 2001; LOPES et al., 2007). Vasconcelos et al. (2001) aspiraram folículos maiores que 4mm nos dias -5 e -6 (D0=dia da indução da ovulação). A técnica de aspiração folicular reduziu o diâmetro dos POFs, gerando CLs de menor volume e menores concentrações de E2 no D0 e P4 no D7, em relação aos animais que não foram aspirados ($P<0.05$). Concentrações maiores de E2 e P4 foram relacionadas a uma maior taxa de prenhez no D28 de animais inseminados (47.6% vs 14.3%). Green et al. (2005) evidenciaram que maiores concentrações plasmáticas de P4 também mudam o ambiente do oviduto e atuam indiretamente no desenvolvimento inicial do embrião. Vacas com embriões em desenvolvimento (D5) avançado ($>$ que 8 células) apresentaram relação positiva com as concentrações plasmáticas de P4 ($P<0.001$) e o peso do CL ($P<0.01$) no mesmo dia (GREEN et al., 2005). Em ruminantes elevadas concentrações de P4 no diestro inicial tem sido associadas ao desenvolvimento satisfatório do conceito (GARRETT et al., 1988; SATTERFIELD; BAZER; SPENCER, 2006), e conceitos com maior capacidade de se alongar (CARTER et al., 2008). A relação positiva da P4 com o desenvolvimento embrionário entretanto é devida a um padrão de expressão gênica do endométrio resultando em alterações na composição do histotrofo (CLEMENTE et al., 2009).

Como visto nessa seção o embrião é suprido pelo histotrofo que é secretado pelas glândulas uterinas, e no diestro inicial se encontra na região anterior do lúmen uterino. Os hormônios esteroides estão relacionados com a fertilidade e capacidade do embrião se alongar indiretamente, porém esse fenômeno não acontece *in vitro*. Protocolos hormonais podem aumentar o tamanho do POF, aumento do E2 e suplementação com P4, assim aumentando a qualidade do conceito e as taxas de concepção. Os hormônios esteroides agem via receptores. A maior ou menor expressão desses receptores permite a regulação de genes que afetam a

manutenção do embrião no lúmen uterino. Alguns genes relevantes serão vistos na seção a seguir.

2.2 GENES RELACIONADOS A RECEPTIVIDADE UTERINA EM BOVINOS

Nesta seção genes pertinentes a fertilidade serão abordados, em especial, genes ligados a regulação dos hormônios esteroides, síntese de PGF2 α , manutenção da prenhez e do conceito, imunorregulação durante a gestação e transportadores de nutrientes para o embrião.

2.2.1 Receptores de E2, P4 e OT

Os efeitos genômicos dos hormônios esteroides, E2 e P4, no endométrio são mediados principalmente através da ligação com seus receptores (ROBINSON et al., 2001; OKUMU et al., 2010). O E2 aumenta a expressão dos seus receptores e também dos receptores de P4, tanto *in vivo* (BOOS et al., 1996, ROBINSON et al., 2001) quanto *in vitro* (XIAO; GOFF, 1999). Altos níveis séricos de P4 diminuem a expressão do seu próprio receptor e dos receptores de E2 no diestro e no início da prenhez (SPENCER; BAZER, 1995; OKUMO et al., 2010). A regulação do OXTR é feita principalmente pelo balanço dos níveis de E2 e P4 (ROBINSON et al., 2001). A perda dos receptores ESR2 e PGR no endométrio é uma condição prévia para a implantação (BAZER; SLAYDEN, 2008).

Okumu et al. (2009) através da suplementação de P4 por inserção de dispositivo intravaginal no dia 3 após o estro (CARTER et al., 2008) obtiveram quatro grupos de novilhas (ciclando controle ou alta P4, prenhe controle ou alta P4). A expressão do PGR no epitélio luminal (LE) nos animais ciclando ou no início da prenhez foi diminuída no grupo alta P4, sendo que essa diminuição da expressão do PGR é um fator chave na expressão de diversos genes no endométrio, o que contribui com o desenvolvimento avançado do conceito de bovinos (GARRET et al., 1988; CARTER et al., 2008).

Os efeitos do E2 e P4 no trato reprodutivo e sobre seus respectivos receptores foi estudado em ovelhas de dois meses de vida, nas regiões anterior e média do útero (MEIKLE

et al., 1997), no oviduto e na cérvix (MEIKLE et al., 2001). Nos dias 0, 1 e 2, E2, P4 ou óleo de milho foram administrados e no D3 todos os animais foram abatidos. O tratamento com E2 aumentou o peso do aparelho reprodutor (oviduto, útero e cérvix), enquanto o tratamento com P4 aumentou apenas o peso do útero (MEIKLE et al., 1997). O grupo tratado com E2 tinham concentrações de E2 no soro, semelhantes a da fase folicular, enquanto que as concentrações de P4 no grupo tratado com P4 foram semelhantes a da fase lútea do ciclo estral de ovelhas. Os tratamentos com E2 e P4 diminuíram as concentrações de PGR nas regiões anterior e média do útero (MEIKLE et al., 1997). Concentrações de ESR2 e PGR foram maiores no grupo não tratado sendo que a região anterior apresentou as maiores concentrações em todos os tratamentos ($P < 0.03$; MEIKLE et al., 2001). O tratamento com E2 aumentou os níveis de ESR2 e PGR em três vezes na cérvix (MEIKLE et al., 2001). Os resultados mostraram efeitos diferenciais dos hormônios esteroides na expressão de receptores de esteroides ao longo do trato reprodutivo de ovelhas.

A expressão do gene OXTR é diferente durante o ciclo estral, sendo que sua maior expressão ocorre no estro e diminui na fase luteal (ROBINSON et al., 2001). Em vacas ovariectomizadas foi detectado mRNA do OXTR no útero, mas PGF2 α não foi liberada no sangue, em resposta ao tratamento com OT após a administração de P4 (LAMMING; MANN, 1995). Ledger, Meier e Peterson (2011) concluíram que a capacidade das vacas em secretar PGF2 α em resposta à OT tem sido associada com o sucesso gestacional. Com intenção de gerar dois grupos, vacas foram desafiadas com OT e separadas de acordo com o pico da PGF2 α (pico alto = animais superiores; pico baixo = animais inferiores). Os animais foram abatidos 10 dias após a TE (D17) e divididos de acordo com o tamanho do conceito. A expressão de OXTR foi maior no endométrio dos animais superiores com maior conceito ($P < 0.05$). Além disso o corno não gravídico teve a expressão de OXTR 2.5 vezes maior do que no corno gravídico.

2.2.2 Genes relacionados à manutenção do embrião

Nesta subseção serão revisados os seguintes genes: AKR1C4, LPL, SLC2A1 e SERPINA14. O gene AKR1C4 codifica uma enzima que tem como principal função a metabolização das prostaglandinas (ULBRICH et al., 2009b). O gene LPL codifica uma enzima envolvida no metabolismo e transporte de lipídeos no útero bovino (FERGUSON;

LEESE, 2006). SLC2A1 é uma proteína carreadora de glicose (SHIMIZU et al., 2010), e por fim, SERPINA14 é uma proteína cuja principal função é regular o sistema imune materno durante a prenhez (ULBRICH et al., 2009a).

A enzima AKR1C4 converte prostaglandina H2 (PGH2) em PGF2 α (GAUVREAU et al., 2010). A PGF2 α em baixas concentrações estimula a vascularização do endométrio, a manutenção do blastocisto e a implantação do embrião (CHARPIGNY et al., 1997; REESE et al., 1999; ULBRICH et al., 2009b). Porém, o excesso de PGF2 α pode ser tóxico para o conceito, afetando diretamente seu desenvolvimento e qualidade, além da possibilidade de desencadear uma luteólise prematura (SEALS et al., 1998; SCENNA et al., 2004). Em humanos, porcos e murinos já foi relatado o papel da AKR1C4 na metabolização da P4 (PENNING et al., 2000; VELIÇA et al., 2009; SEO et al., 2011; RIZNER; PENNING, 2014).

O gene LPL codifica uma enzima envolvida no metabolismo e transporte de lipídeos no útero de bovinos (MEAD; IRVINE; RAMJI, 2002). Estas lipoproteínas evitam a perda de lipídeos na circulação e também estão envolvidas no fornecimento de lipídeos, tais como triacilglicerol (TAG), para os tecidos alvo. Utilização de TAG até ao estágio de blastocisto de bovinos tem sido documentada *in vitro* e *in vivo* (FERGUSON; LEESE, 2006). Localização de LPL no LE e epitélio glandular (GE) nos dias 5 e 7 após o estro, sugere que TAG no lúmen uterino é fonte de energia para o embrião, durante o desenvolvimento embrionário precoce (FORDE et al., 2010). A P4 aumenta a expressão de LPL no D7 e diminui quando o embrião começa a alongar (D13; FORDE et al., 2011).

O gene SLC2A1 pertence a superfamília SLC2A que engloba proteínas responsáveis pelo transporte facilitado da glicose e outros açúcares, através da membrana plasmática, por gradiente de difusão (WOOD; TRAYHURN, 2003). A proteína codificada pelo gene SLC2A1 tem como função transportar glicose e sua expressão no endométrio está associada as concentrações dos hormônios esteroides (FROLOVA; MOLEY, 2011). Dentre os transcritos cuja expressão é alterada por diferentes concentrações de P4 no período peri-ovulatório encontram-se alguns que codificam proteínas carreadoras de solutos, do qual o embrião depende para sua manutenção, alongamento e desenvolvimento (FORDE et al., 2010). No endométrio de vacas ovariectomizadas, a expressão de mRNA do gene SLC2A1 aumentou em resposta a administração de P4 (SHIMIZU et al., 2010). Porém, sua expressão não foi alterada pela suplementação com P4 seguida de E2 ou somente com suplementação de E2 (SHIMIZU et al., 2010). Suplementação com P4 em ovelhas prenhes, a aumentou a

expressão de SLC2A1 no endométrio no D9 e D12 (SATTERFIELD et al., 2010). No D9, a suplementação com P4 também aumentou a concentração de glicose nos lavados uterinos. Para confirmar o papel da P4 na expressão desses genes, um inibidor dos receptores de P4 foi administrado juntamente com a P4. Tal tratamento anulou o efeito da suplementação com P4 na expressão da SLC2A1 (SATTERFIELD et al., 2010).

O gene SERPINA14 recentemente foi adicionado a superfamília serpin (inibidores da proteinase da serina; PADUA; HANSEN, 2010). Porém, até poucos anos atrás era conhecida como UTMP (proteína do leite uterino), descrita como a proteína mais abundante do útero de ruminantes durante a prenhez (SEGERSON; BAZER, 1989). Sua aparente falta de atividade inibidora para proteases da serina sugerem que estas proteínas evoluíram a partir de uma função diferente da atividade anti-proteinase tipicamente encontrado na maioria dos membros dessa superfamília (PADUA; HANSEN, 2010). No útero de ruminantes sua principal função é a regulação do sistema imunológico, prevenindo a rejeição do feto pela mãe (ULBRICH et al., 2009a; PADUA; HANSEN, 2010; LEDGARD; MEIER; PETERSON, 2011). O gene SERPINA14 codifica uma proteína que age inibindo a proliferação de linfócitos, regulando a função das células natural *killer* e atua como carreadora de imunoglobulinas e outras proteínas (ULBRICH et al., 2009a; PADUA; HANSEN, 2010). O balanço do pico do E2 seguido pelo aumento da P4 (estro/diestro) é o principal fator regulador da expressão SERPINA14 no endométrio bovino (SPENCER et al., 1999; ULBRICH et al., 2009a). Além disso, a SERPINA14 tem sido descrito como um bom marcador para vacas de alta fertilidade com conceptos mais alongados e para ovelhas com endométrios de alta capacidade secretória (SPENCER et al., 2004; KHATIB et al., 2009; LEDGARD; MEIER; PETERSON, 2011).

Nesta seção alguns genes importantes para a manutenção da prenhez, sobrevivência do conceito e regulação hormonal foram relatados. Todavia, para que o endométrio esteja receptivo ao conceito uns precisam ser mais expressos, i.e. *upregulated*, ou outros menos expressos, i.e. *downregulated*. A regulação da abundância desses transcritos se dá principalmente pelos hormônios ovarianos. Na seção seguinte a anatomia vascular e diferenças espaciais serão revisadas. Além disso, será revisado se há diferença entre a regulação sistêmica e/ou local dos hormônios esteroides.

2.3 ANATOMIA VASCULAR E DIFERENÇAS ESPACIAIS NO TRATO REPRODUTIVO DE FÊMEAS

Nesta seção será revisado a anatomia vascular da região útero-ovárica, diferenças espaciais nas concentrações hormonais, de transcritos e proteínas já descritas no trato reprodutivo. O útero de bovinos é composto por dois cornos uterinos, um corpo e uma cérvix. A morfologia uterina se modifica durante o ciclo estral e é regulada principalmente pelos hormônios ovarianos. Vários estudos mostram que há diferença nos cornos uterinos durante o ciclo estral, provavelmente regulados pelas diferenças hormonais e sua relação com o lado do CL (GINTHER et al., 1974; WEEMS et al., 1988; EINER-JENSEN; HUNTER, 2005).

A artéria ovariana irriga não somente o ovário como também o oviduto e a região anterior dos cornos uterinos e portanto, qualquer substância transferida à partir da veia útero-ovariana irá atingir todos estes tecidos (LAMOND; DROST, 1974; WIJAYAGUNAWARDANE et al., 1996; EINER-JENSEN; HUNTER, 2005). Cerca de um quarto da distância a partir da sua origem, a artéria ovariana divide-se em dois ou três ramos, sendo que um dos ramos dá origem à artéria tubária e uterina (GINTHER, 1976). Estes ramos estão entrelaçados pelos muitos ramos tortuosos da artéria ovariana. Anastomoses de vasos sanguíneos é encontrada no ligamento largo do útero e liga o sistema arterial dos cornos uterino com o sistema arterial do ovários (LAMOND; DROST, 1974). As artérias ovarianas e uterinas adjacentes e opostas ao ovário contendo o CL possuem diferenças anatômicas e fisiológicas (GINTHER, 1974; GINTHER, 1976), sendo que no lado ipsolateral ao CL as anastomoses entre ramificações da artéria uterina e ovariana são significativamente mais proeminentes (LAMOND; DROST, 1974; GINTHER, 1976). O ramo uterino da artéria ovariana é significativamente maior em diâmetro no lado ipsolateral ao ovário contendo o CL (média de 1.5mm) do que no lado oposto (média de 1.1mm). Para tanto, as anastomoses devem ser bastante dinâmicas, uma vez que, aparentemente, há mudanças de diâmetro quanto ao lado da ovulação (GINTHER; DEL CAMPO, 1974). No ponto de vista fisiológico essa proeminência pode ser devida a preparação do oviduto e corno uterino ipsolateral ao CL para a prenhez ou para contribuir com as necessidades sanguíneas do CL altamente vascularizado (LAMOND; DROST, 1974; GINTHER, 1976). Entende-se que as substâncias produzidas no ovário, liberadas pelo o fluxo venoso ovariano e transferidas para o sangue arterial ovariano atingirá não só o ovário, mas também os ovidutos e, possivelmente, a porção anterior do útero (McCRAKEN; SCHRAMM; EINER-JENSEN, 1984; EINER-JENSEN; HUNTER, 2005).

A partir dessas descobertas foram iniciadas pesquisas afim de esclarecer se ocorre uma distribuição local de P4 e outros hormônios. Amostras de sangue foram coletadas na ramificação da veia uterina que drena a porção cranial de cada corno e na veia jugular em vacas de leite em diestro (D11), para dosagem de P4. A concentração de P4 da veia que drena a região anterior do corno ipsolateral ao ovário contendo o CL foi 57% maior em relação à mesma veia do corno contralateral e 74% maior em relação à jugular (WEEMS et al., 1988). Após o abate, os cornos uterinos foram dissecados e subdivididos em região anterior e posterior, além disso, ramificações das artérias uterinas de diferentes regiões do corno uterino e artérias ovarianas adjacentes e opostas ao ovário contendo o CL foram coletadas. A concentração de P4 na região anterior do corno uterino e nas artérias uterina e ovariana adjacentes ao ovário contendo o CL são mais altas do que os níveis encontrados no lado contralateral ao CL (WEEMS et al., 1988).

Esses mesmos autores, após colherem sangue da primeira ramificação venosa dos cornos uterinos e da jugular, realizaram uma ligadura do oviduto e após 48 horas colheram sangue novamente. Verificou-se que possivelmente há uma distribuição direta da P4 para a porção anterior do corno uterino ipsolateral ao CL, através da veia tubária, uma vez que nesse local o nível de P4 foi maior do que na jugular e no corno contralateral ao ovário contendo o CL (75% e 88%, respectivamente) e diminuindo em 70% quando se realizou a ligadura do oviduto (WEEMS et al., 1988). Weems et al. (1989) também conduziram o mesmo experimento em ovelhas sendo que foi encontrado maiores concentrações de P4 na região anterior em comparação a região média e posterior do corno ipsolateral ao CL, e em relação a qualquer região do corno contralateral, tanto no D4 como no D9 após o estro. As concentrações de P4 plasmática também foram mais altas na primeira ramificação venosa da região anterior do corno uterino ipsolateral ao CL do que na última ramificação da região posterior do mesmo corno, no corno contralateral e ainda da jugular. Também foi realizada a ligadura e secção da veia tubária nas ovelhas e resultando nos mesmos encontrados em vacas de leite, e induzindo a acreditar que há transferência de P4 pela veia tubária em ruminantes (WEEMS et al., 1988, 1989).

Cerbito et al. (1994) comparou a concentração de P4 em diferentes partes do útero de vacas Holandesas divididas em dois grupos, alta P4 ($P4 > 5\mu\text{g}/\text{mg}$) e baixa P4 ($P4 < 2.6\mu\text{g}/\text{mg}$) medidas no CL. Amostras de endométrio foram excisadas das regiões anterior, medial e posterior de ambos os cornos e do corpo do útero. Efeito significativo ($P < 0.05$) foi observado entre as porções estudadas, sendo que todas as regiões do corno ipsolateral ao CL tinham

maiores concentrações de P4 que qualquer região do corno contralateral e do corpo do útero. Porém essa diferença foi relatada apenas no grupo com alta P4. Em outro estudo revelou-se que na presença de um CL ativo em ambos os ovários, as concentrações de P4, OT e OXTR não são diferentes em distintas partes do útero de vacas (CERBITO et al., 1996).

Amostras de tecido dos cornos uterinos (divididos em região anterior e posterior), ligamento largo (mesossalpinge e mesométrio) e da artéria uterina (proximal e distal ao ovário) de 10 vacas ovulando unilateralmente, 12-15 dias após o estro, foram examinadas para diferenças na concentração de P4 (POPE; MAUREK; STORMSHAK, 1982). Os tecidos ipsolaterais e mais próximos ao ovário (mesossalpinge, ramos da artéria uterina, corno uterino anterior) contendo o CL continham maiores quantidade de P4 do que os tecidos mais distais do lado ipsolateral (mesométrio, artéria uterina, corno uterino posterior) e todos os tecidos do lado contralateral. Em tecidos do lado ipsolateral ao CL, um gradiente de P4 foi visualizado, no entanto, tal gradiente nas concentrações de P4 foram evidentes em todo os tecidos no lado contralateral do trato reprodutivo (POPE; MAUREK; STORMSHAK, 1982). Concentração local de P4 nos tecidos adjacentes ao ovário contendo o CL através de uma troca vascular em contracorrente de hormônios esteroides (WALSH; YUTRZENKA; DAVIS; 1979) podem envolver o sistema linfático (POPE; MAUREK; STORMSHAK, 1982; STAPLES; FLEET; HEAP, 1982; CERBITO et al., 1994). Os vasos linfáticos que drenam o ovário estão entrelaçados com o pedículo vascular útero-ovariano sendo que o CL ativo tem um fluxo muito elevado de linfa durante a fase luteal e durante a prenhez (STAPLES; FLEET; HEAP, 1982). Os vasos linfáticos que drenam o útero e os ovários foram localizados na região mesometrial e ao longo do pedículo útero-ovariana (STAPLES; FLEET; HEAP, 1982). Linfa aferente coletada após canulação crônica dos vasos linfáticos útero-ovariano ipsolateral ao ovário contendo o CL continham uma concentração de P4 média de 10 a 1000 vezes maior do que as contrações plasmáticas, colhido pela veia jugular entre os 15 e 45 dias de gestação ($P < 0.0001$). A concentração de P4 na linfa uterina coletada de após ovariectomia do ovário ipsolateral e não diferiu significativamente do que a encontrada no plasma (STAPLES; FLEET; HEAP, 1982).

Transferência por contracorrente no pedículo vascular do ovário eleva a concentração de hormônios esteroides no sangue durante o ciclo estral de porcas (STEFAFICZYK-KRZYMOWSKA et al., 1994, 1997, 1998). Stefaficzky-Krzymowska et al. (1998) mediram a concentração de hormônios esteroides ovarianos (P4, E2, estrona, androstenediona e testosterona) em 40 porcas nos dias 12, 18, 25 ou 35 da prenhez. As concentrações médias

dos hormônios estudados nos ramos da artéria uterina proximal e distal ao ovário foram significativamente maiores do que na veia jugular ($P < 0.001$) em 18 para 69% e de 7 para 31%, respectivamente. As concentrações hormonais nas regiões proximal e distal do ramo ovariano da artéria uterina também foram significativamente diferentes ($P < 0.001$), sendo que esses achados não diferiram ao longo da prenhez. Os autores concluíram que, durante o reconhecimento materno da prenhez, a manutenção do CL, a implantação do embrião e do alongamento da placenta no oviduto e útero são resultado da elevada concentração local dos hormônios esteroides em comparação ao sangue periférico.

Wijayagunawardane et al. (1998) conduziram um experimento em vacas onde concentrações de P4, OT, E2, prostaglandina E2 (PGE2), PGF2 α e endotelina 1 (EDN1) foram medidas nas três regiões do oviduto (infundíbulo, ampola e istmo) adjacente e oposto ao CL. Não houve diferença significativa em nenhuma concentração hormonal entre as três partes do oviduto porém concentrações mais elevadas de P4 no diestro foi observada no oviduto ipsolateral ao CL. A maior concentração de E2 foi observada durante a fase folicular do oviduto ipsolateral ao folículo dominante. O oviduto ipsolateral ao folículo dominante durante a fase folicular e ipsolateral ao local da ovulação na fase luteal apresentaram maiores níveis de PGE2, PGF2 α e EDN1 do que aqueles no lado contralateral. Os resultados mostram evidências da distribuição local de esteroides ovarianos no trato reprodutivo em porcas (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 1996) assim como visto para vacas (WEEMS et al., 1988) e ovelhas (WEEMS et al., 1989).

Como descrito acima, concentrações hormonais no sangue, linfa e tecido são diferentes em regiões distitas e dependem da proximidade do local com o ovário contendo folículos ou CL. Porém, qual a ação desses efeitos na transcrição e tradução nas regiões do trato reprodutivo de fêmeas ainda precisa ser melhor elucidado. Assim como relatado para concentrações hormonais no útero, diferentes ambientes endócrinos (folículo dominante persistente ou novo) também são capazes de alterar o padrão de síntese e secreção de proteínas nas regiões do oviduto (infundíbulo, istmo e ampola) e quando comparado o lado do mesmo (oviduto ipso ou contralateral ao folículo dominante) em vacas nos dias 18 e 19 após o estro (BINELLI et al., 1999). Em um estudo similar com porcas, três proteínas relacionadas à fertilidade e desenvolvimento do embrião foram identificadas (componente do complemento C3b, o pró-peptídeo C-terminal alfa-1-procolágeno e cadeia pesada da região variável da imunoglobulina A) e localizadas no oviduto por eletroforese e fluografia. Os ovidutos foram coletados durante o ciclo estral e prenhez inicial e divididos em infundíbulo, ampola e istmo,

sendo que houve maior marcação no infundíbulo durante o estro para as três proteínas (BUHI et al., 2003). O mesmo grupo de pesquisadores demonstraram que níveis de proteína e mRNA da TIMP1 (inibidor tecidual das metaloproteinases) é maior no istmo do que nas outras regiões do oviduto em porcas (BUHI et al., 1997). Em um estudo global de transcritos foi demonstrado níveis diferenciais na transcrição do oviduto ipsolateral e contralateral ao CL no dia 3.5 após o estro em vacas (BAUERSACHS et al., 2003). Foram identificadas diferenças de 1.4 a 4.6 vezes na expressão gênica de diferentes vias, entre os lados ipso e contralateral do oviduto por 35 genes. A maioria dos genes (n=27) foram expressos a um nível superior no oviduto ipsolateral, mas para outros (n=8), a abundância de mRNA foi maior no oviduto contralateral. Os genes regulados ou seus produtos incluem uma variedade de classes funcionais, tais como as proteínas da superfície celular, proteínas de interação celular, membros de vias de transdução de sinal, proteínas imuno-relacionadas e enzimas (BAUERSACHS et al., 2003).

A abundância global de transcritos ao longo dos cornos uterinos da porção cranial ao corpo do útero foi investigado nos lados ipsolateral e contralateral nas fases de estro e diestro do ciclo estral de vacas (BAUERSACHS et al., 2005). A expressão da maioria dos genes foi maior na região anterior e uma menor expressão no corpo, além que, a expressão da maioria dos genes foi muito semelhante entre os cornos uterinos. A expressão da SERPINA14 foi maior no estro em relação ao diestro e maior na região anterior de ambos os cornos uterinos (BAUERSACHS et al., 2005). Dois estudos em endométrio bovino retirado dos dois cornos uterinos e posteriormente cultivado *in vitro* com (WILLIAMS et al., 1992) ou sem (MALAYER et al., 1988) a presença da P4 indicaram que há diferenças de expressão entre os dois cornos uterinos.

Estudos envolvendo a distribuição espacial de moléculas ao longo do trato reprodutivos de fêmeas já foram realizados em vacas (POPE; MAURER; STORMSHAK, 1982; BAUERSACHS et al., 2005; DEAVER et al., 2013), ovelhas (MEIKLE et al., 1997, 2001), ratas (HICKEY; FAHEY; WIRA, 2012), camundongos (LIN et al., 2012; YANG et al., 2013), jacarés (BUHI et al., 1999), entre outros, principalmente ao longo do ciclo estral mas não relacionados a protocolos hormonais desenvolvidos para aumentar a fertilidade. Além disso, é pouco estudado a relação dos hormônios esteroides com a vagina. A vagina fornece uma barreira protetora do trato genital superior (ZHAO et al., 1999). Ademais, é um órgão hormônio-dependente sendo que o epitélio vaginal é alvo da ação dos hormônios esteroides por meio dos seus respectivos receptores (RE; BADINO; NOVELLI, 1995;

WANG; ERIKSSON; SAHLIN 2000; VERMEIRSCH; VAN DEN BROECK; SIMOENS, 2002; De BRITO et al., 2006). Níveis séricos de E2 são positivamente correlacionados com a expressão de receptores de E2 e níveis de P4 sérica são negativamente correlacionados à expressão de receptores de P4 ao longo do ciclo estral em ovinos (ZHAO et al., 1999), cães (VERMEIRSCH; VAN DEN BROECK; SIMOENS, 2002), ratos e camundongos (OHTA; SATO; IGUCHI, 1993), no colo do útero e da vagina.

Sagsöz et al. (2010) demonstraram por imonuhistoquímica a presença dos receptores de E2 alfa (ESR1) e receptor de P4 isoforma B (PR-B) na cérvix e vagina de bovinos. A coloração nuclear para ESR1 e PGR foi observada nas células epiteliais superficiais, nas células do estroma e nas células musculares lisas. Na cérvix, imunorreatividade ao ESR1 foi mais intensa no epitélio e células do músculo liso durante a fase folicular e nas células epiteliais durante a fase lútea ($P < 0.05$). Imunorreatividade ao PR-B foi mais intensa no epitélio e células musculares lisas do que nas células do estroma superficial e profunda, durante as fases folicular e lútea ($P < 0.05$). Na vagina, imunorreatividades ao ESR1 e PR-B foram mais intensas nas células epiteliais do que nas células do tecido conjuntivo e células musculares lisas, durante as fases folicular e lútea ($P < 0.05$). Estes resultados indicam que a frequência e intensidade de ESR1 e PR-B na cérvix e na vagina de bovinos varia de acordo com os tipos de células cervicais e vaginais e as fases do ciclo sexual (SAGSÖZ et al., 2010).

Em resumo, diferenças na morfologia do trato reprodutivo e expressão de moléculas são reguladas pelos hormônios esteroides. Agora que entendemos as bases anatômicas e diferenças espaciais de hormônios, proteínas e mRNA ao longo do trato reprodutivo iremos revisar as implicações dessas diferenças na próxima seção.

2.4 LOCAL DA TRANSFERÊNCIA DO EMBRIÃO E SUA RELAÇÃO COM A PRENHEZ

Nessa seção será visto que as diferenças no trato reprodutivo de fêmeas possuem relação com o desenvolvimento embrionário e manutenção da prenhez. Nos parece natural que haja expressão gênica diferente ao longo do útero mas qual o resultado funcional disso será abordado aqui.

Transferência de embrião em bovinos é realizada à quatro décadas (HASLER, 2012). No final da década de 1960 estudos com o intuito de aprimorar a técnica e determinar o local ideal para se depositar o embrião no corno uterino iniciaram-se em diferentes espécies (MOOR; ROWSON, 1966; SREENAN; BEEHAN, 1976; NEWCOMB; CHRISTIE; ROWSON, 1980; WALLENHORST; HOLTZ, 1999). Como visto na seção anterior, níveis de P4 na região anterior do corno uterino ipsolateral ao CL são maiores do que em outras regiões do mesmo corno e do corno contralateral ao CL e portanto uma justificativa para as melhores taxas de prenhez nesse corno.

A relação entre o local do embrião com o CL foi investigado através da transferência de embriões em cornos isolados do útero de 115 ovelhas (MOOR; ROWSON, 1966). No primeiro experimento os embriões foram transferidos em ovelhas com úteros intactos que mostraram ser capazes de manter o CL, independentemente de terem sido transferidos para o corno uterino ipsolateral ou contralateral ao CL. Os embriões transferidos em ovelhas com um corno uterino isolado cirurgicamente do restante do útero mantiveram a função lútea só no ovário adjacente ao corno gravídico, enquanto que os embriões transferidos para o corno contralateral ao CL isolado não tiveram nenhum efeito sobre o tempo de vida do CL. Os embriões transferidos no corno isolado de ovelhas receptoras que tinham CL em ambos os ovários confirmou a existência de uma relação unilateral local entre o embrião e o CL, uma vez que apenas o CL adjacente ao corno gravídico foi mantido. Estes resultados demonstram que o embrião supera o efeito luteolítico do útero de um modo local. Os autores afirmaram que o tempo de vida do CL na ovelha com regiões do útero ligadas e isoladas do restante cirurgicamente é principalmente regulada pela posição relativa do embrião com o ovário contendo o CL (MOOR; ROWSON, 1966). Em bovinos resultados semelhantes foram encontrados por Sreenan e Beehan (1976). Os autores transferiram um embrião em cada corno uterino por transferência cirúrgica, ou na região anterior ou na região posterior de cada corno. Os animais foram abatidos 30 dias após o estro, sendo que não foi verificada diferença nas taxas de prenhez em relação ao local da transferência dentro do útero. Porém, em um estudo anterior do mesmo grupo, diferença significativa ($P < 0.01$) foi relatada nas taxas de prenhez entre os cornos ipsolateral (61%) e contralateral (39%) ao CL quando transferido um embrião por TE cirúrgica (SREENAN; BEEHAN; MULVEHILL, 1975). Estes dados indicam que um embrião no corno ipsolateral ao CL é suficiente para manter a gestação.

Em bovinos, TEs realizadas no corno ipsolateral ao CL resultou em uma tendência no aumento das taxas de prenhez em relação às realizadas no corno contralateral ao CL (54% vs

39%; TERVIT; HAVIK; SMITH, 1977). Em um estudo com vacas tratadas com P4 por 10 dias (D13-23) demonstrou-se que a sobrevivência embrionária tem um declínio no corno contralateral, em TEs cirúrgica, entre os dias 24-26 ao dia 42 (CHRISTIE; NEWCOMB; ROWSON, 1979). A taxa de prenhez foi verificada de duas formas, abatendo os animais nos dias 24-26 ou por palpação transretal no D42. Houve uma queda nas taxas de prenhez das novilhas não tratadas com P4 abatidas entre os dias 24-26 em relação a novilhas não abatidas ($P=0.085$). A taxa de prenhez não foi afetada pelo tratamento de P4 por 10 dias (D13-23) nos grupos abatidos e não abatidos (CHRISTIE; NEWCOMB; ROWSON, 1979). A menor taxa de sobrevivência no corno contralateral ao CL foi atribuída à sinais luteotróficos enviados pelo embrião que, quando depositado no corno contralateral, têm que migrar pelo útero até chegar a região anterior do corno ipsolateral ao CL (BRAND; AKABWAI, 1978). Apesar de ser evidente que o corno uterino ipsolateral ao CL é o lado ideal para a inovulação, há controvérsias em relação ao local adequado em que o conceito deve ser depositado dentro desse corno. A TE é realizada preferencialmente sete dias após o estro (HASLER, 2012). Neste período o embrião estará na região anterior do corno ipsolateral, portanto o melhor local para à inovulação. Porém, literatura referente a região em que o embrião foi transferido nos cornos uterinos é mais escassa (HASLER, 2012).

Beal, Hinshaw e Whitman (1998) obtiveram maiores taxas de prenhez em bovinos ($P<0.01$) quando os embriões foram depositados na região anterior (65.9%) do corno uterino do que na região posterior (29.6%), independentemente da qualidade do embrião. Em outro trabalho, com o objetivo de minimizar os efeitos causados pela manipulação dos cornos no momento da transferência, avaliou-se a influência do local de deposição do embrião no corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo. No entanto, não foi constatada diferença estatística ($P>0.05$) quando os embriões foram depositados na região anterior (50%, 123/247) ou na região medial (43%, 29/68; MCNAUGHTAN et al., 2004). Embriões individuais foram bilateralmente transferidos no D7 para as regiões anterior ou posterior do corno uterino ipsolateral e para as regiões anterior ou posterior do corno contralateral ao CL. A taxa de sobrevivência fetal ($P<0.05$) foi maior quando um embrião foi transferido para a região anterior de ambos os lados (NEWCOMB; CHRISTIE; ROWSON, 1980). Um grupo de pesquisadores transferiram uma média de 17.3 embriões ($n=15$ a 20) em porcas nas regiões anterior, posterior e no corpo uterino. As porcas foram abatidas entre D28-34 após a transferência. A taxa de gestação foi baixa quando os embriões foram depositados no corpo uterino (12%), em comparação com a região anterior (88%) ou a região posterior do corno

uterino (81%; $P < 0,01$; WALLENHORST; HOLTZ, 1999).

É importante ressaltar que as taxas de sucesso na TE estão relacionadas com a habilidade do operador (HASLER, 2012) sendo que se realizada na região anterior do corno uterino há necessidade do técnico ter habilidade para manipular corretamente o corno. Além de outras variáveis que afetam as taxas de prenhez, como a probabilidade de inoculação de bactérias e outros microorganismos, o tempo para transpor a cérvix e possibilidade de ferir o útero (BRAND; AKABWAI, 1978).

3 DIFFERENT PERIOVULATORY ENDOCRINE MILIEUS MODULATE SPATIAL DISTRIBUTION OF TRANSCRIPTS IN THE REPRODUCTIVE TRACT OF BEEF COWS

3.1 RATIONALE

The coordinated release of estradiol (E2) and progesterone (P4) during proestrus and diestrus, respectively, has been associated to endometrial receptivity and pregnancy outcome. In the present study, reproductive management strategies were used to generate distinctly different periovulatory endocrine milieus. Specifically, a group of cows was manipulated to ovulate larger follicles and consequently have larger CLs (LF – LCL group) or to have smaller follicles and CL (SF – SCL), and these groups represented phenotypes of higher and lower fertility, respectively (MESQUITA et al., 2014). RNA sequencing analysis indicated that changes in the periovulatory endocrine milieu associated with the growth and ovulation of different size follicles regulated endometrial gene expression on day 7 of the estrous cycle. Regional gradients of expression have been reported in the reproductive tract of cattle (BAUERSCHAS et al., 2005), pigs (BUHI et al., 2003) and sheep (MEIKLE et al., 1997, 2001). However, it is presently unknown if exposure to the distinct periovulatory milieus modulates endometrial gene expression differently in the different uterine horns, in the different regions within the uterine horn and in the vagina. Objectives were to determine the effect of distinctly periovulatory endocrine milieu on the abundance of selected endometrial genes in specific regions of the uterus and vagina.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Animal model and reproductive management

Animal procedures were approved by the Ethics and Animal Handling Committee of the University of São Paulo. Forty-two non-lactating, multiparous Nelore (*Bos indicus*) cows containing no gross reproductive anomaly, were kept in grazing conditions, supplemented with sugar cane and/or silage, concentrate and minerals and water *ad libitum*. Follicular

growth was pharmacologically manipulated to generate two groups of animals, presenting large (LF – LCL) or small (SF – SCL) preovulatory follicle and corpus luteum as described by Mesquita et al. (2014). Briefly all cows were pre-synchronized by two intramuscular injections of prostaglandin F2 alpha analog (PGF2 α ; 0.5mg of sodium clopostrenol; Sincrocio®, Ouro Fino, Cravinhos, Brazil), 14 days apart. Animals were observed for estrous behavior for ten days before the second injection of PGF2 α . Cows that presented estrus and a functional, PGF2 α -responsive, CL stayed in the program, and the others were resynchronized. To modulate the growth of the preovulatory follicles (POF), on D-10, animals received a single dose PGF2 α (LF – LCL) or not (SF – SCL) along with estradiol benzoate (BE; 2mg; i.m.; Sincrodiol®; Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil). In the same day, all animals received a P4-releasing device (1g; Sincrogest®) that stayed in the vagina for 42 to 60 hours for LF – LCL or 30 to 36 hours for SF – SCL. Expectation was that preovulatory follicular (POF) growth would be inhibited in the presence of greater P4 concentrations in animals from the SF – SCL group. This is because these animals had P4 from both exogenous (device) and endogenous (CL) sources. All animals received a PGF2 α injection at P4 device removal and a second PGF2 α 6h later. Ovulation was induced with buserelin acetate (GnRH; 10 μ g; i.m.; Sincroforte®, Ouro Fino, Cravinhos, Brazil) on D0. Plasma was obtained for measurement of E2 concentrations from D-2 to D0 and for P4 measurements from D0 to D7.

Ultrasound exams were performed by a duplex B-mode (gray-scale) and pulsed-wave color Doppler ultrasound instrument (MyLab30; Esaote Healthcare), equipped with a multi-frequency linear transducer to assess follicle growth, ovulation and CL development and vascularization. The scans were performed daily on D-10, D-6, D-2 to D0 and from D3 to D7. On days one (D1) and two (D2) the scans were executed every 12 hours. From the 42 animals that started the synchronization protocols, 6 animals per group were selected because they corresponded to treatments as planned by design. Blood was collected by jugular venipuncture in EDTA tubes (BD, São Paulo, SP, Brazil) and stored in ice. Plasma was obtained by centrifugation at 4°C, 1,500 x g for 30 minutes, and stored at -20°C.

3.2.2 Sample collection

Following slaughter, on D7, reproductive tract was removed, transported to the laboratory in ice within 10 minutes. In the laboratory, the uterus and the vagina were

dissected from the remainder of the reproductive tract. Each horn was opened from the antimesometrial side (Figure 2) and intercaruncular endometrium dissected from the anterior, middle, and posterior regions. Endometrium from each region of the uterine horn ipsilateral to the ovary containing the CL was stored individually at -80°C ; endometrium from all regions of the contralateral horn was pooled and stored at -80°C . Fragments of vaginal tissue were collected from the vaginal fornix region, pooled and stored at -80°C .

The corpus luteum was excised, measured and weighed. The CL average radius (R) was calculated from height, width and depth measurements and used for volume (V) calculation, using the formula ($V = 4/3\pi R^3$).

Figure 2 - Representative pictures of the bovine reproductive system and dissected uterine horn showing the regions studied

(ARAÚJO, E. R., 2014)

Legenda: Vagina (V). Vaginal fornix (VF). Cervix (C). Uterus (U). Ovaries (Ov). Contralateral uterine horn to the ovary containing the CL (C). Anterior (A), middle (M) and posterior (P) regions of uterine horn ipsilateral to the ovary containing the CL.

3.2.3 Sample processing

3.2.3.1 Radioimmunoassay for measuring P4 and E2 concentrations

Estradiol concentrations were measured using a commercial radioimmunoassay kit (Double Antibody Estradiol, DPC, Los Angeles, USA) as reported previously (SIDDIQUI et al., 2009). Progesterone concentrations were measured using a solid-phase radioimmunoassay

kit (count-a-count, DPC, Los Angeles, USA) as reported previously (GARBARINO et al., 2004).

3.2.3.2 RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extraction was performed using an RNeasy mini columns kit (Qiagen Laboratories), as per manufacturers instructions. To maximize lysis and the total RNA isolation, 30mg of endometrial and vaginal tissue were submerged in liquid nitrogen and macerated using a stainless steel apparatus. The macerate was mixed with buffer RLT from the kit and tissue suspension was passed at least ten times through a 21G needle, and centrifuged at 12,000 x g for 1 minute. The supernatant was processed in silica columns and treated with DNase I (Life Technologies) for 15 minutes at room temperature followed by addition of two different Washes Buffers (750 μ L and 1000 μ L, respectively) from the kit and centrifuged at 12,000 x g for 1 minute. Columns were eluted with 40 or 60 μ L of RNase free water, for endometrium or vagina, respectively. Concentration and purity of total RNA on extracts was estimated by a spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Scientific) by the absorbance at 260nm and for the 260/280 and 260/230 ratios respectively. The eluate was stored at -80°C until further processing.

The complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), as per manufactures instructions. In short, 10 μ L of master mix containing RT buffer, dNTP mix, random primers, RNase inhibitor and reverse transcriptase was added to 1 μ g of RNA extract to 10 μ L of RNase free water, totalizing 20 μ L. Samples were incubated at 25°C for 10 minutes, followed by incubation at 37°C for 2 hours and reverse-transcriptase inactivation at 85°C for 5 minutes and storage at -20°C.

3.2.4 Quantitative PCR

We selected seven genes participating in different pathways relevant to endometrium receptivity to characterize the spatial pattern of expression in the reproductive tract as well as

its relationship with the different periovulatory endocrine milieu associated with the LF – LCL and SF – SCL groups (Table 1). Progesterone receptor (PGR) and estrogen receptor 2 (ESR2) are sex steroids receptors known to be upregulated by E2 and downregulated by P4 (OKUMU et al., 2010; MESQUITA et al., 2014) similar to oxytocin receptor (OXTR; BISHOP, 2013; MESQUITA et al., 2014). Solute carrier family 2, member 1 (SLC2A1), aldo-keto reductase family 1, member C4 (AKR1C4), lipoprotein lipase (LPL), serpin peptidase inhibitor, clade A member 14 (SERPINA14, formerly known as UTMP) are genes related to histotroph quality and conceptus maintenance (SEGERSON; BAZER, 1989; ULBRICH et al., 2009a; FORDE et al., 2010; SHIMIZU et al., 2010; MESQUITA et al., 2014). Peptidylprolyl isomerase A, cyclophilin A (PPIA), actin, beta (ACTB), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and ribosomal protein L15 (RPL15) are known reference genes that were used for normalization of abundance of target genes. Primer sequences for OXTR, LPL, SERPINA14, GAPDH, ACTB, RPL15 and PPIA were obtained from literature (BETTEGOWDA et al., 2006; KRISHNASWAMY et al., 2009; ULBRICH et al., 2009a; FORDE et al., 2011). Primer sequences were designed based on Gen-Bank RefSeq mRNA sequences of the target genes using the National Center for Biotechnology Information tool, Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) for PGR, ESR2 and AKR1C4 and PrimerQuest (<http://www.idtdna.com/primerquest>) for SLC2A1. Primer details are provided in table 1. Equivalent specificity searches were done using the software “*Basic Local Alignment Search Tool*” (Blast; ALTSCHUL et al., 1990; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Gene expression assessment was executed according to minimum information of quantitative real-time PCR experiments (MIQE) guidelines for qPCR (BUSTIN et al., 2009).

Real-time reverse transcription polymerase chain reactions were carried out in 96 well plates in a Step One Plus apparatus (Life Technologies). The 20µL reactions contained power SYBR green reagent (10µL), cDNA samples (diluted 1:40) or DEPC water in the negative control (4µL), and a mixture of specific forward and reverse primers (6µL). The thermal cycling parameters were set as 95°C for 10min, 40 cycles of 15s at 95°C, and 1min at 60°C. For each gene, concentration of primers on the reaction mixture was tested (150, 300, 600nM or 900nM) using a pool of cDNA samples (diluted 1:40) and selected according to efficiency of amplification, lack of amplification in the negative control and melting (dissociation) curve analysis. Transcript abundance was determined using the relative standard curve method using serial dilutions of a cDNA pool (1:40 to 1:320). Primers were considered for further

analysis when efficiency of amplification of the standard curve was between 85 and 110% and coefficient of determination of the regression equation was > 0.97 . There was no linear amplification of the AKR1C4 gene in the vagina and this gene was not further analyzed in this tissue. Cycle quantification (Cq) values were obtained from the LinReg PCR software. The log-linear portion of the amplification curve used for analysis contained from four to six points with the highest R^2 value (Table 2). The expression of each target gene was calculated following normalization using the GeNorm software (VANDESOMPELE et al., 2002). Initially four reference genes were used (PPIA, ACTB, GAPDH and RPL15). After selection performed by the software, PPIA and ACTB were chosen. The geometric mean of the expression of these two genes was used for normalization of the expression of the target genes. The identity of amplified PCR fragments was verified by sequencing. Samples were sent to Centro de Estudos do Genoma Humano from University of São Paulo and the resulting sequences were accessed by Chomas software (<http://technelysium.com.au/>) and tested for specificity using “*Basic Local Alignment Search Tool*” software (Blast; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Table 1 - Symbols of genes, accession numbers, primer pair sequences, amplicon size and literature references used to generate primers

Target Gene	GenBank Number	Sense/Anti-sense Primer sequences	Size of amplicon (pb)	References
PGR	NM_001205356.1	5'-GCCGCAGGTCTACCAGCCCTA-3' 3'-GTTATGCTGTCCTTCCATTGCCCTT-5'	199	Primer-Blast
ESR2	NM_174051.3	5'-TCACGTCAGGCACGCCAGTAAC-3' 3'-CACCAGGTTGCGCTCAGACCC-5'	155	Primer-Blast
OXTR	NM_174134.2	5'-AAGATGACCTTCATCGTCGTG-3' 3'-CGTGAAGAGCATGTAGATCCAG-5'	177	KRISHNASWAMY et al., 2009
AKR1C4	NM_181027.2	5'-TGAGCTATTACTGGGTGTTGGTCACCC-3' 3'-ACAGCCCTAGAAGCAAGATGTTCTGGT-5'	106	Primer-Blast
SERPINA14	NM_174797.3	5'-ATATCATCTTCTCCCCCATGG-3' 3'-GTGCACATCCAACAGTTTGG-5'	126	ULBRICH et al., 2009a
LPL	NM_001075120	5'-CAGGTCGAAGTATCGGAATCCA-3' 3'-GAAAGTGCCTCCGTTAGGGTAAA-5'	68	FORDE et al., 2010
SLC2A1	NM_174602.2	5'-ATCATCTTCACCGTGCTCCTGGTT-3' 3'-TGTCACCTTGACTTGCTCCTCCCT-5'	127	PrimerQuest
GAPDH	NM_001034034.2	5'-GCCATCAATGACCCCTTCAT-3' 3'-TGCCGTGGGTGGAATCA-5'	70	BETTEGOWDA et al., 2006
ACTB	NM_173979.3	5'-GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA-3' 3'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-5'	78	BETTEGOWDA et al., 2006
RPL15	NM_001077866.1	5'-TGGAGAGTATTGCGCCTTCTC-3' 3'-CACAAGTTCCACCACACTATTGG-5'	65	BETTEGOWDA et al., 2006
PPIA	NM_178320.2	5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3' 3'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-5'	66	BETTEGOWDA et al., 2006

Table 2 - Primers validation data for qPCR

Genes	PGR	OXTR	ESR2	AKR1C4	LPL	SLC2A1	SERPINA 14	PPIA	ACTB
Concentration (nmol) ^a	150	150	150	300	300	900	150	150	300
Efficiency of Standard Curve End (%) ^b	85,2	103,5	108,6	97	99,9	97,1	92	101,9	97
Efficiency of Standard Curve Vag (Eff %) ^b	98,7	103,1	107,3	-	109,45	91,41	102,4	96,2	100,6
Amplification (LinReg® Cq) ^c	1,81	1,9	1,85	1,82	1,9	1,84	1,83	1,82	1,8

^a Primer concentration used in qPCR reactions

^b Efficiencies of standard curve for endometrium (End) and vagina (Vag) calculated by the equation: efficiency = $10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$

^c Mean of amplification efficiencies for endometrium and vagina provided by LinReg PCR software

3.2.5 Statistics

All data were tested for normality of distribution of residues using Shapiro-Wilk's test and homogeneity of variances using Welch's method and transformed to natural logarithms or inverse if necessary. Discrete dependent variables (diameter of dominant follicle on D-2 and D0 and diameter of POF, E2 concentrations on D-2, D-1 and D0, CL volume and weight measured post-mortem and P4 concentrations on D6, sum of P4 concentrations from D3 to D6, difference between P4 concentrations from D6 to D3 and interval between D0 until P4 > 1ng/mL) were analyzed by one-way ANOVA for the effect of group using the PROC MIXED procedure (Version 9.2; SAS) with animal within group as random. For qPCR data, abundance of each gene was analyzed by split-plot ANOVA. For measures repeated in space using SAS PROC MIXED procedure (Version 9.2; SAS Institute) two distinct models were used. The first model estimated the effects of group, side and interaction and the second model estimated the effects of group, region and interaction. Cow within group was considered as random variable, as covariate region or side were considered and was used CS matrix. For target gene abundance in vaginal tissue, only the effect of group was analyzed. A probability of $P \leq 0.05$ indicated significant effects and a probability of $P > 0.05$ to ≤ 0.1 indicated that significance was approached. Data are presented as the arithmetic mean $\pm$ SEM.

3.3 RESULTS

3.3.1 Animal model

Briefly, the animal model succeeds to generate two groups with larger or smaller follicle and CL and, consequently higher or lower blood concentrations of E2 and P4. Results were published by Mesquita et al. (2014). Follicle diameter on days -2, 0 were greater on group LF – LCL, as well as POF (Table 3). Estradiol concentrations (pg/mL) were measured on three animals of SF – SCL and five animals of LF – LCL. The group LF – LCL had higher E2 concentration on days -1 and 0. CL weight and volume measured after slaughter on D7

were higher on group LF – LCL, but CL volume didn't have significant effect ($p=0.17$). Progesterone concentrations measured on D6 were significantly higher on the LF – LCL group, as well the sum of P4 concentration of D3 to D6 and, the difference between P4 concentration on D3 and P4 concentration on D6. The interval (days) between D0 to day of P4 >1ng/mL was greater on the SF – SCL group.

Table 3 - Follicle, CL and P4 measurements of cows ovulating within the first 48 hours post GnRH. Values are expressed as means $\pm$ standard error of the means

End point	Group		P < F
	SF-SCL (n=6)	LF-LCL (n=6)	
Follicle diameter (mm):			
D-2	6.92 ± 0.47	10.88 ± 0.76	0.002
D0	10.11 ± 0.41	13.35 ± 0.48	<0.0004
Pre-ovulatory follicle	10.33 ± 0.33	13.88 ± 0.47	<0.0001
Plasma Estradiol concentrations (pg/mL): ^a			
D-1	0.36 ± 0.23	2.30 ± 0.57	0.04
D0	0.93 ± 0.16	2.96 ± 0.36	0.006
CL:			
Weight (g) ^b	1.64 ± 0.23	2.88 ± 0.27	0.005
Volume (cm ³)	1.72 ± 0.31	2.31 ± 0.24	0.17
Plasma progesterone concentrations (ng/mL):			
D6	1.27 ± 0.25	3.52 ± 0.48	0.002
D3 to D6 ^c	2.71 ± 0.59	7.83 ± 1.16	0.002
Difference between D6 and D3 ^d	1.03 ± 0.19	3.03 ± 0.40	0.001
Interval (days):			
D0 to day of P4 >1ng/mL	6.17 ± 0.31	4.33 ± 0.33	0.0025

D0 is the day of GnRH treatment to induce ovulation

^a Estradiol concentrations were assayed in a subset of animals (n=3-5/group)

^b Measured post-mortem on D7

^c Sum of P4 concentration of D3+D4+D5+D6

^d Subtraction of P4 concentration on D3 from P4 concentration on D6

3.3.2 qPCR Results

3.3.2.1 Side of the uterine horn

For the statistics analysis of the genes OXTR, AKR1C4 and ESR2 it was necessary to transform the data for logarithm (OXTR, AKR1C4) or inverse (ESR2). Endometrium from cows in the LF – LCL group had a greater abundance of transcripts for ESR2, AKR1C4, LPL and SLC2A1. In contrast, the group SF – SCL had higher expression of genes PGR and OXTR (Figure 3). Abundance of transcripts for ESR2, AKR1C4, SLC2A1, LPL and SERPINA14 was similar between the ipsilateral and contralateral horns. Abundance of transcripts for PGR and OXTR was greater in the side contralateral to the CL.

For the OXTR gene there was a group by side interaction. Interpretation of the interaction revealed that while abundance of OXTR was greater in the contralateral side for the SF – SCL group, it was similar between sides in the LF – LCL group.

3.3.2.2 Region of the uterine horn ipsilateral to CL

To achieve normality of residues, abundance of PGR, OXTR, AKR1C4 was transformed to natural logarithm, while the abundance of ESR2 was transformed to the inverse.

For all genes studied, abundance of endometrial genes was affected by the group and was greater in the LF – LCL group for ESR2, AKR1C4, SLC2A1, LPL and SERPINA14 and lower for PGR and OXTR (Figure 4). Except for OXTR, there was an effect of region of the horn ipsilateral to the CL. Generally, expression was greatest in the anterior region and lowest in the posterior region of the horn. There was no significant group by region interaction.

Figure 3 - Geometric mean of the abundance of relative mRNA expression levels normalized by the PPIA (peptidylprolyl isomerase A; cyclophilin A) and ACTB (actin, beta). Values are expressed as means $\pm$ standard error of the mean

Legenda: Effect of group (G), side (S), interaction group*side (G*S). Large follicle – large CL (LF – LCL), small follicle – small CL (SF – SCL), IPSI (horn ipsilateral to the ovary bearing the CL), CONTRA (horn contralateral to the ovary bearing the CL). Genes: progesterone receptor (PGR), estrogen receptor 2 (ESR2), oxytocin receptor (OXTR), aldo-keto reductase family 1, member C4 (AKR1C4), solute carrier family 2, member 1 (SLC2A1), lipoprotein lipase (LPL), serpin peptidase inhibitor, clade A member 14 (SERPINA14, formerly known as UTMP).

Figure 4 - Geometric mean of the abundance of relative mRNA expression levels normalized by the PPIA (peptidylprolyl isomerase A; cyclophilin A) and ACTB (actin, beta). Values are expressed as means $\pm$ standard error of the mean

Legenda: Effect of group (G), region (R), interaction group*region (G*R). Large follicle – large CL (LF – LCL), small follicle – small CL (SF – SCL), ipsilateral anterior (IA), medium (IM) and posterior (IP) regions. Genes: progesterone receptor (PGR), estrogen receptor 2 (ESR2), oxytocin receptor (OXTR), solute carrier family 2, member 1 (SLC2A1), aldo-keto reductase family 1, member C4 (AKR1C4), lipoprotein lipase (LPL), serpin peptidase inhibitor, clade A member 14 (SERPINA14, formerly known as UTMF).

3.3.2.3 Vagina

For the statistics analysis of the expression of the gene SLC2A1, it was necessary to transform the data for natural logarithm. Expression of ESR2, OXTR, LPL, SLC2A1 and SERPINA14 in the vagina was similar between groups. There was a trend for a greater expression of PGR ($P=0.08$) in the vagina in the SF – SCL group (Figure 5).

Figure 5 - Relative mRNA expression levels normalized by the PPIA (peptidylprolyl isomerase A; cyclophilin A) and ACTB (actin, beta). Values are expressed as means $\pm$ standard error of the mean

Legenda: Large follicle – large CL (LF – LCL), small follicle – small CL (SF – SCL), progesterone receptor (PGR), estrogen receptor 2 (ESR2), oxytocin receptor (OXTR), solute carrier family 2, member 1 (SLC2A1), aldo-keto reductase family 1, member C4 (AKR1C4), lipoprotein lipase (LPL), serpin peptidase inhibitor, clade A member 14 (SERPINA14, formerly know as UTMP).

3.4 DISCUSSION

During the estrous cycle and pregnancy, the coordinated effects of estradiol (E2) and progesterone (P4) prime the endometrium resulting in changes in uterine function, histotroph composition and pregnancy outcome (MILLER et al., 1977; CLEMENTE et al., 2009). Furthermore, across the estrous cycle, changes in transcript abundance between different

portions of the bovine uterus were reported (BAUERSACHS et al., 2005). To further explore the modulation of the spatial pattern of transcript abundance in the reproductive tract by levels of steroid hormones, this study compared different regions of the reproductive tract. Specifically abundance of seven genes relevant to reproductive tract function was compared in the endometrium between the uterine horns ipsilateral and contralateral to the CL, or among the anterior, medial and posterior regions of the uterine horn ipsilateral to the CL or in the vagina, in groups of cows exposed to distinct periovulatory sex steroid (i.e., E2 and P4) milieu.

The follicular growth of multiparous non-lactating Nelore cows was pharmacologically manipulated in order to obtain groups with large or small preovulatory follicles and corpora lutea (MESQUITA et al., 2014). The animal model succeeded to generate groups with distinctly different size of pre-ovulatory follicle and concentrations of E2 during proestrus and size of CL and P4 concentrations during the early subsequent diestrus. More importantly, patterns of concentrations of E2 and P4 on the periovulatory period similar to the ones reported for the LF-LCL group have been associated previously to elevated fertility (VASCONCELOS et al., 2001; PERRY et al., 2005, 2007; DEMETRIO et al., 2007) and greater conceptus elongation (FORDE et al., 2011). These different fertility phenotypes were also associated with distinct abundance of specific transcripts in the endometrium (MESQUITA et al., 2014). Furthermore, transcript abundance varied according to the uterine horn (i.e., ipsilateral or contralateral to the ovary containing the CL) and region of the ipsilateral uterine horn. Specifically, abundance of PGR and OXTR was downregulated in the ipsilateral horn. Downregulation was possibly in response to the reported greater concentration of P4 in the uterine vein, uterine artery and ovarian artery adjacent to the ovary bearing the CL (WEEMS et al., 1988). Regarding the effect of region of the ipsilateral horn, the expression of PGR, ESR2, LPL, SERPINA14 and SLC2A1 was upregulated on the anterior region compared to the posterior. It is possible that a regional gradient of expression in the uterus is necessary for the optimal development of the conceptus during the window of pre-implantation. Finally, there was no strong evidence for modulation of expression of these same genes by the different periovulatory endocrine milieu in the vagina, showing that even adjacent tissues may have unique responses to the priming effects of sex steroids.

Discussion of the effectiveness of the experimental model used and the effects of regions in the reproductive tract on the expression of candidate genes will be presented next.

3.4.1 The animal model: morphologic and endocrine changes

The animal model used in this study consisted on the manipulation of dominant follicle growth to generate two groups of cows with distinct proestrus/estrus E2 concentrations and distinct postovulatory CL weight, and P4 concentrations (MESQUITA et al., 2014). Pre-ovulatory follicle diameter (mm) on LF – LCL group was 30% larger than on the SF – SCL group. Accordingly, CL weight (g) was 72% higher on the LF – LCL group. Estradiol and P4 concentrations in the LF – LCL group (2,96pg/mL; 3,52µg/mL) measured on D0 and on D6, respectively, were approximately three times higher than those measured on SF – SCL group (0,93pg/mL; 1,27µg/mL). Indeed, ovulation of larger POF results in larger CLs that will have increased production of P4 earlier than CLs ovulated from smaller follicles (VASCONCELOS et al., 2001; PERES et al., 2009). This acceleration of P4 secretion may hasten the preparation of the uterus for receiving the embryo (SPENCER; SANDRA; WOLF, 2008). Indeed, positive associations between POF diameter and/or P4 concentration during early diestrus and pregnancy success rates were reported earlier (VASCONCELOS et al., 2001; PERRY et al., 2005, 2007; DEMETRIO et al., 2007). Conversely, Bridges et al. (2010) exposed beef heifers to short proestrus/low E2 concentrations and noticed a major negative effect on pregnancy success. Collectively, the experimental model used in this dissertation produced distinctly different periovulatory endocrine milieus that are associated with different receptivity statuses; endometria exposed to such different milieus were appropriate to study regional gene expression changes, the main focus of the present work.

3.4.2 The animal model: effects on endometrial transcript abundance

Molecular mechanisms associated with greater fertility are poorly understood. We propose that modulation of POF diameter and consequently E2 and P4 blood concentrations might act to promote specific changes in the expression of specific gene networks in the endometrium to affect fertility. For example, in an ovariectomized ewe model that mimic the

sequential exposure to ovarian steroids (P4-E2-P4), absence of E2 supplementation compromised endometrial expression of E2 and P4 receptors, uterine protein synthesis and protein content in the uterine lumen (MILLER et al., 1977). It was proposed that E2 acted as a priming agent for the subsequent uterine response to postovulatory P4 and was required in order to establish a uterine environment suitable for development of the embryo. In the present dissertation, there was significant group by side interaction for OXTR and no interaction for group by region. Moreover, in both statistical models tested, there was a strong main effect of group. In the present section of the discussion only the main effect of group will be discussed. Abundance of ESR2, AKR1C4, LPL, SLC2A1 and SERPINA14 was upregulated and PGR and OXTR was downregulated on the endometrium of cows of the LF-LCL group, respectively. Mesquita et al. (2014) used the same animal model used in this dissertation to produce contrasting periovulatory endocrine milieus. They studied the effects of this model on the expression of 18 genes in the endometrium of Nelore cows. They found that expression of ESR2, AKR1C4 and LPL was increased, OXTR, PIP3 (peptidase inhibitor 3, skin-derived) was downregulated and ANPEP (alanyl membrane aminopeptidase), ASGR2, (asialoglycoprotein receptor 2), CTGF (connective tissue growth factor), CYP11A1 (cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1), ESR1 (estrogen receptor 1), NUPR1 (nuclear protein transcriptional regulator 1), PGR and STAP2 (signal transducing adaptor family member 2) was not changed in the endometrium of cows in the LF-LCL group in comparison to the SF-SCL group, respectively. Using a different model, Forde et al. (2011) inserted a progesterone releasing-intravaginal device (PRID) in pregnant and non-pregnant heifers on day 3 post estrus, showed that P4 supplementation at early diestrus associated with stimulation of conceptus elongation stimulated expression of 910 genes in the endometrium on Day 7 after estrus.

In the present dissertation, PGR and OXTR expression was downregulated on the LF – LCL group in comparison to the SF – SCL group. Elevated concentrations of P4 during early diestrus downregulates its own receptor (OKUMO et al., 2010; FORDE et al., 2011). It is well known that loss of PGR in luminal and glandular epithelium is necessary for embryo implantation (SPENCER; SANDRA; WOLF, 2008; BAZER et al., 2010). Parallel to PGR downregulation, there is downregulation of genes that are not necessary and upregulation of genes required to maintenance of the embryo in the uterus lumen (FORDE et al., 2011). A similar pattern of expression is observed for OXTR. Expression of OXTR is maximal at estrus and decreases progressively during early to mid-diestrus (SPENCER et al., 2004;

reviewed by SPENCER; BAZER, 2004; WIJAYAGUNAWARDANE et al., 1998). Downregulation of OXTR may be caused by P4. In fact, it has been reported that P4 antagonizes OXTR via non-genomic mechanism (BISHOP, 2013).

Expression of ESR2 was increase in LF – LCL group. Estradiol stimulates synthesis of its own receptor and also that of PGR *in vivo* (ING 1996; BOOS et al., 1996, ROBINSON et al., 2001) and *in vitro* (XIAO; GOFF, 1999). In contrast, P4 reduces expression of ESR2 and PGR and the loss of both receptors in endometrial epithelia. This is a precondition for implantation and expression of genes for secretory proteins and proteins that selectively transport molecules into the uterine lumen to produce histotroph (BAZER; SLAYDEN, 2008). Our result demonstrated that, on D7, the concentration of progesterone in the blood on the LF – LCL group was not sufficient to downregulate ESR2. Nevertheless, during embryonic and fetal development estrogen receptors are detected, suggesting that E2 may be required for growth and differentiation of the reproductive tracts (MEIKLE et al., 1997).

The main known function of AKR1C4 is to convert PGH2 to PGF2 α (GAUVREAU et al., 2010). The LF – LCL group had higher mRNA expression of AKR1C4. Ulbrich et al. (2009b) indicated that pregnant cows had much higher concentrations of PGF2 α in the uterine flushing than their cyclic counterparts on day 15 and day 18, although peripheral PGF2 α pulses are not present during early pregnancy (SCHALLENBERGER et al., 1989). This hormone in low concentrations stimulates vascularization of the endometrium, the maintenance of the blastocyst and embryo implantation (CHARPIGNY et al, 1997; REESE et al., 1999). Uterine PGF2 α might play a so far underestimated role during early pregnancy with beneficial rather than detrimental effects on fertilization success. Another important role of enzymes of the AKR family is to metabolize P4 in the uterus, reported in humans, murine and porcine (PENNING et al., 2000; VELIÇA et al., 2009; SEO et al., 2011). If such activity was in place in the tissues from the cows in the present experiment, it might be speculated that it was necessary to counterbalance effects of greater P4 concentrations on the uterus of LF-LCL group.

Downregulation of PGR on D7 alters the expression of other genes involved in the control of histotroph composition, such as glucose transporters and genes involved in the metabolism of lipids. The embryo on D7 is in the lumen of the anterior region of the uterine horn ipsilateral to the CL, and is nourished by the surrounding histotroph. LPL and SLC2A1 may contribute to the composition of the histotroph. LPL is involved in lipid metabolism and

delivering triacylglycerol (TAG) to target tissues (MEAD; IRVINE; RAMJI, 2002) and histotroph. The embryo can use TAG as energy source at this stage of development (FERGUSON; LEESE, 2006). Progesterone sequentially enhances LPL expression on D7 and decreases it when the embryo starts to elongate (D13; FORDE et al., 2010, 2011). In our model, LPL showed higher expression on the LF – LCL group. This data is in agreement with Forde et al. (2010, 2011). SLC2A1 expression was higher in LF – LCL group. This gene is responsible for the facilitated transport of glucose across the plasma membrane by diffusion gradient (a passive process; WOOD; TRAYHURN, 2003). Expression in the endometrium is associated with a regulated by ovarian steroid hormones (FROLOVA; MOLEY, 2011). Moreover, consistent with the present dissertation, administration of P4 increased expression of SLC2A1 in endometrium of ovariectomized cows (SHIMIZU et al., 2010). Collectively, alteration of expression of genes associated with histotroph composition by P4 may provide a more nutritive environment for embryo development and ultimately stimulate conceptus elongation and survival.

Another gene whose expression is related to the early diestrus increase in P4 concentrations and subsequent PGR loss is SERPINA14 (SPENCER et al., 2004; ULBRICH et al., 2009a). Long-term treatment of ovariectomized ewe with P4, demonstrated an abundant increase of mRNA expression of SERPINA14 in the endometrium (SPENCER et al., 1999). Although, Bauersachs et al. (2005) demonstrated that expression of SERPINA14 between oestrus and diestrus was remarkably different (150-fold) in endometrium of cows. It can be consider that E2, next to P4, is a putative regulator of SERPINA14 expression in the bovine endometrium (ULBRICH et al., 2009a). SERPINA14 is one of the most abundant proteins present in the pregnant ruminants uterus (SEGERSON; BAZER, 1989), and its main functions are immune modulation and carrying proteins such as immunoglobulins (ULBRICH et al., 2009a; PADUA; HANSEN, 2010) allowing immunological tolerance of the conceptus by the maternal uterus (LEDGARD; MEIER; PETERSON, 2011). The mRNA expression of this transcript was higher in the LF – LCL group. SERPINA14 has been described as a marker of fertility in cows with longer conceptus (KHATIB et al., 2009; LEDGARD; MEIER; PETERSON, 2011).

Collectively, it is clear that manipulations that change the periovulatory endocrine milieu affect fertility and that at least some of these effects may be due to altered endometrial gene expression. However, studies about actions of ovarian hormones in the uterus usually disregard potential differential responses according to region of the uterus. Furthermore,

interactions between a fertility model and the region of the reproductive tract have never been reported, to our knowledge. It is clear that abundance of transcripts (BAUERSACHS et al., 2005) and proteins (BINELLI et al., 1999) is different among regions of the uterus and oviduct in different species (BUHI et al., 1999; CÁRDENAS; POPE, 2003; HICKE,; FAHEY; WIRA, 2012). It seems logical that the effect of manipulation of the POF and CL diameter on regional expression of genes needed further understanding.

3.4.3 The effect of side of the uterine horn relative to the ovary containing the CL

The embryo on D7 will be on the horn ipsilateral to the ovary bearing the CL and will remain there until the conceptus elongates and reaches the contralateral horn that occurs approximately on D15 after estrus (PEIPPO; MACHATY; PETER, 2011). Thus, the ipsilateral horn has to be prepared for the possible pregnancy. In the present dissertation, expression of PGR and OXTR was less in the uterine horn ipsilateral to the CL, whereas expression of the remaining five genes was similar between the two horns. It is proposed that local concentrations of P4 were different for the different horns and this affected horn expression of PGR and OXTR. Genes with unaffected expression may not be sensitive to such side differences. There was a group by side interaction for OXTR that could be explained by the fact that while abundance of OXTR was greater in the contralateral side for the SF – SCL group, it was similar between sides in the LF – LCL group.

The downregulation of the PGR and OXTR suggests that proximity to the CL and to elevated concentration of P4 contributed to the downregulation of these two transcripts. Indeed, P4 concentration on tissues (mesosalpinx, uterine artery, ovarian artery, anterior and posterior region of uterine horn) in the ipsilateral horn was greater than in the opposite side in beef and dairy cows and in ewes (POPE; MAURER; STORMSCHAK, 1982; WEEMS et al., 1988, 1989). Also the uterine and ovarian artery adjacent to the ovary bearing the CL had higher P4 concentration (WEEMS et al., 1988, 1989). However, the abundance of OXTR in the contralateral side on the group SF – SCL showed to be a putative fact for the interaction. In this moment we cannot explain this interaction.

Exchange of iodinated oxytocin in the ovarian pedicle and its branches showed that

there is a local transfer of OT in the blood vessels of the ovarian pedicle (SCHRAMM et al., 1986). Both oxytocin and (MW=1007) and P4 (MW=315) are low molecular weight molecules; also, P4 is a lipophilic (SCHRAMM et al., 1986). It is possible that vascular transfer of these hormones is a function of the surface area of contact between veins and arteries (GINTHER; DEL CAMPO, 1974). Similarly to our findings, expression of OXTR was greater in the non-gravid horn (LEDGARD; MEIER; PETERSON, 2011). Also, in the presence of CLs in both ovaries, there was no difference of P4 and oxytocin concentration in the middle region of both horns as described by Cerbito et al. (1996). The differences in expression of PGR and OXTR between sides may be one of the reasons that the embryo when in the contralateral side has less chance of survival.

Effect of physical proximity to the ovary containing the CL (i.e., the ipsilateral or contralateral side) affects other reproductive organs, such as the oviduct. For example, Bauerscachs et al. (2003) reported differences in transcriptional level between the ipsilateral and contralateral oviducts in cattle on D3.5. Binelli et al. (1999) described different abundance of cattle oviductal secretory proteins at estrus according to side. Similar effects of side were also reported in the oviduct ewes (BUHI et al., 1991). Consistently, in a study that measured concentrations of different hormones in the bovine oviduct revealed that concentrations of E2 on the follicular phase, prostaglandin E2, PGF2 α , endothelin-1 and P4 on the luteal phase were higher in the ipsilateral oviduct than those at the contralateral side (WIJAYAGUNAWARDANE et al., 1998).

In the present dissertation, we propose that the observation that expression of two of the genes measured varied according to side may be explained by a differential priming of the ipsilateral uterine horn by E2 and P4 because of the physical proximity to the preovulatory follicle and the resulting CL. It is possible that the differential expression between horns may be needed to provide an optimal environment for the developing embryo in the lumen of the anterior region of the ipsilateral horn (WALLENHORST; HOLTZ, 1999). This can be reinforced by the fact that embryos transferred to the ipsilateral horn have greater chance of survival than embryos transferred to the contralateral horn (TERVIT; HAVIK; SMITH, 1977; CHRISTIE; NEWCOMB; ROWSON, 1979). Anatomical and physiological differences were observed between the ovarian artery and uterine arteries from horns adjacent and opposite to the ovary containing the CL (GINTHER; DEL CAMPO, 1974; GINTHER, 1974, 1976). Specifically, the uterine branch of the ovarian artery is significantly larger in diameter on the side of the CL than on the opposite side and the uterovarian arterial anastomosis is more

prominent on the side with a corpus luteum (GINTHER, 1976).

Staples, Fleet and Heap (1982) confirmed that there is a functional ovarian-uterine lymphatic anastomose passage and that P4 in the lymph had higher concentration than in the peripheral plasma. This data was confirmed in ovariectomized animals when P4 concentration was similar between lymph and plasma. In summary, an effect of side could be explained by mechanisms that would work to deliver different amounts of ovarian steroids to each horn. The physiological and anatomical mechanisms through which hormones can pass through the female reproductive vasculature are yet not clear. But it is clear that they are important for normal function and maintenance of the reproductive organs (WALSH; YUTRZENKA; DAVIS, 1979).

It's important to remember that for these comparison was used a pool for all regions on the contralateral horn. And for the ipsilateral horn, was used an arithmetic mean of the expression of the three regions. So, this similarity may be due a gradient of molecular expression in both horns, whereas the entire uterus is regulated at the same way. The likeness is interesting when probing the uterus is intended for diagnostics or prognostics studies.

3.4.4 The effect of region of the ipsilateral uterine horn relative to the ovary containing the CL

The anterior region of the horn ipsilateral to the ovary containing the CL is the site where the embryo will be on D7 of pregnancy (BAZER et al., 2012). The microenvironment in this region must be prepared to support the embryo, since it will be free floating in the histotroph and completely dependent on it for nutrition and development. In the present dissertation, abundance of transcripts coding for PGR, ESR2, LPL, SERPINA14 and SLC2A1 was greater on the anterior region of the horn ipsilateral to the CL. There was no significant region by group interaction on the expression of target genes, so only the main effect of region will be discussed further.

PGR and ESR2 had greater expression on the anterior region of the ipsilateral horn.

Meikle et al. (1997) found greater expression of PGR on the anterior region in lambs treated with P4 or E2. Meikle et al. (1997) has also found the same gradient of ESR2 in lambs and concluded that the difference in expression of E2 receptors along the uterine horns could be related to the hormonal dependence of the newcomer embryo to growth and differentiation of its reproductive tracts. LPL and SLC2A1 expression was higher in the anterior region. Both genes are related to the conceptus nourishment (FERGUSON; LEESE, 2006; FORDE et al., 2010; SHIMIZU et al., 2010). It is important to remember that the embryo will be on the anterior region of the ipsilateral horn and will be supported by the histotroph (FORDE et al., 2009). The mRNA expression of SERPINA14 was higher in the LF – LCL group and in the anterior region. The higher expression in the anterior region was demonstrated previously (BAUERSCHAS et al., 2005; ULBRICH et al., 2009a). Ulbrich et al. (2009a) studied the gradient of SERPINA14 in the uterus during after estrus in cyclic and pregnant heifers. The decreasing gradient from the anterior to the posterior region was observed at estrus (D0) and, to a lesser extent, at Day 3.5. At Days 12, 15, and 18 there was no difference between the various uterine segments in SERPINA14 expression, both in cyclic and pregnant animals (ULBRICH et al., 2009a). Similar to the mechanisms discussed for the effect of side, it may be speculated that the gradient in abundance of transcripts along the uterine horn is because of a differential delivery of E2 and P4 among this regions. Indeed, it has been shown that P4 concentration on the anterior region of ipsilateral horn was greater than to the posterior region in cows and ewes (POPE; MAURER; STORMSCHAK, 1982; WEEMS et al., 1988, 1989). It is possible that substances produced in the ovary, released in the ovarian venous flow and transferred to the ovarian arterial blood will reach not only the ovary but also the oviduct and possibly the tubal portion of the uterus (EINER-JENSEN; HUNTER, 2005). Preferential transfer of ovarian steroid hormones to the uterus has been demonstrated during both the follicular and luteal phases in women (CICINELLI et al., 2004).

Weems et al. (1988) harvested blood from the jugular and the first branch of the uterine vein of both horns, performed a ligation of the oviduct vein and after 48 hours harvest blood again. It was found that there is possibly a direct distribution of P4 to the anterior region of the uterus, through the oviduct vein because the level of P4 on the anterior region was higher than in the jugular and in the opposite horn. Furthermore, concentration of P4 decreased significantly when oviduct vein ligation was performed.

In summary, regional effects were detected on the expression of five out of seven genes studied. Based on anatomical evidence from previous studies, it is proposed that

differential expression is caused by a differential supply of P4 along the uterine horn, which is greatest towards the apical portion and less towards the caudal portion.

3.4.5 Vagina

Removing tissue samples from the endometrium *in vivo* is an invasive procedure that may cause undesirable reactions such as inflammation and loss of ongoing gestations. An alternative would be collecting samples from the vagina, because it is an organ more external and less prone to infections. However, it was important to determine if the vagina could represent the uterus in terms of gene expression. Specifically, we aimed to determine whether the expression of target genes in the vagina was regulated by the distinct periovulatory endocrine milieu used in this dissertation in a manner similar to the endometrium. The vagina is a hormone-dependent tissue and the vaginal epithelium is a target for estrogen action (WANG; ERIKSSON; SAHLIN 2000; VERMEIRSCH; VAN DEN BROECK; SIMOENS, 2002; De BRITO et al., 2006). However, to our knowledge, interference of a fertility animal model, such as the one used herein, on the abundance of transcript in the vagina is not known. In our study, there was no effect of group on the expression of any of the six genes tested in the vagina. However, there was a trend ($P=0.08$) for the abundance of PGR in the vagina to be greater for the SF – SCL and this was consistent with findings reported by (SAGSÖZ et al., 2010). Ohta, Sato e Iguchi (1993) demonstrated that in the vagina of rats, PGR protein abundance is higher in proestrus. Furthermore, they used ovariectomized rats treated with E2 and/or P4 or without hormones and noted that PGR concentration was increased by estrogen, but not by progesterone. In cows, Sagzös et al. (2010) showed the presence of receptors for estradiol and progesterone in this organ.

We concluded that the vagina showed to not be a representative tissue for uterus. The lack of differences between groups is extremely different from uterus that showed differences between LF – LCL and SF – SCL for all molecules studied.

4 CONCLUSION

Collectively, the animal model succeeded to generate two groups with distinct periovulatory endocrine milieus. Also, the animal model was sufficient to alter the mRNA expression in the uterus but not in the vagina. Most importantly, it was shown, that such different milieus, manipulated within physiological limits, distinctly regulate the expression of key endometrial genes on different portions of the uterus. Fertility studies using the present animal model are necessary. This study represents a moment during the reproductive process, but demonstrates clearly that the reproductive tract is regulated differently in different regions. We propose that there is a local modulation in the uterus by P4 and E2 that is possible because of anatomical arrangements in the reproductive tract vasculature. Such arrangement permits that steroid-rich blood from the ovarian drainage is delivered preferentially to specific regions of the reproductive tract in detriment of others. This has been proposed earlier (GINTHER, 1976), but the anatomic basis is unclear and more studies in this area are necessary. Specifically, to prove that proximity to the follicle and the corpus luteum determines differences between horns and regions, connections between the ovarian vein and specific branches of the uterine artery should be found that would enable local transport of P4 and E2. Alternatively, a simple way to verify horn and regional effects of ovarian hormones would be through the use of ovariectomized, steroid-supplemented animals.

We conclude that there are clear regional effects of E2 and P4 on endometrium gene expression. Regional changes on the expression of genes may be crucial to benefit embryo development and survival and, ultimately, pregnancy success.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- BARUSELLI P. S.; SALES J. N. S.; SALA R.V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v.9, n. 3, p. 139-152, 2012.
- BAUERSACHS, S.; BLUM, H.; MALLOK, S.; WENIGERKIND, H.; RIEF, S.; PRELLE, K.; WOLF E. Regulation of ipsilateral and contralateral bovine oviduct epithelial cell function in the postovulation period: a transcriptomics approach. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1170–1177, 2003.
- BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; GROSS, K.; SCHMIDT, S. E.; MEYER, H. H. D.; EINSPIANIER, R.; WENIGERKIND, H.; VERMEHREN, M.; BLUM, H.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrus cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 889-908, 2005.
- BAUERSACHS, S.; WOLF, E. Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1-2, p. 84-94, 2012.
- BAZER, F. W.; SLAYDEN, O. D. Progesterone-induced gene expression in uterine epithelia: a myth perpetuated by conventional wisdom. **Biology of Reproduction**, 79, n. 5, p. 1008-1009, 2008.
- BAZER, F. W.; SONG, G.; KIM, J.; DUNLAP, K. A.; SATTERFIELD, M. C.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; WU, G. Uterine biology in pigs and sheep. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 23, 2012.
- BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Interferon Tau: a novel pregnancy recognition signal. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 6, p. 412–420, 1997.
- BAZER, F. W.; WU, G.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 135-152, 2010.
- BEAL W. E.; HINSHAW, R. H.; WHITMAN, S. S. Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 241, 1998.
- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 3, p. 267-278, 2006.

BINELLI, M.; HAMPTON, J.; BUHI, W. C.; THATCHER, W. W. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 127-134, 1999.

BISHOP, C. V. Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, p. 138, 2013.

BONNETT, B. N.; MARTIN, S. W.; MEKK, A. H. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, n. 2-3, p. 205–220, 1993.

BOOS, A.; MEYER, W.; SCHWARZ, B. R.; GRUNERT, A. E. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 44, n. 1, p. 11-21, 1996.

BRAND, A.; AKABWAI, D. Some aspects of non-surgical embryo transfer in cattle. **Veterinary Science Communications**, v. 2, n. 1, p. 23-37, 1978.

BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; BURKE, C. R.; DAY, M. L. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3–4, p. 208–215, 2010.

BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; PATE, J. L.; OTT, T. L.; HANSEN, T. R.; DAY, M. L. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. **Animal Reproduction Science**, v. 133, p.16–26, 2012.

BRITO, C. P. de; OLIVEIRA, C. M. de; SOARES, F. A.; FAUSTINO, M.; OLIVEIRA, C. A. de. Immunohistochemical determination of estrogen receptor- α in vaginal and tumor tissues of healthy and TVT-affected bitches and their relation to serum concentrations of estradiol-17 β and progesterone. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1587-1592, 2006.

BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; BINELLI, M.; WALWORTH, E. S.; GUILLETTE JÚNIOR, L. J. Identification and characterization of proteins synthesized de novo and secreted by the reproductive tract of the American alligator, *Alligator mississippiensis*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 115, n. 2, p. 201-213, 1999.

BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M. Identification, characterization and localization of three proteins expressed by the porcine oviduct. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 225–238, 2003.

BUHI, W. C.; ALVAREZ, I. M.; PICKARD, A. R.; MCINTUSH, E. W.; KOUBA, A. J.; ASHWORTH, C. J. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and messenger ribonucleic acid by the oviduct of cycle, early-pregnant, and ovariectomized steroid-treated gilts. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 1, p. 7-15, 1997.

BUHI, W. C.; BAZER, F. W.; ALVAREZ, I. M.; MIRANDO, M. A. In vitro synthesis of oviductal proteins associated with estrus and 17 β -estradiol-treated ovariectomized ewes. **Endocrinology**, v. 128, n. 6, p. 3086-3095, 1991.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CÁRDENAS, H.; POPE, W. F. Distribution and changes in amounts of the androgen receptor in the pig uterus during the estrous cycle, early pregnancy and after treatment with sex steroids. **The Journal of Endocrinology**, v. 177, n. 3, p. 461-469, 2003.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. O. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 368-375, 2008.

CERBITO, W. A.; QUERO JÚNIOR, F. V.; BALAGAPO JÚNIOR, C. R.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. Spatial distribution of progesterone in bovine uterus in relation to corpus luteum location and function. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1663-1671, 1994.

CERBITO, W. A.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; TAKAGI, M.; SATO, K.; MIYAMOTO, A.; OHTANI, M. Comparison of bovine uterine horns for progesterone and oxytocin levels with bilateral corpus luteum. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 76, n. 3, p. 463-464, 1996.

CHARPIGNY G.; REINAUD P.; TAMBY J.P.; CREMINON C.; GUILLOMOT M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 5, p.1032-1040, 1997.

CHAVATTE-PALMER, P.; GUILLOMOT, M. Comparative implantation and placentation. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 64, n. 3, p. 166-174, 2007.

CHRISTIE, W. H.; NEWCOMB, R.; ROWSON, L. E. A. Embryo survival in heifers after transfer of an egg to the uterine horn contralateral to the corpus luteum and the effect of treatments with progesterone or hCG on pregnancy rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, n. 2, p. 701-706, 1979.

CICINELLI, E.; EINER-JENSEN, N.; CIGNARELLI, M.; MANGIACOTTI, L.; LUISI, D.; SCHONAUER, S. Preferential transfer of endogenous ovarian steroid hormones to the uterus during both the follicular and luteal phases. **Human Reproduction**, v. 19, n. 9, p. 2001-2004, 2004.

CLEMENTE, M.; De La FUENTE, J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J. F.; RIZOS, D.; LONERGAN P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 507-517, 2009.

DEAVER, S. E.; HOYER, P. B.; DIAL, S. M.; FIELD, M. E.; COLLIER, R. J.; RHOADS, M. L. Localization of ghrelin and its receptor in the reproductive tract of Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 150-157, 2013.

DEMETRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5073-5082, 2007.

EINER-JENSEN, N.; HUNTER, R. H. F. Counter-current transfer in reproductive biology. **Reproduction**, v. 129, n. 1, p. 9-18, 2005.

FERGUSON, C. E.; KESLER, D. J.; GODKE, R. A. Progesterone enhances *in vitro* development of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 108-114, 2012.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 9, p. 1195-1201, 2006.

FORDE N.; LONERGAN, P. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: What is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? **Journal Reproduction and Development**, v. 58, n. 2, p. 189-195, 2012.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 2, p. 266-278, 2011.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 4, p. 784-794, 2009.

FORDE, N.; MEHTA, J. P.; MINTEN, M.; CROWE, M. A.; ROCHE, J. F.; SPENCER, T. E.; LONERGAN, P. Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 124, 2012.

FORDE, N.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; SONG, G.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. **Physiological Genomics**, v. 41, n. 1, p. 53-62, 2010.

FROLOVA, A. I.; MOLEY, K. H. Glucose transporters in the uterus: an analysis of tissue distribution and proposed physiological roles. **Reproduction**, v. 142, n. 2, p. 211-220, 2011.

GARBARINO, E. J.; HERNANDEZ, J. A.; SHEARER, J. K.; RISCO, C. A.; THATCHER, W. W. Effect of lameness on ovarian activity in postpartum holstein cows. **Journal of Dairy Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4123-4131, 2004.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 84, n. 2, p. 437-446, 1988.

GAUVREAU, D.; MOISAN, V.; ROY, M.; FORTIER, M. A.; BILODEAU, J. F. Expression of prostaglandin E synthases in the bovine oviduct. **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 103-111, 2010.

GINTHER, O. J. Comparative anatomy of uteroovarian vasculature. In: _____. **Veterinary scope**. Michigan: Agricultural Division, The Upjohn Company, 1976. cap. 9, p. 9-10.

GINTHER, O. J.; DEL CAMPO, C. H. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: Cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 193-203, 1974.

GINTHER, O. J. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 550-564, 1974.

GREEN, M. P.; HUNTER, M. G.; MANN, G. E. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on d 5 of pregnancy in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 88, n. 1-3, p. 179-189, 2005.

HASLER, J. F. Bovine embryo transfer: are efficiencies improving? In: APPLIED REPRODUCTIVE STRATEGIES IN BEEF CATTLE, 2012, Pullman. **Proceedings...** Pullman: Bioniche Animal Health, Inc, 2012. p. 319-338.

HICKEY, D. K.; FAHEY, J. V.; WIRA, C. R. Mouse estrous cycle regulation of vaginal versus uterine cytokines, chemokines, α - β - defensins and TLRs. **Innate Immunity**, v. 19, n. 2, p. 121-131, 2013.

ING, N. H.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 3, p. 591-599, 1996.

KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 103-112, 2004.

KHATIB, H.; HUANG, W.; WANG, X.; TRAN, A. H.; BINDRIM, A. B.; SCHUTZKUS, B.; MONSON, R. L.; YANDELL, B. S. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 2238-2247, 2009.

KRISHNASWAMY, N.; DANYOD, G.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. A. Oxytocin receptor down-regulation is not necessary for reducing oxytocin- induced prostaglandin F(2 α) accumulation by interferon-tau in a bovine endometrial epithelial cell line. **Endocrinology**, v. 150, n. 2, p. 897-905, 2009.

LAMMING, G. E.; MANN, G. E. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2 α production in cows by progesterone and oestradiol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p. 69-73, 1995.

LAMOND, D. R.; DROST, M. Blood Supply to the Bovine Ovary. **Journal of animal science**, v. 38, n. 1, p. 106-112, 1974.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2223–2236, 2002.

LEDGARD, A. M.; MEIER, S.; PETERSON, A. J. Evaluation of the uterine environment early in pregnancy establishment to characterise cows with a potentially superior ability to support conceptus survival. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 6, p. 737-747, 2011.

LIN, P.; CHEN, F.; YANG, Y.; SONG, Y.; LI, X.; LAN, X.; IN, Y.; WANG, A. GRP78 expression and immunohistochemical localization in the female reproductive tract of mice. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1824-1829, 2012.

LOPES, A. S.; BUTLER, S. T.; GILBERT, R. O.; BUTLER, W. R. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1-2, p. 34-43, 2007.

MALAYER, J. R.; HANSEN, P. J.; BUHI, W. C. Effect of day of the oestrous cycle, side of the reproductive tract and heat shock on in-vitro protein secretion by bovine endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 84, n. 2, p. 567-78, 1988.

MAMO, S.; MEHTA, J. P.; FORDE, N.; MCGETTIGAN, P. ; LONERGAN, P. Conceptus-endometrium crosstalk during maternal recognition of pregnancy in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 1, p. 1-9, 2012.

MANSPEAKER, J. E.; HAALAND, M. A. Implementation of uterine biopsy in bovine reproduction: a practitioner's diagnostic tool. **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 1983.

MCCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; EINER-JENSEN, N. The structure of steroids and their diffusion through blood vessel walls in a counter-current system. **Steroids**, v. 43, n. 3, p. 293-303, 1984.

MCMILLAN, W. H.; PETERSON, A. J. Transuterine embryo migration in recipient cattle. **Theriogenology** v.51, n. 8, p.1577-1586, 1999.

MCNAUGHTAN, J. W.; SILCOX, R. W.; EGGETT, D. L.; ABEL, T.; YELLAND, R. J.; LINGARD, S.; COATES, S. The effect of prostaglandin inhibitor rates of heifer embryo transfer recipients. **Thesis submitted to the faculty of Brigham Young University**, Utah. 2004. 38 p.

MEAD J. R.; IRVINE, S. A.; RAMJI, D. P. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 80, n. 12, p. 753-769, 2002.

MEIKLE, A.; GARÓFALO, E. G.; RODRÍGUEZ-PIÑÓN, M.; TASENDE, C.; SAHLIN, L. Regulation by gonadal steroids of estrogen and progesterone receptors along the reproductive tract in female lambs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, n. 1, p. 161-169, 2001.

MEIKLE, A.; TASENDE, C.; RODRIGUES, M.; GAROFALO, E. G. Effects of estradiol and progesterone on the reproductive tract and on uterine sex steroid receptors in female lambs. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1105-1113, 1997.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 179-189, 2009.

MESQUITA, F. S.; ALEXANDRI, F. L. D.; SCOLARI, S. C.; MEMBRIVE, C. M. B.; PAPA, P. C.; CARDOSO, D.; MARTIN, I.; SALES, J. N. S.; WHELOCK, C. E.; EBERLIN, M. N.; BINELLI, M. Probing the uterine microenvironment through Systems Biology approaches. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 713-722, 2012.

MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; SCOLARI, S. C.; FRANÇA, M. R.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M.; PAPA, P. C.; BRESSAN, F. F.; MEIRELLES, F. V.; SILVA, L. A.; NOGUEIRA, G. P.; MEMBRIVE, C. M.; BINELLI, M. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. **Theriogenology**, v. 81, n. 6, p. 861-869, 2014.

MILLER, B. G.; MOORE, N. W.; MURPHY, L.; STONE, G. M. Early pregnancy in the ewe: effects of oestradiol and progesterone on uterine metabolism and on embryo survival. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 4, p. 279-288, 1977.

MILLER, J. G. A technique of endometrial biopsy in the bovine animal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 119, n. 896, 368-370, 1951.

MOOR, R. M.; ROWSON, L. E. A. Local maintenance of the corpus luteum in sheep with embryo transferred to various isolated portions of the uterus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 12, n. 3, p. 539-550, 1966.

MORAITIS S.; TAITZOGLOU, I. A.; TSANTARLIOTOU, M. P.; BOSCO, C. M.; KALDRIMIDOU, E.; SARATSIS, P. Involvement of the plasminogen activation system in cow endometritis. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 337-347, 2004.

MULLEN, M. P.; ELIA, G.; HILLIARD, M.; PARR, M. H.; DISKIN, M. G.; EVANS, A. C.; CROWE, M. A. Proteomic characterization of histotroph during the preimplantation phase of the estrous cycle in cattle. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 5, p. 3004-3018, 2012.

MURDOCH, W. J.; VAN KIRK, E. A. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. **Endocrinology**, v. 139, n. 8, p. 3480-3484, 1998.

NEWCOMB, R. CHRISTIE, W. B.; ROWSON, L. E. Fetal survival rate after the surgical transfer of two bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, n. 1, p. 31-36, 1980.

OHTA, Y.; SATO, T.; IGUCHI, T. Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the reproductive tract of adult female rats. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 1, p. 205-213, 1993.

OKUMU, L. A.; FORDE, N.; FAHEY, A. G.; FITZPATRICK, E.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; LONERGAN P. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 143–153, 2010.

PADUA, M. B.; HANSEN, J. P. Evolution and function of the uterine serpins (SERPINA14). **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 4, p. 265–274, 2010.

PEIPPO, J.; MACHATY, Z.; PETER, A. Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1373–1379, 2011.

PENNING, T. M.; BURCZYNSKI, M. E.; JEZ, J. M.; HUNG, C. F.; LIN, H. K.; MA, H.; MOORE, M.; PALACKAL, N.; RATNAM, K. Human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. **The Biochemical Journal**, v. 351, p. 67–77, 2000.

PERES, R. F. G.; CLARO, I.; SÁ FILHO, O. G.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 681–689, 2009.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; LUCY, M. C.; GREEN, J. A.; PARKS, T. E.; MACNEIL, M. D. ROBERTS, A. J.; GEARY T. W. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Proceedings of National Academy of Science of United States of America**, v. 102, n. 14, p. 5268–5273, 2005.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 684–689, 2007.

POPE, W. F.; MAURER, R. R.; STORMSHAK, F. Distribution of progesterone in the uterus, broad ligament, and uterine arteries of beef cows. **The Anatomical Record**, v. 203, n. 2, 245–250, 1982.

RE, G.; BADINO, P.; NOVELLI, A. Distribution of cytosolic oestrogen and progesterone receptors in the genital tract of the mare. **Research in Veterinary Science**, v. 59, n. 3, p. 214–218, 1995.

REESE, J.; BROWN, N.; PARIA, B. C.; MORROW, J.; DEY, S. K. COX-2 compensation in uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantation period. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 150, n. 1–2, p. 23–31, 1999.

REICHENBACH, H. D.; LIEBRICH, J.; BERG, U.; BREM, G. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, p. 363–370, 1992.

RIZNER, T. L.; PENNING, T. M. Role of aldo–keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. **Steroids**, v. 79, p. 49–63, 2014.

ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WATHES, D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 965-979, 2011.

SAGSÖZ, H.; AKBALIK, M. E.; SARUHAN, B. G.; KETANI, M. A. Localization of estrogen receptor α and progesterone receptor B in bovine cervix and vagina during the follicular and luteal phases of the sexual cycle. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 4, p. 262-271, 2011.

SALILEW-WONDIM, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M.; TESFAYE, D. Oviductal, endometrial and embryonic gene expression patterns as molecular clues for pregnancy establishment. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1-2, p. 9-18, 2012.

SATTERFIELD, M. C.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 2, p. 289-296, 2006.

SATTERFIELD, M. C.; GAO, H.; LI, X.; WU, G.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Select nutrients and their associated transporters are increased in the ovine uterus following early progesterone administration. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 1, p. 224-231, 2010.

SCANLON, P. F. Frequency of transuterine migration of embryos in ewes and cows. **Journal of Animal Science**, v. 34, n. 5, p. 791-794, 1972.

SCENNA, F. N.; EDWARDS, J. L.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N. Detrimental effects of prostaglandin F₂ Alpha on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v. 73, p. 215-226, 2004

SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; MEYER, H. H. Sequences of pituitary, ovarian and uterine hormone secretion during the first 5 weeks of pregnancy in dairy cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, p. 277-286, 1989.

SCHRAMM, W.; EINER-JENSEN, N.; SCHRAMM, G.; McCracken, J. A.; Local exchange of oxytocin from the vein to ovarian arteries in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 4, p. 671-680, 1986.

SEALS, R. C.; LEMASTER, J. W.; HOPKINS, F. M.; SCHRICK, F. N. Effects of elevated concentration of prostaglandin F₂alpha on pregnancy rates in progestogen supplemented cattle. **Prostaglandins & Other Lipids Mediators**, v. 56, n. 5-6, p. 377-389, 1998.

SEGERSON, E. C.; BAZER, F. W. High-molecular weight basic and acidic immunosuppressive protein components in uterine secretions of pregnant cows. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 6, p. 1014-1023, 1989.

SENGER, P. L. Early embryogenesis and maternal recognition of pregnancy. In: **Pathways to pregnancy and parturition**. 2nd ed., Pullman: Current Conceptions. cap. 13, 2003. p. 284-303.

SEO, K. S.; NAIDANSUREN, P.; KIM, S. H.; YUN, S. J.; PARK, J. J.; SIM, B. W.; PARK, C. W.; NANJIDSUREN, T.; KANG, M. H.; SEO, H.; KA, H.; KIM, N. H.; HWANG, S. Y.; YOON, J. T.; YAMANOUCHI, K.; MIN, K. S. Expression of aldo-keto reductase family 1 member C1 (AKR1C1) gene in porcine ovary and uterine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, p. 139, 2011.

SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–1530, 2006.

SHIMIZU, T.; KREBS, S.; BAUERSACHS, S.; BLUM, H.; WOLF, E.; MIYAMOTO, A. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. **Physiological Genomics**, v. 42A, n. 4, p. 290-300, 2010.

SIDDIQUI, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; ALMAMUN, M.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilisation and embryo development in heifers. **Reproduction**, v. 137, n. 4, p. 689–697, 2009.

SPENCER, T. E.; BAZER F. W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1527-1543, 1995.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13, 2004. Suplemento E4-E13.

SPENCER, T. E.; BECKER, W. C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M. A.; OGLE, T. F.; BAZER, F. W. Ovine interferon-t regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 3, p. 732-745, 1995.

SPENCER, T. E.; GRAY, A.; JOHNSON, G. A.; TAYLOR, K. M.; ARIEH GERTLER, A.; GOOTWINE, E.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1409-1418, 1999.

SPENCER T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 2-10, 2004.

SPENCER, T. E.; SANDRA, O.; WOLF, E. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 165-179, 2008.

SREENAN, J. M.; BEEHAN, D.; MULVEHILL, P. Egg transfer in the cow: factor affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, n. 1, p. 77-85, 1975.

SREENAN, J. M.; BEEHAN, D. Effect of site of transfer on pregnancy and twinning rates following bilateral egg transfer in cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 48, n. 1, p. 223-224, 1976.

STAPLES, L. D.; FLEET, I. R.; HEAP, R. B. Anatomy of the utero-ovarian lymphatic network and the composition of afferent lymph in relation to the establishment of pregnancy in the sheep and goat. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 64, n. 2, p. 409-420, 1982.

STEFANICZYK-KRZYMOWSKA, S.; SKIPOR, J.; GRZEGORZEWSKI, W.; WASOWSKA, B.; KRZYMOWSKI, T. Local increase of steroid hormone concentrations in blood supplying the uterus and oviduct in anaesthetized and conscious gilts. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 1, p. 35-41, 1994.

STEFANICZYK-KRZYMOWSKA, S.; SKIPOR, J.; GRZEGORZEWSKI, W.; WASOWSKA, B.; KRZYMOWSKI, T. Involvement of adrenoceptors in the ovarian vascular pedicle in the regulation of counter current transfer of steroid hormones to the arterial blood supplying the oviduct and uterus. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 5, p. 763-768, 1997.

STEFANICZYK-KRZYMOWSKA, S.; SKIPOR, J.; GRZEGORZEWSKI, W.; WASOWSKA, B.; KRZYMOWSKI, T. The local elevation of estrone and androstenedione concentrations in the blood supplying the oviduct and uterus on days 17-18 of the estrous cycle of the gilts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 1, p. 39-43, 1998.

TAKEUCHI, T.; YOSHIDA, M.; SHIMIZU, T.; ASANO, A.; SHIMOKAWA, T.; NABETA, M.; USUI, T. Differential expressions of toll-like receptor genes in the vagina of pregnant mice. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 5, p. 561-565, 2013.

TERVIT, H. R.; HAVIK, P. G.; SMITH, J. F. Egg transfer in cattle: Pregnancy rate following transfer to the uterine horn ipsilateral or contralateral to the functional corpus luteum. **Theriogenology**, v. 7, n. 1, p. 3-10, 1977.

ULBRICH, S. E.; FROHLICH, T.; SCHULKE, K.; ENGLBERGER, E.; WALDSCHMITT, N.; ARNOLD, G. J.; REICHENBACH, H. D.; REICHENBACH, M.; WOLF, E.; MEYER, H. H. D.; BAUERSACHS, S. Evidence for Estrogen-Dependent Uterine Serpin (SERPINA14) expression during estrus in the bovine endometrial glandular epithelium and lumen. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 795-805, 2009a.

ULBRICH, S. E.; SCHULKE, K.; GROEBNER, A. E.; REICHENBACH, H. D.; ANGIONI, C.; GEISSLINGER, G.; MEYER, H. H. D. Quantitative characterization of prostaglandins in the uterus of early pregnant cattle. **Reproduction**, v. 138, n. 2, p. 371-382, 2009b.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. [1-12], 2002. research0034.1-0034.11.

VASCONCELOS, J. L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307-314, 2001.

VELIÇA, P.; DAVIES, N.J.; ROCHA, P.P.; SCHREWE, H.; RIDE, J. P.; BUNCE, C. M. Lack of functional and expression homology between human and mouse aldo-keto reductase

1C enzymes: implications for modelling human cancers. **Molecular Cancer**, v. 8, p. 121, 2009.

VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W.; SIMOENS, P. Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in canine vaginal and vulvar tissue and their relation to sex steroid hormone concentrations. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 14, n. 3-4, p. 251-258, 2002.

WALLENHORST, S.; HOLTZ, W. Transfer of pig embryos to different uterine sites. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 9, p. 2327-2329, 1999.

WALSH, S. W.; YUTRZENKA, G. J.; DAVIS J. S. Local steroid concentrating mechanism in the reproductive vasculature of the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 20, n. 5, p. 1167-1171, 1979.

WANG, H.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1331-1340, 2000.

WEEMS, C. W.; LEE, C. N.; WEEMS, Y. S.; VINCENT, D. L. Distribution of progesterone to the uterus and associated vasculature of cattle. **Endocrinology Japon**, v. 35, n. 4, p. 625-630, 1988.

WEEMS, C. W.; WEEMS, Y. S.; LEE, C. N.; VINCENT, D. L. Progesterone in uterine and arterial tissue and in jugular and uterine venous plasma of sheep. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 1, p. 1-6, 1989.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P.; MIYAMOTO, A.; CERBITO, W.A.; ACOSTA, T. J.; TAKAGI, M.; SATO, K. Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow. **Theriogenology**, v. 46, n. 3, p. 1144-1158, 1998.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P.; MIYAMOTO, A.; CERBITO, W.A.; ACOSTA, T. J.; TAKAGI, M.; SATO, K. Oviductal progesterone concentration and its spatial distribution in cyclic and early pregnant cows. **Theriogenology**, v. 46, n. 7, p. 1149-1158, 1996.

WILLIAMS, B. L.; GWAZDAUSKAS, F. C.; PEARSON, R. E. The effect of day of the estrous cycle, location of ovulatory structure, and progesterone on in vitro bovine endometrial secretions. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 8, p. 2112-2118, 1992.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY J. R. The cow as an induced ovulator: Timed AI after synchronization of ovulation **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 170-185, 2014.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GUMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.

WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, n. 1, p. 3-9, 2003.

XIAO, C. W.; GOFF, A. K. Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 101-109, 1999.

YANG, Y.; JIN, Y.; LIN, P.; HU, L.; CUI, C.; LI, X.; LI, Q.; WANG, A. The expression and localization of LRF in the female reproductive tract of cycling mice throughout the estrous cycle. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, v. 34, n. 4, p. 313-322, 2013.

ZHAO, Y.; WILLIAMS, L. M.; HANNAH, L. T.; ROSS, A. W.; MCKELVEY, W. A. C.; ROBINSON, J. J. Oestrogen and progesterone receptor immunoreactivity and *c-fos* expression in the ovine cervix. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 2, p. 287-292, 1999.

ANEXO A– Hormonal manipulation protocol

(MESQUITA et al., 2014)

Schematic of the hormonal manipulation protocol used by Mesquita et al., (2014). BS, blood sampling; GnRH, administration of 1mg of buserelin acetate (Sincroforte; Ourofino) im; LF-LCL, large follicle-large CL; P4, progesterone-releasing device containing 1g of progesterone (Sincrogest; Ourofino); PGF, administration of 0.5mg of sodium cloprostenol im for both groups; PGF + BE, administration of 0.5mg of sodium cloprostenol (Sincrocio; Ourofino) im along with administration of 2mg of estradiol benzoate (Sincrodiol; Ourofino) im for the LF-LCL group only, whereas the SF-SCL group only received estradiol benzoate; SF-SCL, small follicle-small CL; Slaughter, end point for endometrial and CL tissue collection