

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

SAARA CAROLLINA SCOLARI

**Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial modula a
receptividade em bovinos**

**Pirassununga/SP
2015**

SAARA CAROLLINA SCOLARI

**Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial modula a
receptividade em bovinos**

Pirassununga

2015

SAARA CAROLLINA SCOLARI

**Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial modula a
receptividade em bovinos**

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Mario Binelli

De acordo: _____
Orientador(a)

Pirassununga

2015

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.3132
FMVZ

Scolari, Saara Carolina

Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial modula a receptividade em bovinos / Saara Carolina Scolari. -- 2015.
88 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadores: Prof. Dr. Mario Binelli.

1. Matriz extracelular. 2. Endométrio. 3. Remodelamento. 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: SCOLARI, Saara Carollina

Título: Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial modula a receptividade em bovinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese à minha amiga e companheira, minha filha
amada,*

Mariana!

*Que me fortalece a cada dia me dando a honra de ser sua mãe e
me ensinando a cada dia ser uma pessoa melhor!*

Obrigado pelo presente da sua existência,

Razão da minha luta e de toda a minha alegria!

Te Amo!

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me iluminar e me ajudar a seguir minha trajetória nesta linda profissão que tanto amo!

À minha filha Mariana, pela compreensão ao meu trabalho e carinho maior do mundo, meu estímulo para continuar!

À minha família, bem maior acima de qualquer outro, meu alicerce para todos os momentos, para vida toda!

Ao Professor Mario Binelli, por me proporcionar a oportunidade de fazer parte desta excelente equipe e expandir meus conhecimentos! Obrigada por toda paciência, compreensão e ensinamentos!

Aos professores do VRA de Pirassununga, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, Prof. Dr. Ed Hoffman, Prof. Dra. Annelise Traldi e Prof. Dra Eneiva Carla pela ajuda, paciência e ensinamentos sempre que necessários.

À Prof. Dra. Claudia Bertan, pelo auxílio em todos os experimentos, prontidão em sempre ajudar e ensinar assim como um exemplo a ser seguido!

Aos funcionários do VRA, João, Márcio, José Maria e Rildo pela ajuda, atenção e dedicação no manejo dos animais.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), pela convivência, trabalho em equipe, ensinamentos e infinita ajuda na conclusão deste trabalho.

RESUMO

SCOLARI, S. C. **Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial modula a receptividade em bovinos.** [Dynamic remodeling of endometrial extracellular matrix modulates embryo receptivity in cattle]. 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

A matriz extracelular do endométrio (ECM) é constituída por moléculas secretadas que compõem o microambiente celular e são ativadas ou suprimidas principalmente pelos hormônios esteróides ovarianos, estradiol (E_2) e progesterona (P_4) durante o ciclo estral. A identificação de genes envolvidos no remodelamento e receptividade pode levar à descoberta de importantes processos biológicos ligados ao sucesso gestacional. Os objetivos foram: 1. identificar a relação de diferentes tamanhos de folículos pré-ovulatórios (FPO) e corpo lúteo (CL) e de seus respectivos hormônios E_2 e P_4 com a expressão endometrial de genes associados com o remodelamento da ECM durante o período de pré-implantação; e 2. analisar a relação entre a expressão gênica de determinados componentes da ECM avaliada no dia 6 após inseminação artificial (IA) com sucesso gestacional. Para tal, dois experimentos foram realizados. No experimento 1, estudo 1 e estudo 2, 42 e 74 vacas Nelore (*Bos indicus*) adultas, respectivamente foram sincronizadas obtendo-se ao final dois grupos com distintos tamanhos FPO e CL conseqüentemente, distintas concentrações de E_2 no proestro e P_4 no diestro. Os grupos foram: Folículo Grande-CL Grande (FG-CLG; estudo 1, n=20; estudo 2, n=35) e Folículo Pequeno-CL Pequeno (FP-CLP; estudo 1, n=22; estudo 2, n=39). Amostras de tecido endometrial foram coletadas por biópsia no D0 (estro) e pós-mortem no D4 (estudo 1) e D7 (estudo 2). Concentrações de E_2 e P_4 foram mensuradas por radioimunoensaio (RIA) obtendo-se menores concentrações no grupo FP-CLP. No experimento 2, vacas adultas, Nelore (*Bos indicus*; n=33) foram sincronizadas utilizando um protocolo a base de prostaglandina F 2α ($PGF_{2\alpha}$) e observação de estro. As vacas foram inseminadas artificialmente (IA) e seis dias após, uma biópsia endometrial coletada. O diagnóstico de gestação foi realizado após 30 dias por meio de ultrasonografia (US) e então as vacas foram divididas em grupo Prenhe e Não-Prenhe (P e NP) para análise retrospectiva. Abundância de transcritos foi avaliada por sequenciamento (RNAseq) assim como qPCR em amostras de ambos experimentos. Realizaram-se também exames histológicos em amostras do D4 e D7 (estudo 2) para avaliação de colágeno total assim como espessura de fibras colágenas. Resultados determinaram uma maior abundância de transcritos relacionados ao remodelamento de MEC, em destaque $TGF\beta$, MMPs, TIMPs e colágenos em vacas pertencentes aos grupos NP e FP-

CLP. O mesmo foi observado para abundância de colágeno. No entanto, não observou-se diferença na relação entre fibras grossas e finas entre os tratamentos. Análises de correlação e regressão indicaram que folículos pré-ovulatórios de maior tamanho geram CL maiores e assim maiores concentrações de P_4 , a qual está negativamente associada à abundância de colágenos. Assim, de acordo com resultados aqui descritos, assume-se que a alteração da homeostase da MEC devido ao incremento na abundância de colágeno pode ser prejudicial à gestação em bovinos.

Palavras Chave: Matriz extracelular. Endométrio. Remodelamento.

ABSTRACT

SCOLARI, S. C. **Dynamic remodeling of endometrial extracellular matrix modulates embryo receptivity in cattle.** [Remodelamento dinâmico da matriz extracelular endometrial modula a receptividade em bovinos]. 2015. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The endometrial extracellular matrix (ECM) é build up of secretory molecules that make up the cellular microenvironment and suffer activation or suppression mainly by the ovarian steroid hormones, estradiol (E₂) and progesterone (P₄) during the estrous cycle. The identification of genes involved in endometrial remodeling and receptivity may reveal important biological processes linked to gestational success. The objectives were: 1. identify the relationship among preovulatory follicle (POF) size and corpus luteum (CL) and its respective hormones, E₂ and P₄ on the endometrial expression of genes related to extracellular matrix remodeling during the pre-implantation period; and 2. analyze the relationship between endometrial ECM gene expression evaluated on day 6 post artificial insemination (AI) with pregnancy outcome. For such, two experiments were carried on. On experiment 1, study 1 and study 2, 42 and 74, respectively, adult Nelore (*Bos indicus*) cows were synchronized aiming to manipulate the peri-ovulatory endocrine environment, obtaining at the end of the protocol, two groups with distinct pre-ovulatory follicle (POF) and corpus luteum (CL) sizes, leading to groups with distinct E₂ and P₄ concentrations. The groups were: Large Follicle/CL (LF/CL; study 1, n=20, study 2, n=35) and Small Follicle/Cl (SF/CL; study 1, n=22; study 2, n=39). Endometrial samples were collected by biopsy on D0 (Estrus) and post-mortem on D4 and on study 2 post-mortem on D7. P₄ and E₂ concentrations were measured by RIA with a significative difference between the groups, being lower hormonal concentrations in the SF-SCL group and higher concentrations in the LF-LCL group . In experiment 2, adult Nelore (*Bos indicus*) cows (n=33) were synchronized using a prostaglandin 2 α (PGF2 α) and heat detection based protocol. The cows were AI and six days after an endometrial biopsy was collected. Pregnancy diagnosis was performed on day 30 by ultrasound (US) examination and cows were divided into pregnant and non-pregnant (P vs. NP) groups for a retrospective analysis. Histology was performed on D4 and D7 samples for total collagen abundance as well as fiber thickness. Correlation and regression analysis indicate that larger preovulatory follicles as well as higher P₄ concentrations have a negative effect on collagen content. RNA-Seq analysis and confirmation by qPCR was performed on selected samples from experiment

1, study 2 and experiment 2. Comparison of mRNA levels of ECM components samples revealed higher levels of transcripts involved in ECM remodeling, highlighting TGF β , MMPs, TIMPs and collagens in NP cows when compared with P cows as well as in the SF-SCL compared to the LF-LCL group. The same was observed for collagen abundance. However, there was no difference between thin and thick collagen fibers between treatments. Correlation and regression analysis indicate that larger POF lead to larger CL and hence, higher P₄ concentrations, which has a negative effects on collagen abundance. Therefore, according to the results presented here, we can imply that an alteration in ECM homeostasis due to increased collagen abundance may be harmful to pregnancy in cows.

Key words: Extracellular matrix. Endometrium. Remodelling.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Receptividade Uterina	14
2.2	Regulação Hormonal da Receptividade Endometrial.....	16
2.3	Regulação Molecular da Receptividade Uterina	17
2.4	Remodelamento de Matriz Extracelular Endometrial (MEC).....	19
2.5	Colágenos	22
2.6	Metaloproteinases de Matrix (MMP), e Inibidores Teciduais de Metaloproteinases de Matrix (TIMP).....	23
2.7	Gelatinases – MMP2 e MMP9 27	
2.8	Metaloproteinases ADAMTS	28
3	REMODELAMENTO DINÂMICO DA MATRIZ EXTRACELULAR ENDOMETRIAL MODULA A RECEPTIVIDADE EM BOVINOS	45
4	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31
	APÊNDICE	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

O insucesso gestacional é o fator que, isoladamente, mais influencia a produtividade e a lucratividade de um rebanho bovino. Dessa forma, o insucesso gestacional ainda é alvo de intensas pesquisas devido à baixa eficiência reprodutiva na maioria das explorações pecuárias a qual se dá devido às altas taxas de perdas embrionárias (DISKIN; MORRIS, 2008).

Apesar do vasto conhecimento alcançado nos diferentes ramos da fisiologia da reprodução bovina, os mecanismos moleculares da biologia uterina durante a fase inicial de gestação permanecem pouco estudados. Sabe-se, por exemplo, que a partir de taxas médias de fertilização de 90% e de natalidade de 55%, os índices de mortalidade embrionária atingem 40% em vacas, ocorrendo em sua maior parte entre os dias 8 e 16 após a inseminação artificial (SREENAN; DISKIN, 1983; HUMBLLOT, 2001; DISKIN; MORRIS, 2008). Durante tal período, o embrião é inteiramente dependente do ambiente intra-uterino em que se encontra.

Deve-se lembrar que o estabelecimento e manutenção da gestação são eventos complexos que requerem sintonia entre a receptividade uterina da fêmea e a capacidade do embrião em se desenvolver nas tubas uterinas e no útero (CARSON et al., 2000; LIM et al., 2002; WOLF et al., 2003). Assim, o insucesso da gestação pode ser atribuído a uma incompetência intrínseca ao embrião, à inadequada receptividade endometrial ou a ambos. A presente tese focará em aspectos relacionados ao endométrio.

O entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pela sobrevivência embrionária e consequente implantação é essencial para o desenvolvimento de técnicas que resultem na diminuição das perdas embrionárias e melhore as taxas de gestação em bovinos, levando, conseqüentemente um melhor aproveitamento do desempenho reprodutivo da fêmea bovina. Contudo, há limitada informação relacionada à identidade das moléculas sintetizadas e secretadas pelo endométrio na primeira semana de gestação e que podem potencialmente estar associadas com a taxa de concepção. Apesar de variados estudos demonstrarem a expressão gênica diferencial do endométrio em diferentes fases do ciclo estral ou mesmo na gestação inicial, tais estudos em sua maioria abordam a fase luteal tardia durante o ciclo ou em torno do reconhecimento materno da gestação.

Evidencia-se então, a importância da investigação da expressão gênica endometrial durante o período de receptividade uterina, mais especificamente na primeira semana de

gestação na busca de informações sobre o controle molecular e sua relação ao sucesso gestacional.

Visando aumentar o entendimento de tais processos, em nosso laboratório, utilizou-se a abordagem de sequenciamento de transcritos (RNAseq) e análise por bioinformática em amostras endometriais de vacas Nelore (*Bos indicus*) coletadas na primeira semana pós-estro. O primeiro experimento baseou-se na determinação da diferença da ativação gênica endometrial entre vacas com folículo pré-ovulatório (POF) e corpo lúteo (CL) maiores (grupo Folículo grande-corpo lúteo grande, FG-CLG) ou menores (grupo Folículo pequeno-corpo lúteo pequeno, FP-CLP) e, conseqüentemente, ambientes endócrinos periovulatórios diferenciados devidos às distintas concentrações de hormônios esteróides, estradiol (E₂) e progesterona (P₄) (MESQUITA et al., 2015 no prelo)¹. O segundo experimento teve como objetivo a diferenciação da composição gênica endometrial entre vacas prenhes e não prenhes (P vs. NP) (BINELLI et al., 2015). Após as análises, determinou-se que um dos processos biológicos endometriais mais proeminentes em vacas com FP-CLP e o de maior relevância em vacas NP foi o de remodelamento de matriz extracelular (MEC) endometrial.

Desde o período inicial da gestação, os tecidos embrionários e endometrial passam por um extensivo processo de remodelamento coordenado por enzimas proteolíticas como MMPs, ADAM, ADAMTS e seus inibidores, TIMPS (SPENCER et al., 2004). Estudos em mulheres e camundongos evidenciaram a importância do equilíbrio entre tais enzimas no endométrio durante o processo de decidualização e sucesso gestacional (LALA; CHAKRABORTY, 2003; KNOFLER, 2010; WHITE; SALAMONSEN, 2004), comprovando que, uma expressão ou distribuição aberrante de componentes de MEC no endométrio está associado a uma inapropriada receptividade uterina, preeclampsia e invasão de tumores endometriais (GRAESSLIN et al., 2006; COCKLE et al., 2007; LOCKWOOD et al., 2008; BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

O remodelamento de MEC endometrial é essencial para a fusão do embrião ao epitélio luminal assim como para a ativação e liberação de citocinas e fatores de crescimento armazenados no estroma endometrial (HASHIZUME, 2007). De fato, a relevância do remodelamento da MEC endometrial tem sido bem documentada em outras espécies, porém vagamente descrita em bovinos. Além disso, a maioria das publicações nesse tópico possuem como principal foco o período em que ocorre implantação embrionária (YAMADA et al.,

¹ MESQUITA, F. et al. he receptive endometrial transcriptomic signature indicates an earlier shift from proliferation to metabolism at early diestrus in the cow . BOR, 2015. (No prelo)

2002; HIRATA et al., 2003; KIZAKI et al., 2008; MISHRA et al., 2010; ULBRICH et al., 2011; MISHRA et al., 2012a, b; MISHRA et al., 2013). Assim, o estudo apresentado nesta tese possui ampla relevância no entendimento do comportamento biológico da MEC endometrial de bovinos durante o período inicial da gestação. Conforme nosso conhecimento, não existem outros trabalhos que retratem tais alterações de transcritos entre animais com maior ou menor receptividade.

Formulou-se portanto a hipótese geral de que alterações no remodelamento de MEC endometrial, ou seja, um aumento no grau de remodelamento no período de receptividade uterina possui um efeito negativo sobre o sucesso gestacional.

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o processo de remodelamento de MEC endometrial durante a primeira semana pós-estro em vacas de corte. Para tal, a presente tese contém dois capítulos sendo o primeiro capítulo composto por uma revisão de literatura. O segundo capítulo apresenta um estudo sobre a influência de um ambiente endócrino periovulatório contendo maiores ou menores concentrações de P_4 e E_2 durante a primeira semana pós-estro sobre a abundância de transcritos ligados ao remodelamento de matriz extracelular endometrial assim como abundância de colágeno no tecido endometrial. Também foi estudada a influência de genes ligados ao remodelamento de matriz extracelular endometrial sobre a receptividade uterina em vacas prenhe ou não prenhe.

O segundo capítulo será submetido com o título “Dynamic Remodeling of Endometrial Extracellular Matrix Modulates Embryo Receptivity in Cattle” e encontra-se na íntegra no apêndice A da tese.

2 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

A gestação é um evento extremamente complexo como um todo, no entanto, o estabelecimento da gestação, durante sua primeira semana é algo que requer uma perfeita modulação gênica uterina. Sendo este período tão crítico para o sucesso da gestação, é essencial o conhecimento de alguns aspectos estruturais e moleculares ligados ao remodelamento da matriz extracelular, fator importante para o acolhimento do embrião.

Após a fertilização e trânsito pelo oviduto, o embrião bovino adentra o útero entre os dias 4 e 5 após estro no estágio de mórula, porém o processo de implantação somente ocorre entre os dias 20 e 21 do ciclo (EL-BANNA et al., 1970). Durante o período de pré-implantação o embrião requer um ótimo ambiente intra-uterino para seu desenvolvimento, uma vez que ainda não há nutrição hematotrófica estabelecida entre o embrião e o endométrio (BURTON et al., 2002).

O processo de implantação em bovinos é do tipo não-invasiva (placenta sinepiteliocorial) e ocorre após um longo período de pré-implantação durante o qual ocorre a maioria das mortes embrionárias (BURGHARDT et al., 2002; ROSENFELD, 2008). Assim, durante tal período, o epitélio glandular uterino seletivamente sintetiza e secreta no lúmen uterino substâncias tais como proteínas de transporte de nutrientes, íons, citocinas, enzimas, vitaminas, hormônios dentre outras, essenciais para a sobrevivência embrionária (ROBERTS e BAZER, 1988; BAZER et al., 2013). O conjunto de tais moléculas é denominado “histotrofo”. O remodelamento da MEC endometrial é essencial para alterações estruturais que levam à liberação e/ou ativação de citocinas, fatores de crescimento e outros fatores presentes no histotrofo (POLETTE et al., 1994; SALAMONSEN et al., 1995; DAS et al., 1997). Tais alterações na complexa arquitetura do endométrio ocorrem em resposta às oscilações dos hormônios esteróides ovarianos (SALAMONSEN, 1994). Na presente revisão, serão discutidos tópicos relacionados à matriz extracelular endometrial e sua relevância na receptividade uterina em vacas de corte.

2.1 RECEPTIVIDADE UTERINA

Receptividade uterina se refere ao estado adequado do endométrio para receber, nutrir e abrigar o embrião até sua implantação (SWIERZ; GIUDENCE, 1997), englobando uma seqüência única de eventos propícios à adaptação do embrião ao micro-ambiente uterino (BERGH; NAVOT, 1992). Assim, torna-se essencial a compreensão dos eventos relacionados à receptividade endometrial e que estão diretamente ligados à fertilidade.

O útero bovino é composto pelo miométrio ou túnica muscularis e pelo perimétrio ou túnica serosa. O revestimento interior de fino tecido é denominado endométrio, um tecido de alta complexidade que reveste o interior da cavidade uterina. O endométrio é morfológicamente dividido nas camadas funcional e basal. A camada funcional possui diferentes compartimentos celulares: o epitélio luminal, epitélio glandular, estroma e compartimento vascular. O epitélio é composto por células localizadas na superfície ou ao redor das glândulas e o estroma consiste basicamente de MEC e fibroblastos (BAUERSACHS et al., 2005).

Em relação à sua função, a camada funcional é responsável pela proliferação, secreção e degeneração tecidual, enquanto a camada basal possui a capacidade regenerativa (DIEDRICH et al., 2007).

O endométrio também é subdividido em regiões caruncular e inter-caruncular. Uma de suas funções é prevenir a adesão das paredes opostas do miométrio, mantendo assim a cavidade uterina. O endométrio é o mais importante componente na comunicação materno-embriônica e no sucesso da gestação (BAUERSACHS et al., 2005).

Durante o ciclo estral, o útero passa por uma metódica re-organização para atender às necessidades do concepto em desenvolvimento. A síntese e secreção glandular de histotrofo, composto por citocinas, fatores de crescimento e proteínas, dentre outros fatores, essenciais para a sobrevivência embrionária proporcionam nutrição assim como um mecanismo de comunicação entre o ambiente materno e o concepto através de trocas de moléculas de sinalização e fatores de crescimento (SPENCER et al., 2004; HUGENTOBLER et al., 2008).

A expressão gênica das diferentes células endometriais é regulada primariamente de maneira endócrina pelos hormônios esteróides ovarianos, P₄ e E₂, responsáveis pelas alterações cíclicas pelas quais o útero é submetido durante o ciclo estral e que são de extrema

importância para o sucesso gestacional (FORDE et al., 2011). Assim, a expressão de genes ligados à receptividade uterina é induzida ou reduzida de acordo com níveis hormonais, sendo a P_4 o principal hormônio responsável pela preparação do endométrio para implantação embrionária e manutenção da gestação (BAZER et al., 2008).

Estudos em mulheres determinaram a expressão ou supressão de genes específicos presentes no endométrio durante o período de janela de implantação, o que está diretamente relacionado às chances de estabelecimento da gestação (NEJAT et al., 2014; VON GROTHUSEN et al., 2014). Assim, uma expressão gênica aberrante durante o crítico período de receptividade uterina pode levar à infertilidade (TABIBZADEH; BABAKNIA, 1995; TAPIA et al., 2008).

2.2 REGULAÇÃO HORMONAL DA RECEPTIVIDADE UTERINA

É indispensável lembrar que genes envolvidos nos processos reprodutivos estão sob a constante influência de oscilações hormonais, ressaltando em sua maior importância a progesterona (P_4) e estradiol (E_2). A P_4 em vacas é o principal hormônio regulador das funções endometriais na fase inicial da gestação, ou seja, antes do período de reconhecimento materno (BAZER et al., 1979; SPENCER et al., 2004; SPENCER et al., 2007). A P_4 exerce um papel fundamental na regulação do ciclo estral agindo através de receptores de P_4 permitindo assim uma direta regulação de uma série de genes. Desta forma, é também essencial no estabelecimento e manutenção da gestação por intermediar as interações entre embrião e endométrio (HUMBLLOT, 2001).

Tal fato foi evidenciado por Demetrio et al. (2007), que observaram uma associação positiva entre a concentração plasmática de progesterona medida sete dias após a inseminação e a probabilidade de concepção em vacas de leite de alta produção. Maiores concentrações de P_4 entre dias 2 e 5 do ciclo intensificam o desenvolvimento e tamanho do concepto em novilhas (GARRETT et al., 1988), enquanto animais com menores concentrações de P_4 na fase luteínica inicial apresentam um desenvolvimento embrionário comprometido (NEPHEW et al., 1991; MANN; LAMMING 2001).

O uso de P_4 exógena exerce efeitos de relaxamento da musculatura uterina e há a hipótese de que a suplementação de P_4 antes da transferência de embriões leva a uma melhora na

receptividade e maior sucesso gestacional (DE ZIEGLER et al., 1998). Relatos confirmam esta positiva relação entre níveis de P₄ e sucesso gestacional em vacas (HENRICKS et al., 1971; LAMMING; DARWASH, 1998; CARTER et al., 2009).

A P₄ age no tecido uterino tanto para a estimulação do crescimento do blastocisto no período de pré-implantação e alongamento quanto para a regulação de genes envolvidos em tais eventos (MANN; LAMMING, 2001). Além disso, outro estudo também revelou um aumento do crescimento de blastocisto nos dias 9 e 12 acompanhado por alterações na expressão de genes envolvidos no sistema de WNT endometrial devido ao tratamento precoce com P₄ (SATTFIELD et al., 2008). Em um estudo subsequente, Satterfield et al. (2009) utilizaram a técnica de microarranjo para identificar os mecanismos pelos quais a P₄ age no endométrio e desenvolvimento do concepto. Os resultados mostraram vias metabólicas diferencialmente reguladas no dia 9 e 12 de gestação em vacas suplementadas ou não com P₄, sendo vias de maior importância relacionadas à atividade de transporte de solutos e fatores estimuladores de proliferação, migração e adesão celular (SATTFIELD et al., 2009).

Genes induzidos pela P₄ tem sido amplamente investigados em camundongos e humanos e englobam fatores de transcrição e crescimento, genes de morfogênese, hormônios peptídeos, moléculas de matriz extracelular e de adesão celular e inibidores de enzimas e proteases (BAGCHI et al., 2003). Assim, é possível identificar uma modulação cíclica da expressão de genes ligados ao processo de remodelamento de MEC endometrial como as MMPs, TIMPs e SLRPs (Small leucine-rich proteoglycans) regulada pelos hormônios esteróides ovarianos (VASSILEV et al., 2005; SALGADO et al., 2011). Um estudo realizado com camundongos apontou que, distúrbios no níveis destes hormônios e expressão de receptores de P₄ no útero de animais diabéticos leva a alterações na composição da MEC (FAVARO et al., 2013).

Assim, evidenciando a importância dos hormônios esteróides ovarianos na fertilidade em bovinos, é essencial investigar sua influência na manutenção e remodelamento da MEC.

2.3 REGULAÇÃO MOLECULAR DA RECEPTIVIDADE UTERINA

O endométrio receptivo pode ser caracterizado pela expressão de genes responsáveis pela resposta do endométrio ao embrião e que permita que ocorra sua implantação (SHARKEY; SMITH, 2003). O entendimento das alterações moleculares que ocorrem

durante o período de receptividade endometrial pode ajudar a desenvolver marcadores moleculares associados com a receptividade endometrial e sucesso da gestação. Tais estudos ainda são escassos em bovinos e outros ruminantes.

Técnicas de análise de expressão gênica global tais como microarranjos e sequenciamento de transcritos tem proporcionado relevantes informações a respeito da receptividade endometrial a nível molecular em bovinos (SALILEW-WONDIM et al., 2010; FORDE et al., 2011; FORDE et al., 2012).

Estudos têm demonstrado diferenças na expressão de transcritos em diferentes fases do ciclo estral nas diversas espécies, principalmente em humanos e camundongos (HAOUZI et al., 2009; TAPIA et al., 2011). Em camundongos, marcadores bioquímicos da receptividade endometrial incluem moléculas de adesão e anti-adesão endometrial, citocinas e fatores de crescimento endometriais (WANG; DEY, 2006).

Em humanos, na busca de critérios diagnósticos precisos, desenvolveu-se uma classificação para receptividade endometrial utilizando um perfil de transcriptoma endometrial (PONNAMPALAM et al., 2004; TALBI et al., 2005). Baseando-se na grande quantidade de informações geradas em referência à regulação e desregulação de genes envolvidos com a receptividade endometrial, foi desenvolvida uma ferramenta direcionada à identificação de um endométrio receptivo tendo como base a assinatura transcriptômica. Esta ferramenta chamada de “endometrial receptivity array” (ERA) e consiste em 238 genes expressos em diferentes estágios do ciclo endometrial definindo assim uma assinatura transcriptômica da receptividade endometrial em humanos (DÍAZ-GIMENO et al., 2011). Uma grande parte destes genes estão ligados ao processo de remodelamento da MEC, como por exemplo TIMP3, ADAM12, ADAMTS 1, 2 e 4, THBS2, VCAM, SPP1 dentre outros. Assim, resultados indicam que alterações estruturais como o remodelamento de matriz extracelular e moleculares são essenciais para que o ambiente uterino se torne receptivo ao embrião em estágio de blastocisto (ACHACHE e REVEL, 2006). Sabe-se que inúmeros comprometimentos ginecológicos em mulheres como infertilidade e perda recorrente da gestação estão associados a uma inapropriada expressão ou distribuição de componentes da MEC no estroma endometrial (JOKIMAA et al., 2002).

O avanço nas pesquisas em biologia molecular tem tornado possível catalogar genes envolvidos nos eventos reprodutivos, e agora à característica receptiva, também em animais de produção. Foram revelados importantes processos biológicos e genes que podem influenciar as interações conceito-maternas durante o período de peri-implantação e assim, o

sucesso da gestação. Estudos com enfoque em transcriptoma endometrial em bovinos foram realizados para se obter aprimoramento no conhecimento molecular do sistema reprodutivo durante o ciclo estral nesta espécie (BAUERSACHS et al., 2005; MITKO et al., 2008; FORDE et al., 2011). Estes estudos revelaram centenas de genes diferentemente expressos (DEG) entre as fases do ciclo estral. No estudo realizado por Mitko et al. (2008), dois grandes grupos de genes apresentaram perfis distintos, entre as fases folicular e luteínica. De acordo com as análises de Ontologia Gênica, durante a fase folicular vias relacionadas ao remodelamento de matriz extracelular, transporte, morfogênese e crescimento celular estavam enriquecidas, enquanto durante a fase luteínica as vias enriquecidas estavam relacionadas à resposta imune e metabolismo.

Da mesma forma, em trabalhos realizados por nosso grupo, diferenciando vacas com maior e menor fertilidade (BINELLI et al., 2015) e com um ambiente periovulatório e caracterizado por diferentes níveis hormonais (MESQUITA et al., 2015; submetido), observou-se também perfis distintos entre os grupos, sendo o mais proeminente quanto à vias relacionadas ao remodelamento da MEC, que foi alvo desta tese.

2.4 REMODELAMENTO DE MATRIZ EXTRACELULAR ENDOMETRIAL (MEC)

A MEC é o componente não celular presente em todos os tecidos e órgãos que proporciona suporte físico para os constituintes celulares essenciais para o início da morfogênese, diferenciação. A MEC está em constante processo de remodelamento para manter a homeostase tecidual (JARVELAINEN et al., 2009).

A MEC é composta por moléculas secretadas que constituem o microambiente celular, composto por três principais classes de biomoléculas: proteínas estruturais (colágenos e elastina), proteínas especializadas (fibrilinas, fibronectinas e lamininas) e proteoglicanas (ALBERTS et al., 2004; KIM et al., 2011). A MEC exerce basicamente duas funções: estrutural, preenchendo os espaços extracelulares dos tecidos e de interação entre as células, mediando adesão, crescimento, migração e diferenciação celular. Adicionalmente a MEC abriga fatores de crescimento, citocinas e enzimas de degradação, além de peptídeos presentes nas criptas endometriais, que são expostos pela ação das peptidases, podendo, portanto, modular a fisiologia e morfologia celular (SCHENK; QUARANTA, 2003; MOTT; WERB,

2004; JARVELAINEN et al., 2009). Isto é possível através da ligação de fatores de crescimento, colágeno e proteoglicanas à receptores de superfície celular, estimulando a transdução de sinal e regulando a transcrição gênica (XIAN et al., 2010).

Embora fundamentalmente composta em sua maior parte por água, proteínas e polissacarídeos, cada tecido possui uma MEC com uma composição exclusiva e topologia gerada através da interação entre os vários componentes celulares. Composta por uma complexa rede de matriz proteica fibrosa, a MEC mantém um arranjo celular que mantém determinada forma e polaridade, além de proporcionar o desenvolvimento e a estabilização de vasos sanguíneos (XIAN et al., 2010). Ademais, a MEC é uma estrutura altamente dinâmica que está em constante remodelamento por via enzimática ou não enzimática e seus componentes moleculares estão sempre sujeitos à uma série de modificações pós-translacionais (SCHMIDT; FRIEDL, 2010).

Existem dois tipos principais de MEC: a de matriz de tecido conjuntivo intersticial e a de membrana basal, uma forma especializada de MEC, a qual separa o epitélio do estroma circundante e controla a organização das células e a diferenciação através de interações com receptores da superfície de células e proteínas de MEC. A matriz intersticial circunda as células e é composta principalmente de colágeno tipo I e fibronectina, que fornecem a base estrutural para os tecidos. Em contraste, a membrana basal é mais compacta do que a matriz intersticial e consiste principalmente de colágeno tipo IV, lamininas, proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPGs) e proteínas que são sintetizadas e segregadas por células epiteliais, células endoteliais e subjacentes miofibroblastos que expressam integrinas (LU et al., 2012).

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante na MEC constituindo até 30% de toda massa proteica, proporcionando força tênsil, migração e quimiotaxia, regulando adesão celular e regulando desenvolvimento tecidual (ROZARIO; DESIMONE, 2010).

Proteoglicanas (PGs), como aggrecan, versican e decorin, são proteínas ligadas às cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) e são intercaladas entre as fibras de colágeno. PGs preenchem o espaço intersticial extracelular e possuem funções de hidratação sequestrando água dentro do tecido. A expressão de versican tem sido relacionada à progresso de tumores em cancer cervical, de mama, de pulmão e melanoma (SUWIWAT et al., 2004; GAMBICHLER et al., 2008; KISCHEL et al., 2010). O aumento na expressão de versican leva a uma diminuição na adesão célula-MEC promovendo assim a invasão tumoral e metástase (SAKKO et al., 2001).

Glicoproteínas, como lamininas, elastina, fibronectinas e thrombospondinas possuem diversas funções na estrutura da MEC assim como na interação célula-MEC, atuando como ligantes para receptores da superfície celular tais como as integrinas. As glicoproteínas também atuam como um reservatório de fatores de crescimento ligados à MEC e que podem ser secretados após a proteólise (PIRINEN et al., 2005).

A MEC permite uma série de eventos de sinalização através de receptores de superfície celular de fatores de crescimento e moléculas de adesão. As proteínas e estrutura da MEC podem determinar o comportamento, polaridade, migração, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular através da comunicação com o citoesqueleto intracelular e transmissão de sinais dos fatores de crescimento (KIELTY et al., 2002). Desta forma, a MEC possui função essencial na arquitetura e homeostase uterina.

Por sua natureza, a MEC está constantemente passando por mudanças em resposta a diferentes estímulos celulares. É um processo essencial para as funções endometriais fisiológicas estabelecendo a receptividade endometrial, implantação e manutenção da gestação. Estudos de microarranjo demonstraram que aproximadamente 560 genes diferencialmente expressos no útero de camundongos estão envolvidos na manutenção e regulação da integridade da MEC (HELVERING et al., 2005; COX; HELVERING, 2006). No entanto, qualquer alteração no equilíbrio entre os diferentes componentes da MEC leva a mudanças na arquitetura do tecido. Alterações no remodelamento da MEC estão associadas a características histológicas anormais (STENBACK, 1989) e anormalidades na implantação (SKINNER et al., 1999).

O processo de remodelamento se resume a dois eventos: síntese e deposição de componentes da MEC e sua quebra proteolítica. Várias proteases estão envolvidas na degradação proteolítica da MEC, porém as mais proeminentes são as membro da família das matrix metalloproteinases (MMP), a disintegrin and metalloproteinases (ADAM) e seus inibidores, tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) (REISS; SAFTIG, 2009; EGEBLAD et al., 2010).

Considerando-se que a maior parte das perdas embrionárias ocorre no período de pré-implantação uterina, vale a pena enfatizar a importância do remodelamento da matriz extracelular endometrial para a receptividade uterina, como já descrito em humanos e roedores (FARRAR; CARSON, 1992; CLARK et al., 1993; DAS et al., 1997; HURST; PALMAY, 1999). Como já descrito, a expressão de transcritos relacionados ao remodelamento de matriz endometrial pode ser influenciada por uma série de estímulos,

incluindo o efeito dos hormônios esteroides. A oscilação dos mesmos possui provavelmente um significativo impacto sob a receptividade endometrial e consequente manutenção da gestação.

Uma análise do transcriptoma endometrial pode proporcionar uma visualização das alterações de expressão, complementando o entendimento das alterações temporais endometriais facilitando assim o entendimento do diálogo entre o endométrio e conceito no período pré-implantação. Similarmente, a identificação de genes que estão envolvidos no remodelamento e receptividade endometrial pode revelar importantes processos biológicos envolvidos no sucesso gestacional. Esta identificação e entendimento são essenciais para que se possam desenvolver métodos de identificação de receptividade e fertilidade em animais, visando um melhor aproveitamento da carga genética e valor econômico dos mesmos.

No endométrio de humanos as MMPs são vitais para o remodelamento e reparação durante todo o ciclo menstrual (SALAMONSEN; WOOLLEY, 1999). Já em bovinos, o processo de remodelamento da MEC ainda é vagamente definida, especialmente no período inicial da gestação. No entanto, sabe-se que bovinos possuem uma placentação não invasiva e assim, apesar de um grau moderado de remodelamento da matriz extracelular endometrial comparado à humanos e camundongos, é ainda essencial para o sucesso gestacional (WOESSNER, 1991). O remodelamento da matriz é fundamental tanto para promover alterações estruturais quanto para a liberação e/ou ativação de citocinas relacionadas ao correto funcionamento do útero gestante (GOLDBERG et al., 1992; DAS et al., 1997).

Assim, a finalidade deste estudo foi identificar o comportamento de transcritos envolvidos no remodelamento de MEC endometrial de vacas nelore perante diferentes concentrações de estradiol no proestro e estro e progesterona no diestro assim como a expressão de tais transcritos no período inicial da gestação, 6 dias após a inseminação artificial.

Preconiza-se nesta tese evidenciar que, vacas com um maior potencial reprodutivo possuem uma expressão diferenciada de genes codificantes para um ambiente intrauterino mais receptivo ao embrião que vacas com um perfil sub-fértil. Os principais componentes da MEC serão descritos a seguir.

2.5 COLÁGENOS

Colágenos são os principais elementos estruturais da MEC e contribuem para manter a estabilidade e a integridade estrutural dos tecidos. A família dos colágenos é constituída de 28 membros envolvidos na formação de fibras colágenas (colágenos tipos I, II, III, V e XI), redes de colágenos (colágeno tipo IV) ou filamentos (colágeno tipo VI) (GELSE et al., 2003; RICARD-BLUM, 2011).

O colágeno tipo IV (col-IV) é abundante na lâmina densa de todas as membranas basais. Identificado como o primeiro colágeno não envolvido na formação de fibras, proporciona suporte estrutural, regulação de adesão, migração e sobrevivência das células (SCHWARZBAUER, 1999). Ao contrário de outros tipos de colágeno, as cadeias de polipeptídeos de COL tipo IV são codificadas por seis genes diferentes (COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5 e COL4A6) (CUTTING et al., 1988; MOMOTA, 1998).

Este tipo de colágeno exerce um importante papel na angiogênese, formação e estruturação glandular, integração e estabilização estrutural da arquitetura dos tecidos. Em humanos o colágeno tipo IV apresenta maior abundância durante a fase proliferativa porém com mínima expressão durante a fase secretória no endométrio (APLIN et al., 1988; TANAKA et al., 2009). Colágeno tipo IV regula o remodelamento do epitélio endometrial proporcionando viabilidade e diferenciação celular durante o ciclo menstrual (TANAKA et al., 2009).

Dependendo do tecido, colágenos podem diferir em comprimento, diâmetro e espessura. Isto é provavelmente determinado pelo microambiente no qual este será segregado. Especificamente, proteoglicanas, glicosaminoglicanas e proteínas matricelulares interagem com fibrilas em formação e recém-formadas podendo afetar o tamanho, forma e organização da matriz de colágeno (RASPANTI et al., 2008; BORNSTEIN, 2009).

Em cabras, o colágeno tipo I encontra-se amplamente distribuído por todo estroma uterino durante o período de pré-implantação, diminuindo significativamente durante o processo de implantação (GUILLOMOT, 1999).

Estudos em vacas apontaram uma diminuição no colágeno tipo IV da membrana basal epitelial durante a fase inicial da gestação (YAMADA et al., 2002), assim como colágeno tipo I, onde observou-se uma mudança na composição das fibras de colágeno de grossas e densas para finas, indicando sua participação no processo de remodelamento endometrial durante o período de pré-implantação. Tais evidências sugerem a regeneração de colágeno tipo I para

que ocorra a formação das criptas maternas, essenciais para a interação materno-fetal durante o processo de placentação (YAMADA et al., 2002).

O aumento anormal da deposição de colágeno pode prejudicar a função uterina, possivelmente interferindo com a vascularização ou retardando eventos de remodelamento (BLANKENSHIP; GIVEN, 1995).

2.6 METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPS) E INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES DE MATRIZ (TIMPS)

O sistema MMP/TIMP é essencial no controle da quebra dos componentes da MEC e assim no seu remodelamento. Estas enzimas estão envolvidas em uma série de processos reprodutivos tais como desenvolvimento embrionário, morfogênese de órgãos, crescimento, diferenciação e migração celular (CURRY; OSTEEEN, 2003).

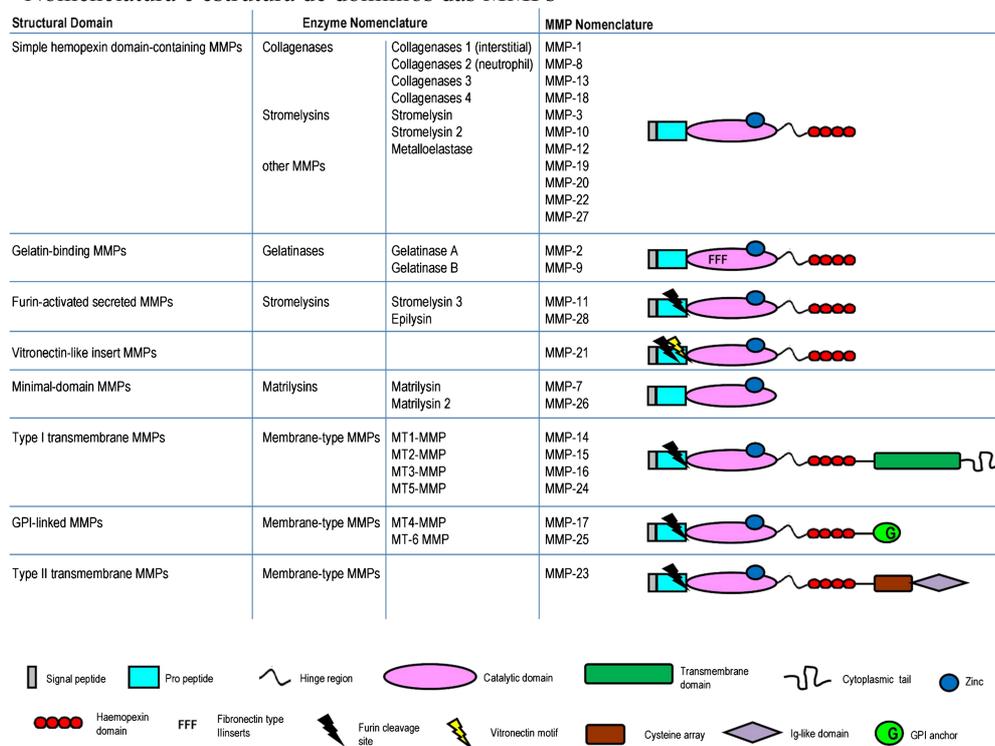
MMPs são importantes enzimas capazes de clivar a MEC levando à liberação de citocinas, moléculas de adesão celular como caderinas, integrinas, outras MMPs e alguns inibidores de protease (EGEBALD; WERB, 2002), fatores de crescimento tais como IGF (fatores de crescimento da insulina), FGF (fatores de crescimento de fibroblastos), receptores de tirosina kinase, moléculas de adesão celular e citocinas (FOWLKES et al., 1995; WHITELOCK et al., 1996). Os processos de alterações estruturais mediados pelas MMPs são diretamente influenciados por hormônios, citocinas e fatores de crescimento e são essenciais em todos os processos de remodelamento em tecidos em desenvolvimento e regeneração (ITOH, 2006; NAGASE et al., 2006; D'ALESSIO et al., 2008; BREW; NAGASE, 2010).

Além de degradar os componentes estruturais da MEC, as MMPs são responsáveis por proporcionar espaços para migração celular, regular a arquitetura tecidual e ativar, desativar ou modificar a atividade de moléculas de sinalização direta ou indiretamente (STERNLICHT; WERB, 2001).

A família das MMPs é composta por collagenases intersticiais (MMP-1 que degrada colágenos tipos I, II e III), gelatinases (MMP-2 e MMP-9 que degradam colágenos tipos IV, V e X), stromelisinases (MMP3, 7 e 10 que degradam colágenos tipos IV e IX, lamininas, fibronectinas, elastinas e proteoglicanas) e MMPs de membrana (MMP14, 15 e 16) (CHEVRONNAY et al., 2012). Todas as MMPs possuem essencialmente a mesma estrutura contendo quatro-domínios como ilustrado na figura 1. São estes: : i) um peptídeo de

sinalização N-terminal necessário para secreção; ii) um pró-domínio clivável para manter a latência enzimática; iii) um domínio catalítico e de ligação de zinco e iv) um domínio de hemopexina C-terminal.

Figura 1 - Nomenclatura e estrutura de domínios das MMPs



Fonte: Adaptado de Polimeni and Prato *Fluids and Barriers of the CNS* 2014 11:1

Ilustração das MMPs subdivididas em grupos com base na composição de seus domínios. Cada MMP possui um domínio estrutural: i) um peptídeo de sinalização N-terminal necessário para secreção; ii) um pró-domínio clivável para manter a latência enzimática; iii) um domínio catalítico e de ligação de zinco e iv) um domínio de hemopexina C-terminal. MMPs ainda podem apresentar motivos como domínio tipo fibronectina, um motivo de fibronectina, um local de clivagem de furina, três “head-to-tail cysteine-rich repeats” e para MMP de membrana, um domínio transmembrana C-terminal.

As MMPs são sintetizadas como pré-enzimas e processadas a pró-enzimas latentes (pro-MMPs) as quais assumem uma forma cataliticamente ativa e são eventualmente secretadas no espaço extracelular. A ativação da pró-enzima na ECM é de importância regulatória específica, já que é um pré-requisito para que ocorra atividade proteolítica (NAGASE et al., 2006).

Como mencionado, as MMPs sofrem ação de inibidores teciduais de metaloproteínas (TIMPs) (SALAMONSEN, 1996). TIMPs são proteínas ricas em cisteína que inibem reversivelmente as MMPs de forma estequiométrica (STERNLICHT; WERB, 2001). TIMPs 1, 2, 3 e 4 variam na sua habilidade e especificidade tecidual em inibir as várias MMPs. TIMP1 inibe MMP1, 2, 3, porém MMP9 com alta afinidade, enquanto TIMP2

em altas concentrações inibe MMP2 (GOLDBERG et al., 1989; OLSON et al., 1997). Todos os quatro tipos de TIMP são encontradas com abundância nos tecidos do trato reprodutivo de mulheres (FATA et al., 2000).

MMPs e seus inibidores naturais, TIMPs possuem um papel vital no endométrio sendo responsáveis pelo equilíbrio do remodelamento da MEC. Isto ocorre devido a um meticuloso balanço entre MMPs e TIMPs que controlam a formação e dissolução da MEC e assim sua composição (PILCHER et al., 1997; STETLER-STEVENSON; YU, 2001).

As atividades das MMPs são reguladas principalmente através de três mecanismos: transcrição, processos pós-traducionais (ativação) e inibição via seus inibidores específicos (TIMPs) (EDWARDS et al., 1996).

As TIMPs se ligam com diferentes afinidades aos domínios cataliticamente ativos das MMPs exercendo assim atividade específica de inibição de protease. Esta regulação é essencial para o ciclo reprodutivo e no remodelamento endometrial, essencial para seu crescimento e diferenciação (NOTHNICK et al., 2000). Porém esta atividade deve ser cuidadosamente regulada de maneira espacial e temporal para prevenir um desequilíbrio na quebra de tecido superficial do endométrio, mas ainda permitir um remodelamento durante todas as fases do ciclo, particularmente durante o período de receptividade uterina (CHEVRONNAY et al., 2012).

Estudos sugerem que esteroides ovarianos regulam a expressão das MMPs, já que, a P_4 reprime a expressão de MMP1, 3, 7, 8 e 10 em culturas de células ou explantes de tecido (CORNET et al., 2005; VASSILEV et al., 2005). A expressão temporal de TIMP2 parece ser inversamente relacionada à expressão de MMP2 e 14 com maiores níveis de mRNA detectados no dia 12 de gestação, provavelmente devido ao efeito da P_4 como evidenciado em trabalhos em bovinos (BAUERSACHS et al., 2005; MITKO et al., 2008; LEDGARD et al., 2009), ovinos (HAMPTON et al., 1995) e humano (GOFFIN et al., 2003) sugerindo também um controle hormonal da expressão de TIMP2. Tais evidências aqui descritas destacam a relevância dos hormônios esteróides sobre a função das proteases da MEC na preparação do endométrio para a implantação.

Em resumo, o sistema MMP/TIMP é responsável pelo controle e funcionamento de processos fisiológicos tais como desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelamento tecidual, assim como processos patológicos como artrite, doenças inflamatórias, desenvolvimento de cancer e metástases quando ocorre a perda de controle do funcionamento do sistema MMP/TIMP levando à agressiva degradação da MEC (STETLER-STEVENSON;

YU, 2001; BURRAGE et al., 2006; PAGE-MCCAWE, 2007; KESSENBROCK et al., 2010). Isto ocorre devido ao fato de estarem envolvidas em processos que regulam a invasão celular incluindo adesão célula-célula (RIBEIRO et al., 2010), adesão célula-MEC (DERYUGINA et al., 2002) e disponibilidade de fatores de crescimento e citocinas (KOSHIKAWA et al., 2010). As diferentes MMPs estão presentes com maior abundância em determinados tecidos, sendo em nosso estudo, as de maior relevância no tecido endometrial as gelatinases e MMP14, que serão abordadas a seguir.

2.7 GELATINASES – MMP2 E MMP9

MMP-2 e MMP-9 pertencem ao subgrupo das gelatinases. Possuem atividade proteolítica similares e degradam colágenos, gelatinas e diversas moléculas da ECM, incluindo colágenos tipo IV, V e XI e laminina.

As gelatinases tem sido extensivamente estudadas no trato reprodutivo feminino e são de grande importância para o desenvolvimento do conceito e placenta, parto e involução uterina assim como no remodelamento endometrial (HULBOY et al., 1997; SALAMONSEN; WOOLLEY, 1999; CURRY; OSTEEEN, 2003).

A MMP2 está envolvido no processo de remodelamento vascular, predominantemente presente nas células do estroma, vasos sanguíneos e lâmina basal do tecido endometrial humano (ZHANG et al., 2000). Por sua vez, a TIMP-2 é considerada responsável por proteger os vasos sanguíneos mantendo sua integridade através da inibição das MMPs (NISSI et al., 2013). A regulação da angiogênese depende em grande parte de um equilíbrio entre fatores estimulantes e inibitórios das várias etapas da formação da rede vascular. Sabe-se que em humanos, MMP9 é expressa no endométrio durante o período de implantação e promove o crescimento de vasos sanguíneos, resultando no espessamento da camada funcional do endométrio em preparação para a possível chegada do embrião (CURRY; OSTEEEN, 2003) assim como a intensa atividade de MMP2 no remodelamento vascular (ZHANG et al., 2000). Em camundongos knockout observou-se que MMP2 é essencial para angiogênese em tumores (MCCAWELEY; MATRISIAN, 2000) e que o estímulo do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) leva a um incremento na produção de MMP2 em células endoteliais (LAMOREAUX et al., 1998; ZUCKER et al., 1998).

Em bovinos, segundo Nagase et al. (2006), a função das MMPs pode estar ligada a um equilíbrio entre proliferação e diferenciação durante o estro, visto que MMP14, está diretamente envolvida na atividade proteolítica de maneira parácrina no processo de migração e invasão celular (ITOH; SEIKI, 2006).

Um estudo realizado por Ulbrich et al. (2011) confirmou resultados anteriormente observados em humanos afirmando que as MMPs contribuem para um remodelamento temporal e espacial do endométrio bovino. Foram observadas distintas alterações na expressão de MMP2, MMP14 e TIMP2 durante as diferentes fases do ciclo, indicando uma regulação endócrina. O padrão de expressão e localização celular também está correlacionado com os supostos efeitos das MMPs perante a liberação e ativação de citocinas e fatores de crescimento que direcionam migração celular, diferenciação e vascularização durante este período crítico do desenvolvimento. Tais resultados sugerem que as MMPs provavelmente estejam envolvidas no processo de remodelamento em preparação de um endométrio receptivo para um desenvolvimento adequado do embrião.

As MMPs endometriais são reguladas pelos hormônios esteróides, E_2 e P_4 , sendo a P_4 inibitória à expressão e ativação de MMP2 e MMP9 em células endometriais humanas (HENRIET et al., 2002). Por outro lado, a secreção de TIMP1, 2 e 3 é induzida pelo aumento da concentração de P_4 . Aparentemente o E_2 não possui nenhum efeito sobre a secreção de TIMP e seu efeito de indução em algumas das MMPs é sutil e depende das concentrações de P_4 . O controle da expressão de MMP, em resposta à P_4 e E_2 é controlado por citocinas, especialmente $IL-1\alpha$ e $TGF\beta$ (HENRIET et al., 2002).

Embora funções das MMPs tenham sido descritas nos períodos peri-parto, término da gestação e pós-parto em vacas (WALTER; BOOS, 2001; TAKAGI et al., 2007), o detalhado perfil de expressão das gelatinases ainda não foi elucidado, já que os mecanismos de proteólise da MEC endometrial permanecem obscuros em bovinos. Um estudo realizado por Kizaki et al. (2008) detectou a expressão gênica e proteica das gelatinases no endométrio bovino ao longo de toda gestação, constatando serem os principais fatores de remodelamento endometrial durante o período de implantação e pré-parto em vacas.

2.8 METALOPROTEINASES ADAMTS

ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) e ADAM-TSs (ADAMs com repeats de trombospondina) são proteínas transmembrana da família das MMPs com funções de adesão celular e processamento proteolítico de ectodomínios de diversos receptores de superfície celular e moléculas de sinalização (EDWARDS et al., 2008). Tais proteases exercem um importante papel na liberação de proteínas de ligação à membrana plasmática. Participam também na liberação de fatores de crescimento sintetizados na forma de precursores, como o heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) e transforming growth factor- α (TGF α) (PESCHON, 1998; STERNLICHT, 2005).

ADAMs possuem alguns ou todos os seguintes domínios: um peptídeo de sinalização, um pró-peptídeo, uma metaloprotease, uma desintegrina, um domínio de fator de crescimento epidérmico (EGF) rico em cisteína, uma sequência transmembrana e uma cauda citoplasmática (DUFFY et al., 2003).

Duas funções conhecidas das proteases ADAM são a função proteolítica de degradar a MEC para facilitar a migração/invasão de células e a função de “shedase” para ativar as vias de sinalização através da lise de citocinas e fatores de crescimento da superfície celular. (DUFFY et al., 2003; EDWARDS et al., 2008; MURPHY., 2008; REISS; SAFTIG, 2009).

Há evidências que indicam que estas proteases desempenham papéis importantes na renovação da matriz extracelular em vários tecidos inclusive na remodelação cíclica dos tecidos reprodutivos (YOUNG et al., 2004). Alterações na sua regulação tem sido implicadas em doenças tais como cancer, artrite e aterosclerose (TORTORELLA et al., 2009).

ADAMTS são reguladas por fatores de crescimento, citocinas e hormônios. TGF β 1 induz a expressão de mRNA de ADAMTS-2, -4 e -12 em células de osteosarcoma e fibroblastos fetais humanos (YAMANISHI et al., 2002; CRUZ et al., 2005). Em células da granulosa, a expressão de ADAMTS-1 é regulada pelo hormônio luteinizante (LH) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) através da regulação de fatores de transcrição por interações proteína-proteína (DOYLE et al., 2004; SHIMADA et al., 2004). Estradiol-17 β e dihidrotestosterona possuem efeito regulatório sobre a expressão de ADAMTS-1,-5, -8 and -9 nas células do estroma endometrial humano (WEN et al., 2006). No entanto, P₄ é o mais potente regulador da expressão gênica das ADAMTS. Assim, tais observações sugerem sua

importância no remodelamento da MEC mediado por hormônios esteroides (WEN et al., 2013).

A semelhança entre o domínio catalítico dependente de zinco de ADAMTS e o domínio catalítico de MMPs estabelece a possibilidade de que ADAMTS pode ser inibida pelos mesmos inibidores das MMPs, as TIMPs. De fato, estudos têm demonstrado que o TIMP3 é o inibidor natural mais potente de ADAMTS, podendo inibir potentemente ADAMTS-4 e -5 e parcialmente ADAMTS-1 (GENDRON et al., 2003; POCKERT et al., 2009). Estudos indicam a relevância de ADAMTS-5 no controle de processos de remodelação da MEC endometrial e desenvolvimento da placenta. (LLAMAZARES et al., 2003;. SOMERVILLE et al., 2004). Sua expressão é também aumentada durante o processo de decidualização em camundongos, proporcionando evidência de que este subtipo de ADAMTS possui função importante durante o processo de implantação (HURSKAINEN et al., 1999). Após a ovulação, quando os níveis de P_4 no plasma aumentam, e, especialmente, durante o período em que ocorre decidualização após a implantação embrionária, os níveis de ADAMTSs, tais como ADAMTS-1, -8, -9 e, aumentam, levando à degradação da ECM endometrial e, assim, facilitando a implantação (WEN et al., 2013).

3 REMODELAMENTO DINÂMICO DA MATRIZ EXTRACELULAR ENDOMETRIAL MODULA A RECEPTIVIDADE EM BOVINOS

O presente capítulo foi redigido na forma de uma publicação científica a ser submetida para publicação. Seu conteúdo, na íntegra, encontra-se no apêndice A da presente tese. Uma versão resumida do conteúdo da publicação encontra-se a seguir.

Em bovinos, o período de receptividade endometrial é fundamental para que ocorra a implantação embrionária. A comunicação entre embrião e endométrio depende de diferentes fatores estruturais, bioquímicos, moleculares e genéticos envolvidos na receptividade endometrial. Assim, o endométrio é definitivamente um tecido determinante da fertilidade e o melhor entendimento da receptividade pode auxiliar no emprego de medidas terapêuticas levando assim a um incremento das taxas de prenhez. A matriz extracelular (MEC) é constituída por moléculas que exercem funções ligadas à sustentação tecidual, interação célula-célula e célula-matriz. Os componentes da MEC endometrial se organizam de maneira fisiológica havendo um equilíbrio entre a síntese e degradação dos mesmos. Um desarranjo neste equilíbrio pode levar à marcantes consequências tais como comprometimento da implantação e infertilidade. A relevância do remodelamento da MEC endometrial tem sido bem documentada em outras espécies, porém vagamente descrita em bovinos e em sua maioria, possuem como principal foco o período de implantação embrionária. A escassez de estudos durante a primeira semana de gestação para caracterização da MEC quanto à receptividade uterina levou ao desenvolvimento deste trabalho. As hipóteses foram: 1. a desorganização da MEC endometrial durante a primeira semana pós-estro pode levar ao comprometimento reprodutivo; 2. o aumento nas concentrações de estradiol (E_2) e progesterona (P_4) no período periovulatório modulam positivamente o remodelamento da MEC endometrial, mantendo um equilíbrio entre os componentes da mesma. Foram conduzidos dois experimentos. O objetivo do experimento 1 foi identificar a relação de diferentes tamanhos de folículos pré-ovulatórios (FPO) e corpo lúteo (CL) e respectivos hormônios E_2 e P_4 , com a expressão endometrial de genes responsáveis pelo remodelamento da MEC durante o período de pré-implantação. No experimento 1, estudo 1 e estudo 2, 42 e 74 vacas Nelore (*Bos indicus*) adultas, respectivamente foram sincronizadas utilizando um protocolo hormonal com intuito de manipular o ambiente endócrino periovulatório, obtendo-

se ao final, dois grupos com FPO e CL de tamanhos distintos e, conseqüentemente, distintas concentrações de E_2 e P_4 . Os grupos foram: Folículo Grande-CL Grande (FG-CLG; estudo 1, n=20; estudo 2, n=35) e Folículo Pequeno-CL Pequeno (FP-CLP; estudo 1, n=22; estudo 2, n=39). Amostras de tecido endometrial foram coletadas através de biópsia no D0 (estro) e pós-mortem no D4 (estudo 1) e D7 (estudo 2), mantidas a -80°C até extração de mRNA e proteína. Concentrações de E_2 e P_4 foram mensuradas por radioimunoensaio (RIA) obtendo-se menores concentrações no grupo FP-CLP. O objetivo do experimento 2 foi analisar a relação entre a expressão gênica de determinados componentes da MEC, avaliada no dia 6 após inseminação artificial (IA), com sucesso gestacional. No experimento 2, vacas adultas, Nelore (*Bos indicus*) (n=33) foram sincronizadas utilizando um protocolo a base de prostaglandina 2α (PGF 2α) e observação de estro. As vacas foram inseminadas artificialmente (IA) e seis dias após, uma biópsia endometrial coletada. O diagnóstico de gestação foi realizado após 30 dias por meio de ultrasonografia (US) e então as vacas foram divididas nos grupos Prenhe e Não-Prenhe (P e NP) para análise retrospectiva. Sequenciamento de transcritos (RNAseq) foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2000 em amostras selecionadas de vacas do D7 (experimento 1, estudo 2; FP-CLP n=3; FG-CLG n=3) e seis dias após IA (experimento 2; P n=6; NP n=6). Os dados foram filtrados e a análise integrada das diferentes bases de dados funcionais foi realizada utilizando-se o software "Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery" (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH). Os resultados relevantes ao estudo de remodelamento de MEC foram confirmados por meio de qPCR. Realizaram-se também exames histológicos em amostras do D4 (experimento 1, estudo 1; FP-CLP, n=5 e FG-CLG, n=4) e D7 (experimento 1, estudo 2; FP-CLP, n=5 e FG-CLG, n=4) para avaliação de colágeno total através da coloração de tricromo de Masson assim como espessura de fibras colágenas através da coloração de picrossírius utilizando microscópio com luz polarizada. Análises das imagens de tricromo de Masson foram realizadas pelo software Image-J® e picrossírius o software Image-Pro Plus®. Para as variáveis discretas (diâmetro do folículo, o volume de CL e diferenças na abundância de transcritos) foi utilizado o teste t de Student. Dados histológicos foram analisados por meio de análise de variância, correlação e regressão de Pearson. No experimento 1, estudos 1 e 2, constatou-se uma diferença significativa entre grupos FP-CLP e FG-CLG quanto a tamanho de folículo no D0 ($p<0.01$), concentrações plasmáticas de E_2 ($p<0.01$), volume de CL e concentrações plasmáticas de P_4 no D7 ($p<0.01$), sendo todas estas variáveis maiores no grupo FG-CLG. No experimento 2 houve uma taxa de gestação de 36% (16 P/36 IA). Resultados do RNAseq determinaram uma maior

abundância de transcritos relacionados ao remodelamento de MEC, destacando-se TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, MMP2, MMP14, ADAMTS1, ADAMTS2, ADAMTS4, ADAMTS5, TIMP1, TIMP2, TIMP3, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A5 em vacas pertencentes aos grupos FP-CLP (experimento 1, estudo2) e NP (experimento2). Tais resultados foram validados por qPCR. Resultados de histologia por coloração de tricromo de Masson indicaram uma maior abundância de fibras de colágeno no grupo FP-CLP nos dias 4 (p=0,01) e 7 (p=0,002) contatado através de uma maior quantidade de coloração azul, indicativo de fibras de colágeno. No dia 4 observou-se uma correlação negativa entre o tamanho do folículo pré-ovulatório (FPO) com a abundância de fibras colágenas nos epitélios glandulares superficial e profundo (-0,737/p=0,015; -0,621/p=0,055). Também houve uma correlação negativa entre a concentração de P₄ e a coloração no epitélio glandular profundo (-0,700/p = 0,024). No dia 7 houve uma maior abundância de fibras colágenas no epitélio glandular profundo (p=0,0008) e correlações negativas entre FPO e concentração de P₄ com abundância de fibras colágenas neste epitélio (FPO, -0,557/p = 0,004; P₄, -0,315/p=0,006). Já a coloração por picrossírius não indicou diferença entre a quantidade de fibras finas e grossas entre os grupos experimentais (p>0.05) assim como nenhuma diferença entre compartimentos superficial e profundo (p>0.05). No entanto a quantidade total de fibras foi numericamente maior no dia 7 que no dia 4. Análises de correlação e regressão indicam que folículos pré-ovulatórios de maior tamanho geram CL maiores e assim, maiores concentrações de P₄, a qual exerce efeito negativo na abundância de colágenos. Os resultados sugerem que uma alteração na homeostase da MEC endometrial leva a uma desregulação na síntese e degradação das fibras de colágenos, comprometendo assim a fertilidade e levando a complicações no período pré-implantação.

4 CONCLUSÃO

A extensa literatura sobre MEC e seu remodelamento evidenciam sua relevância nos diversos tecidos e espécies. A MEC exerce a fundamental função de suporte estrutural nos tecidos assim como importantes implicações na migração, proliferação e diferenciação celular. Desta forma, o estudo da sua estrutura e composição é essencial para a compreender sua dinâmica e remodelamento tendo como componentes fundamentais as MMPs, seus inibidores (TIMPs), TGF β e colágenos. É essencial uma constante harmonia entre tais componentes, levando ao equilíbrio entre a síntese e quebra de colágeno. O contrário pode levar a processos patológicos tais como cancer e fibrose. No endométrio, os componentes de MEC são submetidos à regulação endócrina principalmente pelos hormônios esteróides ovarianos P₄ e E₂. Alterações nas concentrações fisiológicas de tais hormônios e consequentemente na MEC podem interferir negativamente na receptividade embrionária e gestação.

REFERÊNCIAS

- ACHACHE, H.; REVEL A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Hum Reprod Update**, v. 12, n. 6, p. 731-46, 2006.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molekularbiologie der Zelle**. 4. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2004.
- APLIN, J. D.; CHARLTON, A. K.; AYAD, S. An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. **Cell Tissue Res**, v. 253, n. 1, p. 231-40, 1988
- BAGCHI, I. C.; CHEON, Y. P.; LI, Q.; BAGCHI, M. K. Progesterone receptor- regulated gene networks in implantation. **Front. Biosci**, v. 8, p. 852-861. 2003.
- BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; GROSS, K.; SCHMIDT, S. E.; MEYER, H. H.; EINSPANIER, R.; WENIGERKIND, H.; VERMEHREN, M.; BLUM, H.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **J Mol Endocrinol**, v. 34, p. 889-908, 2005
- BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M.; THATCHER, W. W. Actions of hormones on the uterus and effect on conceptus development. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 35-45, 1979. Supplement, 2.
- BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; WU, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. **Reproductive biology**, v. 8, n. 3, p. 179-211, 2008
- BAZER, F. W. Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. **J Anim Sci Biotechnol**, v. 4, p. 23, 2013
- BERGH, P. A.; NAVOT, D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. **Fertil Steril**, v. 58, p. 537-542, 1992
- BINELLI, M.; SCOLARI, S. C.; PUGLIESI, G.; VAN HOECK, V.; GONELLA-DIAZA, A. M.; ANDRADE, S. C.; GASPARIN, G. R.; COUTINHO, L. L. The Transcriptome Signature of the Receptive Bovine Uterus Determined at Early Gestation. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 22-23, 2015.
- BLANKENSHIP, T. N.; GIVEN, R. L. Loss of laminin and type IV collagen in uterine luminal epithelial basement membranes during blastocyst implantation in the mouse. **Anat Rec**, v. 243, p. 27-36, 1995.
- BORNSTEIN, P. Matricellular proteins: an overview. **J Cell Commun Signal**, v. 3, n. 3-4, p. 163-5. 2009.

BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol**, v. 20, p. 161–168, 2010.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. **Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 55-71. 2010.

BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; JAEGER, L. A.; KA, H.; GARLOW, J. E.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Integrins and extracellular matrix proteins at the maternal–fetal interface in domestic animals. **Cells, Tissues, Organs**, v. 172, p. 202–217, 2002.

BURRAGE, P. S.; MIX, K. S.; BRINCKERHOFF, C. E. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. **Front Biosci**, v. 1, n. 11, p. 529-43, 2006.

BURTON, G. J.; WATSON, A. L.; HEMPSTOCK, J.; SKEPPER, J. N.; JAUNIAUX, E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2954-2959, 2002.

CARSON, D. D.; BAGCHI, I.; DEY, S. K.; ENDERS, A. C.; FAZLEABAS, A. T.; LESSEY, B. A.; YOSHINAGA, K. Embryo implantation. **Dev Biol**, v. 223, p. 217-237, 2000.

CHEVRONNAY, H.; SELVAIS, C.; EMONARD, H.; GALANT, C.; MARBAIX, E.; HENRIET, P. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 146–156, 2012.

CLARK, D. E.; HURST, P. R.; MCLENNAN, I. S.; MYERS, D. B. Immunolocalization of collagen type I and laminin in the uterus on days 5 to 8 of embryo implantation in the rat. **The Anatomical Record**, v. 237, n. 1, p. 8-20, 1993.

COCKLE, J. V.; GOPICHANDRAN, N.; WALKER, J. J.; LEVENE, M. I.; ORSI, N. M. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preterm perinatal complications. **Reprod Sci**, v. 14, p. 629–645, 2007.

CORNET, P. B.; GALANT, C.; EECKHOUT, Y.; COURTOY, P. J.; MARBAIX, E.; HENRIET, P. Regulation of matrix metalloproteinase-9/gelatinase B expression and activation by ovarian steroids and LEFTY-A/endometrial bleeding-associated factor in the human endometrium. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 2, p. 1001-1011, 2005.

COX, D. A.; HELVERING, L. M. Extracellular matrix integrity: a possible mechanism for differential clinical effects among selective estrogen receptor modulators and estrogens? **Mol Cell Endocrinol**, v. 9, n. 247, p. 53-9, 2006.

CRAWFORD, H. C.; MATRISIAN, L. M. Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. **Enzyme Protein**, v. 49, p. 20–37, 1996.

CRUZ, N. A.; CHANDRASEKHARAN, S.; JOKONYA, N. The expression and regulation of ADAMTS-1, -4, -5, -9, and -15, and TIMP-3 by TGFbeta1 in prostate cells: relevance to the accumulation of versican. **Prostate**, v. 63, p. 269-275, 2005.

CURRY, T. E.; OSTEEEN, K. G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocr Rev**, v. 24, p. 428-465, 2003.

CUTTING, G. R.; KAZAZIAN, H. H.; ANTONARAKIS, S. E.; KILLEN, P. D.; YAMADA, Y.; FRANCOMANO, C. A. Macrorestriction mapping of COL4A1 and COL4A2 collagen genes on human chromosome 13q34. **Genomics**, v. 3, p. 256-63, 1988.

D'ALESSIO, S.; FERRARI, G.; CINNANTE, K.; SCHEERER, W.; GALLOWAY, A. C.; ROSES, D. F.; MIGNATTI, P. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 1, p. 87-99, 2008.

DE ZIEGLER, D.; FANCHIN, R.; DE MOUSTIER, B.; BULLETTI, C. The hormonal control of endometrial receptivity: estrogen (E2) and progesterone. **J Reprod Immunol**, v. 39, p. 149-166, 1998.

DERYUGINA, E. I.; RATNIKOV, B. I.; POSTNOVA, T. I.; ROZANOV, D. V.; STRONGIN, A. Y. Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 12, p. 9749-56, 2002.

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.

DIEDRICH, K.; FAUSER, B. C. J. M.; DEVROEY, P.; GRIESINGER, G. The role of the endometrium and embryo in human implantation. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 4, p. 365-377, 2007.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reprod Domest Anim**, v. 43, n. 2, p. 260–267, 2008.

DOYLE, K. M.; RUSSELL, D. L.; SRIRAMAN, V.; RICHARDS, J. S. Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. **Mol Endocrinol**, v. 18, n. 10, p. 2463-78, 2004.

DUFFY, M. J.; LYNN, D. J.; LLOYD, A. T.; O'SHEA, C. M. The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. **Thromb Haemost**, v. 89, p. 622–31, 2003.

EDWARDS, D. R.; BEAUDRY, P. P.; LAING, T. D.; KOWAL, V.; LECO, K. J.; LECO, P. A.; LIM, M. S. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue and cell growth. **Int. J. Obes**, v. 20, n. 3, p. 24-25, 1996.

EDWARDS, D. R.; HANDSLEY, M. M.; PENNINGTON, C. J. The ADAM metalloproteinases. **Mol Aspects Med**, v. 29, p. 258-89, 2008.

EGBLAD, M.; RASCH, M. G.; WEAVER, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Curr. Opin. Cell Biol**, v. 22, p. 697-706, 2010.

EL-BANNA, A. A.; HAFEZ, E. S. E. Egg transport in beef cattle. **J Anim Sci**, v. 30, p. 430-2, 1970.

FARRAR, J. D.; CARSON, D. D. Differential temporal and spatial expression of mRNA encoding extracellular matrix components in decidua during the peri-implantation period. **Biology of Reproduction**, v. 4, n. 6, p. 1095-1108, 1992.

FATA, J. E.; HO, A. T.; LECO, K. J.; MOOREHEAD, R. A.; KHOKHA, R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, p. 77-95, 2000.

FAVARO, R. R.; SALGADO, R. M.; COVARRUBIAS, A. C.; BRUNI, F.; LIMA, C.; FORTES, Z. B.; ZORN, T. M. Long-term type 1 diabetes impairs decidualization and extracellular matrix remodeling during early embryonic development in mice. **Placenta**, v. 34, n. 12, p. 1128-35, 2013.

FORDE, N.; CARTER, F.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; SANDRA, O.; MANSOURI-ATTIA, N.; OKUMU, L. A.; MCGETTIGAN, P. A.; MEHTA, J. P.; MCBRIDE, R.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? **Biol Reprod**, v. 85, n. 1, p. 144-56, 2011.

FORDE, N.; DUFFY, G. B.; MCGETTIGAN, P. A.; BROWNE, J. A.; MEHTA, J. P.; KELLY, A. K.; MANSOURI-ATTIA, N.; SANDRA, O.; LOFTUS, B. J.; CROWE, M. A.; FAIR, T.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. Evidence for an early endometrial response to pregnancy in cattle: both dependent upon and independent of interferon tau. **Physiol Genomics**, v. 17, n. 16, p. 799-810, 2012.

FOWLKES, J. L.; THRAILKILL, K. M.; SERRA, D. M.; SUZUKI, K.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases as insulin-like growth factor binding protein-degrading proteinases. **Prog Growth Factor Res**, v. 6, p. 255-263, 1995.

GAMBICHLER, T.; KREUTER, A.; GROTHE, S.; ALTMAYER, P.; BROCKMEYER, N. H.; ROTTERDAM, S. Versican overexpression in cutaneous malignant melanoma. **Eur J Med Res**, v. 24, n. 11, p. 500-4, 2008.

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. **J Reprod Fertil**, v. 84, p. 437-46, 1988.

GELSE, K.; POSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, p. 1531–1546, 2003.

GENDRON, C.; KASHIWAGI, M.; HUGHES, C.; CATERSON, B.; NAGASE, H. TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors. **FEBS Lett**, v. 18, n. 3, p. 431-6, 2003.

GOFFIN, F.; MUNAUT, C.; FRANKENNE, F.; PERRIER, D. S.; BELIARD, A.; FRIDMAN, V.; NERVO, P.; COLIGE, A.; FOIDART, J. M. Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium. **Biol. Reprod**, v. 69, p. 976-984, 2003.

GOLDBERG, G. I.; MARMER, B. L.; GRANT, G. A.; EISEN, A. Z.; WILHELM, S.; HE, C. Human 72k type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. **Proc Natl Acad Sci**, v. 86, p. 8207–8211, 1989.

GOLDBERG, G. I.; STRONGIN, A.; COLLIER, I. E.; GENRICH, L. T.; MARMER, B. L. Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. **J Biol Chem**, v. 5, n. 7, p. 4583-91, 1992.

GRAESSLIN, O.; CORTEZ, A.; FAUVET, R.; LORENZATO, M.; BIREMBAUT, P. Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical- pathological correlation study. **Ann Oncol**, v. 17, p. 637–645, 2006.

GUILLOMOT, M. Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation. **Placenta**, v. 20, n. 4, p. 339-45, 1999.

HAMPTON, A. L.; BUTT, A. R.; RILEY, S. C.; SALAMONSEN, L. A. Tissue inhibitors of metalloproteinases in endometrium of ovariectomized steroid-treated ewes and during the estrous cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod**, v. 53, p. 302–311, 1995.

HAOUZI, D.; MAHMOUD, K.; FOURAR, M.; BENDHAOU, K.; DECHAUD, H.; DE VOS, J. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. **Hum Reprod**, v. 24, p. 198–205, 2009.

HASHIZUME, K. Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. **J Reprod Dev**, v. 53, p. 1–11, 2007.

HELVERING, L. M.; ADRIAN, M. D.; GEISER, A. G.; ESTREM, S. T.; WEI, T.; HUANG, S.; CHEN, P.; DOW, E. R.; CALLEY, J. N.; DODGE, J. A.; GRESE, T. A.; JONES, S. A.; HALLADAY, D. L.; MILES, R. R.; ONYIA, J. E.; MA, Y. L.; SATO, M.; BRYANT, H. U. Differential effects of estrogen and raloxifene on messenger RNA and matrix metalloproteinase 2 activity in the rat uterus. **Biol Reprod**, v. 72, n. 4, p. 830-41, 2005.

HENRICKS, D. M.; LAMOND, D. R.; HILL, J. R.; DICKEY, J. F. Plasma progesterone concentrations before mating and in early pregnancy in the beef heifer. **J Anim Sci**, v. 33, p. 450-454, 1971.

HENRIET, P.; CORNET, P. B.; LEMOINE, P.; GALANT, C.; SINGER, C. F.; COURTOY, P. J.; EECKHOUT, Y.; MARBAIX, E. Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs). **Ann N Y Acad Sci**, v. 955, p. 119-138, 2002.

HIRATA, M.; SATO, T.; TSUMAGARI, M.; SHIMADA, A.; NAKANO, H.; HASHIZUME, K.; ITO, A. Differential regulation of the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by cytokines and growth factors in bovine endometrial stromal cells and trophoblast cell line BT-1 in vitro. **Biol Reprod**, v. 68, n. 4, p. 1276-81, 2003.

HUGENTOBLER, S. A.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J.; SREENAN, J. M.; MORRIS, D. G. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 3, p. 496-503, 2008.

HULBOY, D. L.; RUDOLPH, L. A.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Mol Hum Reprod**, v. 3, p. 27-45, 1997.

HUMBLLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v. 56, p. 1417-1433, 2001.

HURSKAINEN, T. L.; HIROHATA, S.; SELDIN, M. F.; APTE, S. S. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, novel members of a new family of zinc metalloproteases. General features and genomic distribution of the ADAM-TS family. **J Biol Chem**, v. 3, n. 36, p. 25555-25563, 1999.

HURST, P. R.; PALMAY, R. D. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during the implantation period in the rat uterus. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, n. 8, p. 395-402. 1999.

ITOH, Y.; SEIKI, M. MT1-MMP: A potent modifier of pericellular microenvironment. **Journal of cellular physiology**, v. 206, n. 1, p. 1-8, 2006.

IWAHASHI, M.; MURAGAKI, Y. Increased type I and V collagen expression in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. **Fertil Steril**, v. 95, n. 6, p. 2137-9, 2011.

JARVELAINEN, H.; SAINIO, A.; KOULU, M.; WIGHT, T. N.; PENTTINEN, R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy **Pharmacol. Rev**, v. 61, p. 198-223, 2009.

JOKIMAA, V.; OKSJOKI, S.; KUJARI, H.; VUORIO, E.; ANTTILA, L. Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriages. **Mol Hum Reprod**, v. 8, n. 12, p. 1111-6, 2002.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 2, n. 1, p. 52-67, 2010.

KIELTY, C. M.; WESS, T. J.; HASTON, L.; ASHWORTH, J. L.; SHERRATT, M. J.; SHUTTLEWORTH, C. A. Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix. **Journal of Muscle Research & Cell Motility**, v. 23, n. 5-6, p. 581-596. 2002.

KIM, S. H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **J Endocrinol**, v. 20, n. 2, p. 139-51, 2011.

KISCHEL, P.; WALTREGNY, D.; DUMONT, B.; TURTOI, A.; GREFFE, Y.; KIRSCH, S.; DE PAUW, E.; CASTRONOVO, V. Versican overexpression in human breast cancer lesions: known and new isoforms for stromal tumor targeting. **Int J Cancer**, v. 1, n. 3, p. 640-50, 2010.

KIZAKI, K.; USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; YAMADA, O.; TODOROKI, J.; SATO, T. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 6, p. 66, 2008.

KNOFLER, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. **Int J Dev Biol**, v. 54, p. 269-280, 2010.

KOSHIKAWA, N.; MIZUSHIMA, H.; MINEGISHI, T.; IWAMOTO, R.; MEKADA, E.; SEIKI, M. Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase Cleaves Off the NH₂-Terminal Portion of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor and Converts It into a Heparin-Independent Growth Factor. **Cancer Res**, v. 29, p. 322-24, 2010.

LALA, P. K.; CHAKRABORTY, C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. **Placenta**, v. 24, p. 575-587, 2003.

LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. **Anim Reprod Sci**, v. 52, p. 175-190, 1998.

LAMOREAUX, W. J.; FITZGERALD, M. E.; REINER, A.; HASTY, K. A.; CHARLES, S. T. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. **Microvascular research**, v. 55, n. 1, p. 29-42, 1998.

LEDGARD, A. M.; LEE, RS-F.; PETERSON, A. J. Bovine endometrial legumain and TIMP-2 regulation in response to presence of a conceptus. **Mol Reprod Dev**, v. 76, p. 65-74, 2009.

LIM, H.; SONG, H.; PARIA, B.C.; REESE, J.; DAS, S. K.; DEY, S. K. Molecules in blastocyst implantation: uterine and embryonic perspectives. **Vitam Horm**, v. 64, n. 43, p. 76, 2002.

LOCKWOOD, C. J.; ONER, C.; UZ, Y. H.; KAYISLI, U. A.; HUANG, S. J. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction. **Mol Reprod Dev**, v. 66, p. 75–77, 2008.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **J. Cell Biol**, v. 196, p. 395–406, 2012.

MALIK, M.; NORIAN, J.; MCCARTHY-KEITH, D.; BRITTEN, J.; CATHERINO, W.H. Why leiomyomas are called fibroids: the central role of extracellular matrix in symptomatic women. **Semin Reprod Med**, v. 28, n. 3, p. 169-79. 2010.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, p. 175–180, 2001.

MARBAIX, E. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. **Reproduction**, v. 223, p. 25–29, 1992

MCCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. **Mol. Med. Today**, v. 6, p. 149–156, 2000.

MISHRA, B.; KIZAKI, K.; KOSHI, K.; USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; HOSOE, M.; SATO, T.; ITO, A.; HASHIZUME, K. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, n. 8, p. 60, 2010.

MISHRA, B.; KIZAKI, K.; KOSHI, K.; USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; HOSOE, M.; SATO, T.; ITO, A.; HASHIZUME, K. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its expected roles in the bovine endometrium during gestation. **Domest Anim Endocrinol**, v. 42, n. 2, p. 63-73. 2012a.

MISHRA, B.; KIZAKI, K.; SATO, T.; ITO, A.; HASHIZUME, K. The role of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) in the regulation of bovine endometrial cell functions. **Biol Reprod**, v. 27, n. 6, p. 149, 2012b.

MISHRA, B.; KIZAKI, K.; KOSHI, K.; USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; HOSOE, M.; SATO, T.; ITO, A.; HASHIZUME, K. Expression of ADAMTS1 mRNA in bovine endometrium and placenta during gestation. **Domest Anim Endocrinol**, v. 45, n. 1, p. 43-8, 2013.

MITKO, K.; ULBRICH, S. E.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.; WOLF, E.; BAUERSACHS, S. Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 135, p. 225-240, 2008.

MOMOTA, R.; SUGIMOTO, M.; OOHASH, T.; KIGASAWA, K.; YOSHIOKA, H.; NINOMIYA, Y. Two genes, COL4A3 and COL4A4 coding for the human alpha3(IV) and alpha4(IV) collagen chains are arranged head-to-head on chromosome 2q36. **FEBS Lett**, v. 424, n. 11, p. 66-9, 1998.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 5, p. 558-564. 2004.

MURPHY, G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. **Nature Rev. Cancer** v. 8, p. 929-941. 2008.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 3, p. 562-573, 2006.

NEPHEW, K. P.; MCCLURE, K. E.; OTT, T. L.; DUBOIS, D. H.; BAZER, F. W.; POPE, W. F. Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle duration in ewes. **Biol Reprod**, v. 44, p. 536-9, 1991.

NEJAT, E.J.; RUIZ-ALONSO, M.; SIMÓN, C.; MEIER, U.T. Timing the window of implantation by nucleolar channel system prevalence matches the accuracy of the endometrial receptivity array. **Fertil Steril**, v. 102, n. 5, p. 1477-81. 2014.

NISSI, R.; TALVENSAARI-MATTILA, A.; KOTILA, V.; NIINIMÄKI, M.; JÄRVELÄ, I.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, n. 2, p. 45-7, 2013.

NOTHNICK, W. B. Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene results in altered reproductive cyclicity and uterine morphology in reproductive-age female mice. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 3, p. 905-912, 2000.

OLSON, M. W.; GERVASI, D. C.; MOBASHERY, S.; FRIDMAN, R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. **J Biol Chem**, v. 272, p. 29975-29983, 1997.

OSTEEN, K. G.; KELLER, N. R.; FELTUS, F. A.; MELNER, M. H. Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in normal human endometrium. **Gynecol Obstet Invest**, v. 48, n. 2, p. 13-15, 2003.

PERRY, G. A. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **Biology of reproduction**, v. 214, n. 3, p. 5268-5273. 2005.

PESCHON, J. J. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science**, v. 282, p. 1281-1284, 1998.

PILCHER, B. K.; DUMIN, J. A.; SUDBECK, B. D.; KRANE, S. M.; WELGUS, H. G.; PARKS, W. C. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. **The Journal of cell biology**, v. 137, n. 6, p. 1445-1457. 1997.

POCKERT, A. J.; RICHARDSON, S. M.; MAITRE, C. L.; LYON, M.; DEAKIN, J. A.; BUTTLE, D. J.; FREEMONT, A. J.; HOYLAND, J. A. Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 2, p. 482-91, 2009.

PONNAMPALAM, A. P.; WESTON, G. C.; TRAJSTMAN, A. C.; SUSIL, B.; ROGER, S. Molecular classification of human endometrial cycle stages by transcriptional profiling. **Mol Hum Reprod**, v. 10, n. 87, p. 9–93, 2004.

RASPANTI, M.; VIOLA, M. Glycosaminoglycans show a specific periodic interaction with type I collagen fibrils. **J Struct Biol**, v. 164, n. 1, p. 134-9, 2008.

REISS, K.; SAFTIG, P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, n. 2, p. 126-37, 2009.

RIBEIRO, A. S.; ALBERGARIA, A.; SOUSA, B.; CORREIA, A. L.; BRACKE, M.; SERUCA, R.; SCHMITT, F. C.; PAREDES, J. Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 21, n. 3, p. 392-402, 2010.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 1, p. 33-5, 2011.

ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. The functions of uterine secretions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 875–892, 1988.

ROSENFELD, C. S. Introduction to comparative placentation. **Developmental biology**, v. 12, p. 263-70, 2008.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. **Developmental biology**, v. 341, n. 1, p. 126-140, 2010.

SAKKO, A. J.; RICCIARDELLI, C.; MAYNE, K.; TILLEY, W. D.; LEBARON, R. G.; HORSFALL, D.J. Versican accumulation in human prostatic fibroblast cultures is enhanced by prostate cancer cell-derived transforming growth factor beta1. **Cancer Res**, v. 1, n. 3, p. 926-30, 2001.

SALAMONSEN, L. A. Matrix metalloproteinases and endometrial remodelling. **Cell Biology International**, v. 18, n. 12, p. 1139-1144, 1994.

SALAMONSEN, L. A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in endocrinology. **Trends Endocrinol**, v. 7, p. 28–34, 1996.

SALAMONSEN, L. A.; WOOLLEY, D. E. Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. **J Reprod Immunol**, v. 44, p. 1-27, 1999.

SALAMONSEN, L. A.; NAGASE, H.; WOOLLEY, D. E. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors at the ovine trophoblast-uterine interface. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 49, p. 29-37, 1995.

SALGADO, R. M.; FAVARO, R. R.; ZORN, T. M. Modulation of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) expression in the mouse uterus by estradiol and progesterone. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 9, p.22-24, 2011.

SALILEW-WONDIM, D.; HÖLKER, M.; RINGS, F.; GHANEM, N.; ULAS-CINAR, M.; PEIPPO, J.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer. **Physiol Genomics**, v. 7, n. 2, p. 201-18, 2010.

SATTERFIELD, M. C.; SONG, G.; HAYASHI, K.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Progesterone regulation of the endometrial WNT system in the ovine uterus. **Reprod Fertil Dev**, v. 20, p. 935- 946, 2008.

SATTERFIELD, M. C.; SONG, G.; KOCHAN, K. J.; RIGGS, P. K.; SIMMONS, R. M.; ELSIK, C. G.; ADELSON, D. L.; BAZER, F. W.; ZHOU, H.; SPENCER, T. E. Discovery of candidate genes and pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and conceptus elongation. **Physiol. Genomics**, v. 39, n. 2, p. 85-99, 2009.

SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the crypt, sites of the extracellular matrix. **Trends in cell biology**, v. 13, n. 7, p. 366-375, 2003.

SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 83-92, 2010.

SCHWARZBAUER, J. Basement membranes: putting up the barriers. **Current Biology**, v. 23, n.1, p.2342-46, 1999.

SHARKEY, A. M.; SMITH, S. K. The endometrium as a cause of implantation failure. **Clin Obstet Gynaecol**, v. 17, p. 289-307, 2003.

SHIMADA, M.; NISHIBORI, M.; YAMASHITA, Y.; ITO, J.; MORI, T.; RICHARDS, J. S. Down-regulated expression of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeats-1 by progesterone receptor antagonist is associated with impaired expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4603-14, 2004.

SKINNER, J. L.; RILEY, S. C.; GEBBIE, A. E.; GLASIER, A. F.; CRITCHLEY, H. O. Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. **Hum. Reprod**, v. 14, p. 793– 799, 1999.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 2, p. 49, 2004.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biol.Reprod**, v. 71, p. 2-10, 2004.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 4 -13, 2004. Supplement, E.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction Fertility and Development**, v. 19, p. 65-78, 2007.

SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G. Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. **Vet Rec**, v. 112, p. 517-521, 1983.

STENBÄCK, F. Collagen type III in ovarian tumors. Histological, immunohistochemical and ultrastructural findings. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 30, n. 1, p. 73-88. 1989.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 17, p. 463-516, 2001.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. **Development**, v. 132, p. 3923-3933, 2005.

STETLER-STEVENSON, W. G.; ANITA, E. Y. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. **In Seminars in Cancer Biology**, v. 11, n. 2, p. 143-153, 2010.

SUWIWAT, S.; RICCIARDELLI, C.; TAMMI, R.; TAMMI, M.; AUVINEN, P.; KOSMA, V. M.; LEBARON, R. G.; RAYMOND, W. A.; TILLEY, W. D.; HORSFALL, D. J. Expression of extracellular matrix components versican, chondroitin sulfate, tenascin, and hyaluronan, and their association with disease outcome in node-negative breast cancer. **Clin Cancer Res**, v.10, n. 7, p. 2491-8, 2004.

SWIERZ, L.; GIUDENCE, L. Unexplained infertility and the role of uterine receptivity. **Clinics North America**, v. 8, p. 523-543, 1997.

TABIBZADEH, S.; BABAKNIA, A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. **Hum Reprod**, v. 10, n. 6, p.1579-602, 1995.

TAKAGI, M.; YAMAMOTO, D.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Quantitative analysis of messenger RNA expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9), tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2), and steroidogenic enzymes in bovine placentomes during gestation and postpartum. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 1, p. 803-807, 2007.

TALBI, S.; HAMILTON, A. E.; VO, K. C.; TULAC, S.; OVERGAARD, M. T.; DOSIOU, C. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. **Endocrinology**, v. 14, n. 7, p. 1097-121, 2005.

TANAKA, T.; WANG, C.; UMESAKI, N. Remodeling of the human endometrial epithelium is regulated by laminin and type IV collagen. **Int J Mol Med.**, v. 23, n. 2, p. 173-80, 2009.

TAPIA, A.; SALAMONSEN, L. A.; MANUELPILLAI, U.; DIMITRIADIS, E. Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. **Hum Reprod**, v. 23, p. 1724-1732, 2008.

TAPIA, A.; VILOS, C.; MARÍN, J.C.; CROXATTO, H. B.; DEVOTO, L. Bioinformatic Detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 27, p. 9-14, . 2011.

TORTORELLA, M. D.; MALFAIT, F.; BARVE, R. A.; SHIEH, H. S.; MALFAIT, A. M. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 20, p. 2359-74, 2009.

ULBRICH, S. E.; MEYER, S. U.; ZITTA, K.; HIENDLEDER, S.; SINOWATZ, F.; BAUERSACHS, S. Bovine endometrial metalloproteinases MMP14 and MMP2 and the metallo- peptidase inhibitor TIMP2 participate in maternal preparation of pregnancy. **Mol Cell Endocrinol**, , v. 33, n. 2, p. 48-57, 2011.

VASSILEV, V.; PRETTO, C. M.; CORNET, P. B.; DELVAUX, D.; EECKHOUT, Y.; COURTOY, P. J.; HENRIET, P. Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene-and phase-specific differential control in vivo. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 10, p. 5848-5857, 2005.

VON GROTHUSEN, C.; LALITKUMAR, S.; BOGGAVARAPU, N. R.; GEMZELL-DANIELSSON, K.; LALITKUMAR, P. G. Recent advances in understanding endometrial receptivity: molecular basis and clinical applications. **Am J Reprod Immunol**, v. 72, n. 2, p. 148-57, 2014.

WALTER, I.; BOOS, A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor-2 of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in the placenta and interplacental uterine wall in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes. **Placenta**, v. 22, p. 473-483, 2001.

WANG, H.; DEY, S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. **Nat Rev Genet**, v. 7, p. 185-199, 2006.

WEN, J.; ZHU, H.; MURAKAMI, S.; LEUNG, P. C.; MACCALMAN, C. D. Regulation of A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin repeats-1 expression in human endometrial stromal cells by gonadal steroids involves progestins, androgens, and estrogens. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.91, n. 12, p. 4825-35, 2006.

WEN, J.; ZHU, H.; LEUNG, P.C. Gonadal steroids regulate the expression of aggrecanases in human endometrial stromal cells in vitro. **J Cell Mol Med**, v. 17, n. 10, p. 1325-34, 2013.

WHITE, C. A.; ROBB, L.; SALAMONSEN, L. A. Uterine extracellular matrix components are altered during defective decidualization in interleukin-11 receptor alpha deficient mice. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 2, p. 76-80. 2004.

WHITELOCK, J. M.; MURDOCH, A. D.; IOZZO, R. V.; UNDERWOOD, P. A. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. **J Biol Chem**, v. 271, p. 10079-10086, 1996.

WOESSNER JR., J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. Review. **FASEB J**, v. 5, n. 8, p. 2145-54, 1991.

WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FROHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, S.; KOLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H.D.; STOJKOVIC, M.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-maternal communication in bovine - strategies for deciphering a complex cross-talk. **Reprod Domest Anim**, v. 38, p. 276-289, 2003.

XIAN, X.; GOPAL, S.; COUCHMAN, J. R. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. **Cell Tissue Res**, v. 339, p. 31-46, 2010.

YAMADA, O.; TODOROKI, J.; TAKAHASHI, T.; HASHIZUME, K. The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation. **J Vet Med Sci**, v. 64, n. 3, p. 207-14, 2002.

YAMANISHI, Y.; BOYLE, D. L.; CLARK, M.; MAKI, R. A.; TORTORELLA, M. D.; ARNER, E. C.; FIRESTEIN, G. S. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. **J Immunol**, v. 168, n. 3, p. 1405-12, 2002.

YOUNG, K. A.; TUMLINSON, B.; STOUFFER, R. L. ADAMTS-1/METH-1 and TIMP-3 expression in the primate corpus luteum: divergent patterns and stage-dependent regulation during the natural menstrual cycle. **Mol Hum Reprod**, v. 10, n. 8, p. 559-65, 2004.

YU, Q.; STAMENKOVIC, I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. **Genes Dev.**, v. 14, p. 163-176, 2001.

ZHANG, J.; HAMPTON, A. L.; NIE, G.; SALAMONSEN, L. A. Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-type 1 MMP: enzymes coordinately expressed in human endometrium. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 1, p. 85-94, 2000.

ZUCKER, S.; MIRZA, H.; CONNER, C. E.; LORENZ, A. F.; DREWS, M. H.; BAHOU, W. F.; JESTY, J. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. **Int. J. Cancer**, v. 75, p. 780-786, 1998.

APÊNDICE A

**Dynamic remodeling of endometrial extracellular matrix regulates embryo
receptivity in cattle**

Saara Scolari^a, Guilherme Pugliesi^a, Ricardo Strefezzi^b, Mario Binelli^{a*}

^a Department of Animal Reproduction, FMVZ-USP, SP, Brazil.

^b Department of Veterinary Medicine, FZEA-USP, SP, Brazil.

*Corresponding author:

Mario Binelli

Av. Duque de Caxias Norte, 225; Pirassununga, SP; 13635900, Brazil

Phone: +55 (19) 3565-4220

email: binelli@usp.br

Abstract

We aimed to evaluate in the bovine endometrium whether (1) key genes involved in endometrial extracellular matrix (ECM) remodeling are regulated by the endocrine peri-ovulatory milieu; and (2) specific endometrial ECM-related transcriptome can be linked to pregnancy outcome. In Experiment 1, pre-ovulatory follicle growth of cows was manipulated to obtain two groups with specific endocrine peri-ovulatory profiles: the Large Follicle-Large CL group (LF-LCL) served as a paradigm for greater receptivity and fertility and showed greater plasma pre-ovulatory estradiol and post-ovulatory progesterone concentrations when compared to the Small Follicle-Small CL group (SF-SCL). Endometrium was collected on days 4 and 7 of the estrous cycle. Histology revealed a greater abundance of total collagen fibers in SF-SCL on days 4 and 7 endometrium. In Experiment 2, cows were artificially inseminated and, six days later, endometrial biopsies were collected. Cows were retrospectively divided into pregnant and non-pregnant (P vs. NP) groups after diagnosis on day 30. In both experiments, expression of genes related to ECM remodeling in the endometrium was studied by RNAseq and qPCR. Gene ontology analysis showed an inhibition in the expression of ECM-related genes in the high receptivity groups (LF-LCL and P). Specifically, there was down-regulation of TGFB2, ADAMTS2, 5 and 14, TIMP3 and COL1A2, COL3A1, COL7A1 and COL3A3 in the LF-LCL and P groups. In summary, the overlapping set of genes differently expressed in both fertility models: (1) suggests that dysregulation of ECM remodeling can impair receptivity and (2) can be used as markers to predict pregnancy outcome in cattle.

Key words: follicle; collagen; corpus luteum; pregnancy; transcriptome; uterus

Introduction

The establishment and maintenance of pregnancy are complex events that require a fine-tuned synchrony between a receptive maternal uterus and the embryo's ability to develop in such environment. The development of histologically and functionally normal endometrium is critical for endometrial receptivity and normal first embryo-maternal interactions. In this context, endometrial tissue remodeling might be a prerequisite to obtain the optimal uterine environment for the young and developing embryo, as previously documented in mice and human studies. When focusing on endometrial morphology, the endometrial extracellular matrix (ECM) is of crucial importance; being the non-cellular component found in all tissues and organs providing physical support for the uterine cells. The ECM is a highly dynamic structure, under constant remodeling by enzymatic or non-enzymatic means in order to maintain tissue homeostasis (Jarvelainen et al., 2009; Schmidt and Friedl, 2010).

Three major classes of biomolecules belong to the ECM: structural proteins (such as collagen and elastin), specialized proteins (such as fibrilins, fibronectines, laminin) and proteoglycans (Alberts et al, 2004; Kim et al, 2011). The ECM's main three functions are: structural, by filling the extracellular spaces of tissues, functional, by mediating cell adhesion, growth, migration and differentiation and regulatory, by controlling the release of growth factors and cytokines by the action of peptidases that can modulate cell physiology (Schenk and Quaranta, 2003; Mott and Werb, 2004; Jarvelainen et al., 2009).

The abundance of endometrial ECM proteins is finely controlled by synthesis and proteolytic degradation. Disturbance of such a critical balance may result in implantation abnormalities and consequently infertility (Skinner et al., 1999). Several proteases are involved in the proteolytic degradation of ECM proteins, but the most prominent are the members of the family of matrix metalloproteinases (MMP), a disintegrins and metalloproteinases (ADAM),

ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin motif) and their inhibitors (TIMPs) (Reiss and Saftig, 2009; Egeblad et al., 2010).

In cattle, the role of ECM remodeling in reproductive processes is poorly comprehended. Most reports on the essence of ECM remodeling for endometrial receptivity and fertility originate from human and rodent studies (Farrar and Carson, 1992; Clark et al., 1993; Das et al., 1997; Hurst and Palmay, 1999). Mishra et al. (2010) studied the expression pattern of MMPs and described the bovine mechanism of ECM regulation pointing to MMPs and ECM metalloproteinase inducer (EMMPRIN) in the endometrium of cyclic and pregnant cows. They showed an attenuated expression of these molecules in day 19 pregnant in comparison to cyclic endometrium. Ulbrich et al. (2011) stressed the importance of high endometrial MMP2 enzymatic activity during the elongation phase of the blastocyst, which may increase the availability of growth factors supporting conceptus development. The latter researchers suggested that an increased TIMP2 abundance in the uterine fluid during trophoblast elongation points to a well-balanced ECM integrity, needed for maintenance of pregnancy (Ulbrich et al., 2011). However, clear information on how the ECM remodeling events can be linked to maternal receptivity in cattle is lacking. This highlights the need to gain more insights in the factors regulating the ECM remodeling in the endometrial tissue during early diestrus. In this regard, sexual steroid hormones are key regulatory factors of the endometrial tissue. Indeed, greater pre-ovulatory estradiol and post-ovulatory progesterone concentrations are associated with increased bovine embryo survival (Perry et al., 2005; Peres et al., 2009; Menegethi et al., 2009; Dardawal et al., 2013). The endometrium expresses both progesterone and estradiol receptors and endometrial functions are modulated by changes in sex steroid concentrations to support conceptus growth and pregnancy maintenance (Robinson et al., 2001; Bazer and Slayden, 2008). Despite their critical importance, specific biological processes and molecular pathways affected by peri-ovulatory variations in sex steroids are

only now starting to be elucidated and have not been sufficiently studied and explored in the endometrium. Most importantly, at least in non-bovine species, ECM remodeling is regulated by steroid hormones (Schroen & Brinckerhoff, 1996; Crawford & Matrisian, 1996; Zhang & Salamonsen, 2002).

In the present study we hypothesize that the level of ECM remodeling events can be regulated by specific endocrine profiles associated with receptivity. Furthermore, we propose that the ECM transcript signature during early pregnancy has a direct relationship with the probability of pregnancy success in cows. Therefore, two bovine fertility models were used to study: (i) the effect of endocrine profiles during peri-ovulatory period on ECM remodeling events on endometrial tissue collected on days 4 and 7 of the estrous cycle and (ii) whether ECM characteristics on day 6 uterine biopsies can be associated to pregnancy outcome.

Materials and methods

Animals

Animal procedures were approved by the Ethics and Animal Handling Committee of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo. The experiments were conducted at the University of São Paulo campus Pirassununga, SP, using adult Nelore (*Bos indicus*) cows, pluriparous, cyclic, non-lactating, without reproductive disorders detectable by gynecological examination and body condition score between 3 and 4 (0 emaciated; 5 obese). All animals were kept in grazing conditions and supplemented with sugar cane and/ or corn silage, concentrate, and minerals to fulfill their maintenance requirements, and water ad libitum.

Experiment 1. Reproductive management and experimental design

Study I. Ovulations were synchronized as described previously by Mesquita et al. (2014). The goal was to manipulate the peri-ovulatory endocrine milieu in order to obtain two groups of animals with distinct pre-ovulatory follicle (POF) and CL sizes and, consequently, contrasting peri-ovulatory endocrine milieus with distinct proestrus/estrus concentrations of E2 and diestrus concentrations of P4. This experimental model was used as a paradigm for lower (Small Follicle-Small CL group; SF-SCL) or greater (Large Follicle-Large CL group; LF-LCL) receptivity and fertility by our group (Perry et al., 2005; Peres et al., 2009; Menegethi et al., 2009; Dardawal et al., 2013; Pugliesi et al., 2015). Briefly, animals were pre-synchronized by two intramuscular (i.m.) injections of prostaglandin F2 α analogue (PGF2 α ; 0.5 mg of sodium cloprostenol; Sincrocio®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos, Brazil), 14 days apart. At the second PGF2 α injection of Presynch (D–20) animals received an EstroTECT Heat detector patch (Rockway, Inc. Spring Valley, WI, USA) device, and estrus detection was performed twice daily from D–19 to D–16 and once daily from D–15 to D–10. Only animals that presented estrus after the second PGF2 α treatment and with a new PGF-responsive CL (at least 5 days old) on D–10 stayed in the experiment. Therefore, the remaining cows (n=41) received a new intravaginal P4- releasing device (1g; Sincrogest®, Ourofino) on D–10 along with an i.m. injection of 2 mg estradiol benzoate (Sincrodiol®, Ourofino Saúde Animal; Fig 1). Simultaneously on D–10, cows from the LF-LCL group received a single i.m. treatment of PGF2 α . The P4 devices were removed eight days later and 42-60h or 30-36h before the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) treatment in the LF-LCL (n=20) and SF-SCL (n=21) groups, respectively. All animals received a PGF2 α injection at P4 device removal. Ovulations were induced in all cows on D0 using GnRH agonist (Buserelin acetate, 10 μ g, i.m.; Sincroforte®, Ourofino Saúde Animal) on D0. Expectation was that POF growth would

be reduced in the presence of greater circulating P4 concentrations in cows from the SF-SCL group because of P4 from both exogenous (device) and endogenous (CL) sources.

In order to assess follicle growth and ovulation of the POF and CL area and blood flow, transrectal ultrasound examinations were carried out on D-10 and D-6, daily from D-2 to D0 and from D3 to D7, and every 12h on D1 to D2. Ultrasound exams were performed with the aid of a duplex B-mode (gray-scale) and Color- Doppler instrument (MyLab30 Vet Gold; Esaote Healthcare, São Paulo, SP, Brazil) equipped with a multifrequency linear transducer. Blood samples were collected via jugular venipuncture in tubes containing heparin (BD, São Paulo, SP, Brazil) on D-1 and D4. Blood samples were immediately stored on ice after collection. In order to obtain plasma, blood was centrifuged at 1500 x g for 30 minutes at 4 °C. The plasma was then aliquoted and stored at -20 °C.

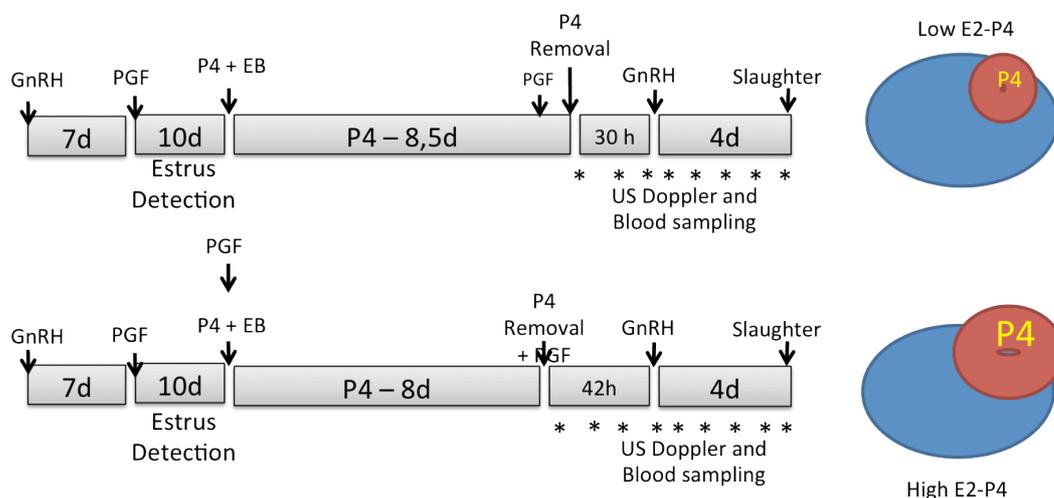
On day 4 of the estrous cycle (day 0 = injection of GnRH to induce ovulation), cows from LF-LCL (n=16) and SF-SCL (n=8) groups were stunned by a captive bolt and slaughtered by jugular exsanguination. The reproductive tract was transported on ice to the laboratory, ovarian structures were measured and weighed and the uterine horn ipsilateral to the ovary bearing the CL was incised longitudinally. Endometrial intercaruncular strips measuring approximately 2.5 cm long and 5 mm wide were dissected from the mid third of the horn. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and then transferred to -80°C until processing for RNA extraction. Another portion of samples was fixed by immersion in 4% buffered formalin for 24 h at 4°C, followed by several washings in PBS. Subsequently, samples were embedded in paraplast, sectioned and processed for histological analysis.

Concentrations of P4 were measured by radioimmunoassay (Coat-A-Count kit progesterone, Siemens Medical Solutions Diagnostics) validated previously for bovine plasma samples (Garbarino et al., 2004). Estradiol concentrations were measured using a commercial RIA kit (Double Antibody Estradiol, DPC, Los Angeles, USA) validated previously for

bovine plasma samples (Siddiqui et al. 2009). The intra-assay CV and sensitivity were 1.7% and 0.13pg/mL for E2; and 0.8% and 0.05ng/mL for P4, respectively.

Study II. Non-lactating, multiparous Nelore (*Bos indicus*) cows (n=83) were submitted to the same hormone protocol described in Study 1 (Fig. 1) to result in the SF-SCL (n=39) and LF-LCL (n=35) groups. Blood collections and collection of endometrial samples were performed as previously described for Study I; exception was that endometrium harvesting was seven days post-induction of ovulation (i.e., D7). The intra-assay CV and sensitivity were 1.7% and 0.13pg/mL for E2; and 0.3% and 0.076ng/mL for P4, respectively. Animals within each group were ranked according to responses to the following endocrine and ovarian variables: concentration of E2 on D-1, concentration of P4 at D7, CL size at D7, CL weight at D7, follicle size at D-2, D-1 and D0 and pre-ovulatory follicle size. The eight top ranked animals of the LF-LCL group and the nine lowest ranked animals of the SF-SCL group were chosen for transcript analysis. Likewise, the top (LF-LCL) and lowest (SF-SCL) three animals were used for RNA-seq analyses. Histological analysis for collagen was performed on samples from Experiment 1 (LF-LCL, D4 n=5, D7 n=4; SF-SCL, D4 n=5, D7 n=4).

Figure 1. Synchronization protocol of the experimental reproductive management of animals to obtain samples from groups with large follicles and CL (LF-LCL) and another group of small follicles and CL (SF-SCL).



Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) at the beginning of the synchronization period, 0.5 mg of prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) seven days after. D-10 2 mg of estradiol benzoate (EB) + intravaginal progesterone-releasing device (1g) Sincrogest® + PGF₂ α (0.5 mg) in the group destined to develop large follicle/CL (LF-LCL) by the end of the protocol. Intravaginal progesterone-releasing device withdrawal and administration of PGF₂ α (0.5 mg) in the LF-LCL group 42 hrs prior to ovulation induction with GnRH. Group SF-SCL PGF₂ α (0.5 mg) administration at the end of the protocol and intravaginal progesterone-releasing device withdrawal after 12 hrs. Slaughter of the animals 4 days after ovulation induction. * Doppler ultrasound and blood collection every 12 hrs.

Experiment 2. Reproductive management and experimental design

As described previously by Binelli et al. (2015), cows were synchronized (n=51) to estrus by injecting two im doses of prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) analogue (0.5 mg sodium cloprostenol; Sincrocio®) 14 days apart. At the time of the second PGF₂ α injection, animals were equipped with an Estroprotect Heat detector patch (Rockway, Inc.) device, and were observed twice daily for six days for estrous behavior. Ultrasound exams were performed 12 hours after estrus in order to confirm the presence and location of a POF. Artificial insemination (AI) was performed in all cows that showed estrous signs (n=33) with cryopreserved semen from a single ejaculate. Six days post-AI, an endometrial biopsy was collected from the uterine horn contralateral to the ovary containing a CL and stored at -80 °C. After the biopsy procedure, cows received two 1 g doses of the anti-inflammatory medication flunixin meglumine (Desflan®, Ourofino) in a 24 hour interval and one dose of Penicillin/Streptomycin base antibiotic (Penfort® Reforçado, Ourofino). A blood sample was collected and plasma P4 concentrations were measured as described for Experiment 1. Pregnancy diagnosis was performed on day 30 post-AI via transrectal ultrasonography exam. RNA-Seq was performed on samples selected retrospectively based on the day 30 pregnancy diagnosis using six samples from each pregnant (P) and non pregnant (NP) animals. Animals were selected based on plasma progesterone concentrations on day 6, that must had been within a 1.5 ng/mL

interval among all animals. Abundance of specific transcripts was quantified by qPCR in ten P and sixteen NP randomly selected animals.

RNA isolation and cDNA synthesis

Endometrial tissue samples (approximately 30 mg) were snap frozen in liquid nitrogen, macerated in a stainless steel apparatus and immediately mixed with buffer RLT from the RNeasy Mini columns kit (Qiagen, São Paulo, São Paulo, Brazil), to be processed according to the manufacturer's instructions. To maximize cell lysis, tissue suspension was passed at least ten times through a 21 G needle, and centrifuged at 13,000 x g for 3 minutes for removal of debris, prior to supernatant loading and processing in RNeasy columns. Columns were eluted with 40 µl of RNase free water, and elution was repeated using the same 40 µl initially used to increase RNA concentration. Concentration and purity of total RNA were estimated using a spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Suwanee, GA, USA). RNA integrity and quantity was assessed by Bioanalyzer (Agilent Technologies Brazil Ltda, São Paulo, SP, Brazil) and only samples with RNA integrity number (RIN) greater than 7 were processed further. Total RNA extracts were stored at -80 °C until subsequent analysis. Immediately prior to cDNA synthesis, samples were treated with DNase I (Life Technologies, São Paulo, São Paulo, Brazil) at room temperature for 15 minutes. DNase I activity was blocked using EDTA solution (25mM) and heating at 65 °C for 10 minutes. Reverse transcription was performed immediately following DNase I treatment using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Life Technologies), according to manufacturer's instructions. Briefly, 9 µL of master mix containing reverse transcription buffer, deoxyribonucleo- tide triphosphate mix, random primers, RNase inhibitor, and reverse transcriptase were added to the 11 µL DNase I treatment reaction. Immediately, 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.

mRNA libraries, sequencing and bioinformatics

For transcriptomic analyses, cDNA was generated using a routine RNA library preparation TruSeq protocol developed by Illumina Technologies (San Diego, CA, USA) using 4 µg of total RNA as input. Preparation involved mRNA isolation from total RNA by a polyA selection step, followed by construction of paired-end sequencing libraries with an insert size of 300 bp. Briefly, mRNA was selected by oligo-dT magnetic beads and fragmented into small pieces using divalent cations. Cleaved mRNA fragments were copied into first-strand cDNA using reverse transcriptase and random primers, which was followed by second-strand cDNA synthesis using DNA polymerase I. The cDNA fragments then underwent an end repair process, the addition of a single A base, and then ligation of the adapters. Resulting products were amplified via PCR and cDNA libraries were then purified and validated using the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Paired-end sequencing was performed using the Illumina HiScanSq 2000 platform. The paired end (PE) reads were filtered using the package Seqclean v1.4.13, (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>). The reads were mapped using the local alignment with Bowtie2 against the masked *Bos taurus* genome assembly (*Bos Taurus* UMD3.1). The mapping file was sorted using SAMTools v 0.1.18 (Handsaker et al., 2010) and read counts were obtained using HTSeq-count v0.5.4p2 (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/count.html>). The differential expression analysis was performed with package DESeq v1.12.1 (Andres & Huber, 2010), from R (Gentleman et al., 2004) for samples of Experiment 1. For samples of Experiment 2, the differential expression analysis was performed with package DESeq2 v1.12.1 (Love et al., 2014) from R (Gentleman et al., 2004). The standard deviation along the baseMean values was also calculated for each

transcript. In order to avoid artifacts caused by low expression profiles and high expression variance, only transcripts that had an average of baseMean > 5 and the mean greater than the standard variation were analyzed. The threshold for evaluating significance was obtained by applying a p-value of 0.05 FDR-Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochber, 1995). Integrated analysis of different functional databases was done using the functional annotation tool of the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIAID/NIH) using as background the transcribed genes found (Dennis et al., 2003).

Design and validation of primers, and quantitative real-time PCR

Quantitative PCR reactions were performed using the StepOnePlus® apparatus (Life Technologies). Primer sequences were either obtained from the literature or designed by Primer Express software V.3.0. 1 (Life Technologies, Frederick, Maryland, USA) (Table 1). Each newly designed primer pair was selected based on the Gibbs free energy (ΔG) values for hairpin, homodimers, and heterodimers formation indicated by the Oligo Analyzer 3.1 software (IDT; <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Primers were subsequently checked for specificity using the Basic Local Alignment Search Tool (Blast; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Selected primer pairs were evaluated to determine the optimal primer concentration by using a pool of endometrial cDNA, at a 1:80 dilution. Each primer pair was tested in reactions prepared with the following primer concentrations: 150, 300 or 600 nM. Optimal primer concentrations was determined based on the lowest primer concentration that obtained amplification efficiency between 85 and 100%, presented a single amplification peak and had no peaks detected on the negative control reactions, in the dissociation curve, and generated the lowest cycle quantification (Cq) value. Additionally, the standard curve amplification

efficiency was determined based on a standard curve, generated by a serially diluted cDNA pool with at least 5 dilutions. Acceptable standard curve efficiencies were between 83 – 100% and r^2 close to 1.

Relative abundance of specific transcripts between LF-LCL and SF-SCL samples (Experiment 1) and pregnant and non-pregnant samples (Experiment 2) was assessed by 20 μ l reactions in a 96-well plate, sealed with MicroAmp optical adhesive cover (Life Technologies), in triplicates. Raw fluorescence data was extracted from the Step One Plus apparatus with no baseline correction and submitted to LinRegPCR software for baseline correction, determination of PCR efficiency and cycle quantification (Cq) values per sample. Cq values were obtained from the LinReg PCR software. The log-linear portion of the amplification curve used for analysis on LinReg PCR software contained from four to six points with the highest R2 value. Relative quantification for all tested genes was processed according to the $\Delta\Delta C_t$ method, using cyclophilin as a reference gene. Identity of the PCR amplification product was confirmed by sequencing.

Table 1. Characteristics of the primers used in the measurements of transcripts related to endometrial extracellular matrix remodeling.

Gene	Gene Symbol	Representative ID	Sense primer	Anti -sense primer
ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS 1	NM_001101080.1	CAGGAACTGGA AGCCTAAAAA	GAGAACAAGGT CAGAAGGAGTG
ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 2	ADAMTS 2	NM_174631.2	CTCCATCCCAGG CTACAATAAG	GCATTGGTGCTG GAAGTATG
ADAM metallopeptidase	ADAMTS 5	NM_007038.3	GTGGTCGGAAC CTTCAATAA	GGCTAAGTAGG CAGTGAATC

with thrombospondin type 1 motif, 5	ADAM	ADAMTS	NM_080722.3	GGGACAGGTCC ATCTTCT	TCTAGGCTCAA GGTCTTCTT
with thrombospondin type 1 motif, 14	Matrix	MMP2	NM_174745.2	CCCAGACAGTG GATGATGC	TTGTCCTTCCTC CCAGGGTC
Metallopeptidase 2	Matrix	MMP14	NM_174390.2	TGCCGAGCCTTG GACTGT	GCCACCAGAAA GATGTCATTCC
Metallopeptidase 14	Transforming Growth Factor, beta 1	TGFB1	NM_001166068.1	CCTGCTGAGGCT CAAGTTAAAG	GCCACTGCCGC ACAACCTCC
Transforming Growth Factor, beta 2	TGFB2	NM_001113252.1	AATTTGGTGAA GGCCGAGTTC	GGTTTTACGAC TTTGCTCCA	
Transforming Growth Factor, beta 3	TGFB3	NM_001101183.1	TTACTGCTTCCG CAATTTCA	TCTGAGCTGCG GAGGTATG	
Metallopeptidase Inhibitor 1	TIMP1	NM_174471.3	GAGTTTCTCATA GCTGGACAAT	GCATAGGTCTTG GTGAATCC	
Metallopeptidase Inhibitor 2	TIMP2	NM_174472.4	TGCAGACATAG TGATCAGGGCC A	AATCCGCTTGAT GGGGTTGCCG	
Metallopeptidase Inhibitor 3	TIMP3	NM_174473.4	GCCCTTTGGCAC GATGGTCT	TAGACTCGGCCT GTCACCAGGT	
Collagen 1A2	COL1A2	NM_174520.2	GGATACGCGGA CTTTGTTC	CTCCACTTGGGC CCTTTCT	
Collagen 3A1	COL3A1	NM_001076831.1	ACTGGTGCTCCT GGATTAAAG	CTTCCTCGAGCT CCATCATTAC	
Collagen 4A1	COL4A1	NM_001166511.1	GGTTCCGTAG GATTGAAAG	GAAGCCTATCT GTCCTTTGTC	
Collagen 4A2	COL4A2	XM_010810991.1	CAACGGTTACG TCGAGAAG	CTTCAAGGAGA CGCCTATTC	
Collagen 4A5	COL4A5	XM_002699860.3	GCAGGAGAGAA AGGTAGTAAAG		
Versican	VCAN	NM_181035.2	CATGGCAGGAT AACTGAAGG	CGTGGAGTGGG AGAAATAAC	
Lumican	LUM	NM_173934.1	GGAGCTGGATC TCTCCTATAA	TGATCTTGGAGT AGGATAGGG	

Masson's trichrome staining

Histological sections were deparaffinized in xylene, rehydrated through a graded series of ethanol (100%, 95% and 70%), rinsed in running tap water for 10 minutes and a final rinse in distilled water. Tissues were stained in Weigert's iron hematoxylin working solution for 10 minutes, rinsed in running tap water for 10 minutes and in distilled water. Then tissues were stained in Biebrich scarlet-acid fuchsin solution for 15 minutes and washed in distilled water placed in phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution for 10 minutes and transferred directly (without rinse) to aniline blue solution and stained for 15 minutes. Next, tissues were washed in running tap water and rinsed briefly in distilled water then immersed in 1% acetic acid solution for 3 minutes. The tissues were washed in distilled water, dehydrated very quickly through 95% ethyl alcohol, absolute ethyl alcohol and cleared in xylene. Finally tissues were mounted under a cover-slip. Quantitative analysis was performed using images from 5 different fields randomly selected from each slide (magnification 40×), taken with a digital camera attached to the microscope. The images were stored and analyzed by Image-J® software. The area and corresponding pixels represented by a range of the color blue, representing collagen fibers was calculated and represented as percentage. The final value was calculated as the average of the 5 different evaluated fields.

Picrosirius Red staining

Histological sections were deparaffinized in xylene, rehydrated through a graded series of ethanol (100%, 95% and 70%), rinsed in running tap water for 10 minutes and a final rinse in distilled water. Then the tissues were stained in picrosirius red (commercially available Sigma-Aldrich) for one hour and after it they were rinsed in running tap water for 10 minutes and a final rinse in distilled water. The tissues were dehydrated very quickly through 95% ethyl alcohol, absolute ethyl alcohol and cleared in xylene. The tissues were finally

mounted under a cover-slip. The histological samples were classified with respect to the quality of collagen by using a polarized light microscope with a digital camera (AxioImager.A2 e AxioCam MRc, Zeiss) and software for image capturing images (AxioVision, versão 4.9.1, Zeiss). Collagens were identified by green (thin and disperse fibers) or yellow-red (thick tightly packed) refringence. Quantitative analysis was performed using images from 3 different fields from each slide (magnification 20×), with a digital camera attached to the microscope. The images were stored and analyzed using Image-Pro Plus® software (Media Cybernetics).

Statistical analyses

The data were tested for normality of residues using Shapiro-Wilk test. Data that were not normal were transformed by log10. Ovarian, endocrine and transcript abundance variables were analyzed by one-way ANOVA to test the effect of group (LF-LCL vs. SF-SCL) using the PROC GLM procedure of the SAS software (Version 9.2; SAS Institute). Histology data were analyzed by two-way ANOVA to test the effect of group, region (superficial vs. deep glandular epithelium) and the interaction. Minitab16 software (Minitab, Inc., State College, PA) was used for Pearson's correlation and regression analysis, irrespective of experimental group.

Results

Experiment 1. Influence of periovulatory hormonal modulation on endometrial ECM remodeling characteristics on day 7 of the estrous cycle.

Animal model

Results from the animal model used here were reported previously (Mesquita et al., 2015, submitted to *Biology of Reproduction*). Briefly, in Study I, follicle diameter on D-1, plasma concentration of E2 on D-1, CL area on D4 and plasma concentration of P4 on D4 were 38.81, 275.54, 65.68 and 75% greater for the LF-LCL compared to the SF-SCL group, respectively ($P < 0.01$). Similarly, in Study II, follicle diameter on D0, plasma concentration of E2 on D-1, CL volume on D7 and plasma concentration of P4 on D7 were 23.99 ($P < 0.01$), 360 ($P < 0.01$), 61.67 ($P < 0.04$) and 47.79% ($P < 0.04$) greater for the LF-LCL compared to the SF-SCL group, respectively.

ECM related gene expression

A comprehensive analysis of the RNA-seq data of Experiment 1 was reported previously (Mesquita et al., 2015, submitted to *Biology of Reproduction*). Briefly, the analysis of day 7 endometrial LF-LCL versus SF-SCL samples yielded a total of approximately 134 million reads and approximately 62% of the total reads uniquely mapped to the UMD 3.1 reference genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/cow/index.html>). After applying the filter for variance and minimal value of baseMean, a total of 562 genes showed differential expression (adjusted P-value < 0.1), of which 364 and 198 were up-regulated in the endometrium of LF-LCL and SF-SCL animals, respectively. Functional enrichment analysis for the SF-SCL endometrial tissue revealed clusters with overrepresented ontology terms and

activation of pathways associated with extracellular matrix region and organization (Table 2) which were then focus of further study.

Table 2. Functional enrichment of pathways related to ECM remodeling upregulated in the endometrium of SF-SCL cows on D7. P represents non-adjusted probabilities.

Category	Term	Count	P-Value	Fold Enrichment
GOTERM_CC_FAT	collagen	9	3,16E+09	11.61
GOTERM_CC_FAT	fibrillar collagen	6	8,17E+08	23.22
	extracellular matrix			
GOTERM_MF_FAT	structural constituent	7	8,70E+10	8.9
	collagen fibril			
GOTERM_BP_FAT	organization	6	1,55E+12	10.5
GOTERM_MF_FAT	growth factor binding	6	0.040	3.14
GOTERM_BP_FAT	skin development	3	0.107	5.28
GOTERM_BP_FAT	epidermis development	5	0.134	2.51
GOTERM_BP_FAT	ectoderm development	5	0.157	23.7
	blood vessel			
GOTERM_BP_FAT	development	6	0.521	12.5
GOTERM_BP_FAT	vasculature development	6	0.544	1.22

Histological evaluation of collagen content and composition

The Masson's trichrome staining method was used to determine the abundance of total collagen in the endometrium. Results from days 4 and 7 endometrial tissue analysis showed a significant difference between LF-LCL versus SF-SCL groups ($p=0.01$) and ($p=0.002$) respectively with an increase in collagen content in the low-receptive SF-SCL group (Table 3; Figure 2). On day 4, there was a negative correlation between preovulatory follicle (POF) size and the abundance of collagen fibers in the superficial glandular epithelium (SGE) and deep glandular epithelium (DGE) (-0.737 , $p=0.015$; -0.621 , $p=0.055$, respectively). A negative correlation was also observed between P4 concentration and DGE (-0.700 , $p = 0.024$) on day

4. On day 7, a greater abundance of collagen fibers was observed in the DGE compared to the SGE in both treatment groups ($p=0.0008$). Negative correlations between POF with SGE (-0.700 , $p=0.024$) and DGE (-0.557 , $p=0.94$), and between P4 and SGE (-0.817 , $p=0.004$) on day 7 were detected. Regression analysis revealed a negative linear correlation between collagen abundance on DGE and POF size at D4 ($R^2:0.38$, $p=0.05$) and D7 ($R^2:0.47$, $p=0.02$). Additionally, negative correlation was observed between collagen abundance on SGE and P4 concentrations at D7 ($R^2: 0.85$, $P=0.00$) (Table 4). At D4, the abundance of collagen present in the SGE had a negative quadratic correlation to POF size ($R^2: 0.76$, $P=0.03$; Table 4).

Table 3. Collagen abundance detected through Masson's Trichrome stain on days 4 and 7 of the estrous cycle in cows with distinct hormonal profile, Small Follicle-Small Corpus Luteum (SF-SCL); Large Follicle-Large Corpus Luteum (LF-LCL).

End Point	SF-SCL		LF-LCL		Effects (P-value)		
	Superficial	Deep	Superficial	Deep	Group	Region	G*R ^a
Collagen abundance on Day 4 (%)	28.0±3.1	30.4±2.3	23.4±5.4	26.5±3.4	0.013	0.089	0.837
Collagen abundance on Day 7 (%)	30.6±3.1	41.4±2.8	26.1±5.4	31.8±3.4	0.002	0.008	0.170

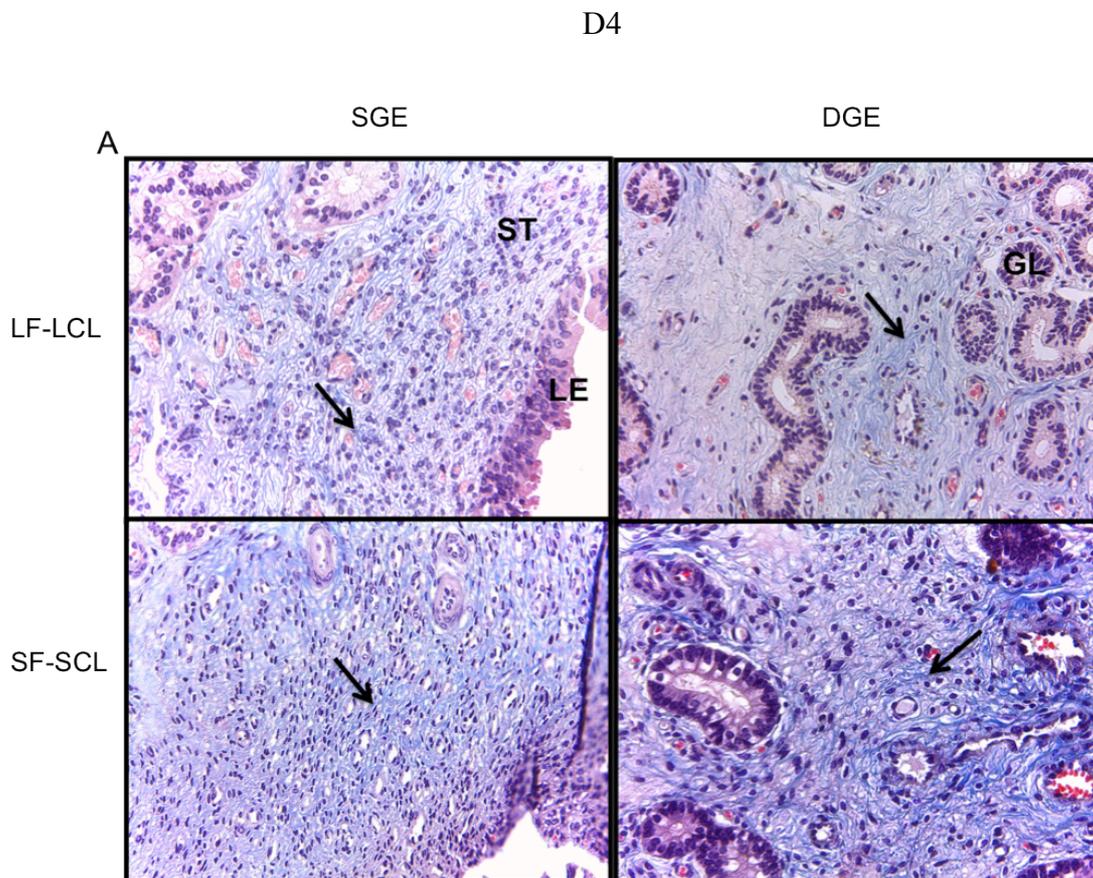
^aG*R=interaction between group and region

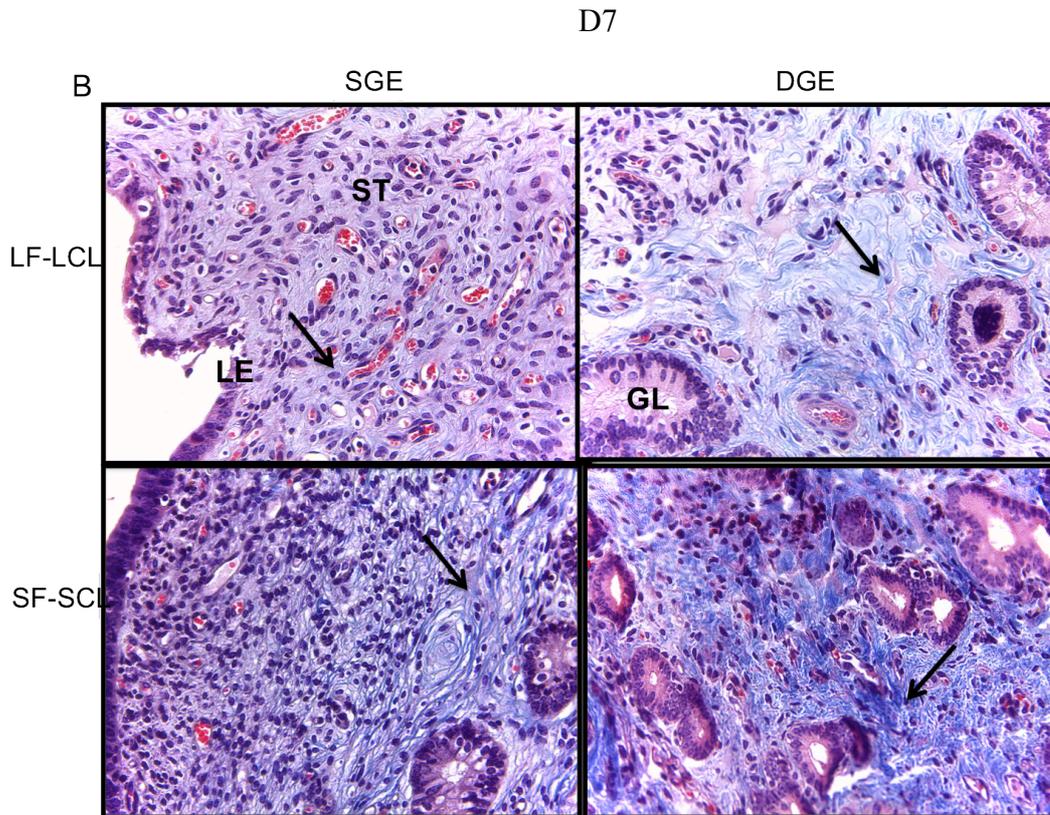
Table 4. Regression analysis between the abundance of total collagen in the superficial glandular epithelium (SGE) and deep glandular epithelium (DGE) in samples from days 4 and 7 between cows with distinct hormonal profiles, Small Follicle-Small Corpus Luteum (SF-SCL) and Large Follicle-Large Corpus Luteum (LF-LCL).

Variables				
Y	X	r^2	P-value	Equation
SGE D4	POF ^a	0.76	0.03	$Y = -59693 + 14278 - 564,5X^2$
DGE D4	POF ^a	0.38	0.05	$Y = 39022 - 771.9X$
SGE D7	P ₄ ^b	0.85	0.00	$Y = 32106 - 2556X$
DGE D7	POF ^a	0.47	0.02	$Y = 55602 - 1682X$

^aPre-ovulatory follicle; ^bProgesterone; Significant $p < 0,1$

Figure 2 – Collagen arrangement in the endometrium of cows from SF-SCL and LF-LCL groups on D4 (A) and D7 (B). Sections were stained with Masson's Trichrome stain, and images from superficial glandular epithelium (SGE) and deep glandular epithelium (DGE) were taken using polarized light at 40× magnification.





Figures 2. Panel A shows histological sections from day 4 and panel B shows histological sections from day 7 stained with Masson's Trichrome stain. ST=Stroma; LE=Luminal Epithelium; GL=Gland; Arrows indicate collagen fibers colored in blue.

The Picrosirius red special stain was used because collagen molecules, being rich in basic amino acids, strongly react with acidic dyes. Sirius red, a strong cationic dye, stains collagen by reacting with sulfonic acid and basic groups present in the collagen molecules promoting the enhancement of its normal birefringence. The latter is due to the fact that many dye molecules are aligned parallel with the long axis of the each collagen molecule (Junquiera and Montes, 1991). Through polarization microscopy, two different types of collagen could be distinguished in the endometrial samples: greenish thin fibers (weakly birefringent), typical of collagen type III and red-orange thick fibers (strongly birefringent), typical of collagen type I. After evaluation, no difference in the amount of thick and thin fibers was observed between the experimental groups ($p > 0.05$). There was also no difference in

distribution between thin and thick fibers, between regions ($p>0.05$) (Table 5, Figure 3). Regression analysis indicated a negative linear correlation between the abundance of thin collagen fibers in the SGE and POF size ($R^2: 0.63, P=0.00$) as well as between DGE and POF size ($R^2: 0.63, P=0.00$) at D4 (Table 6). The abundance of thick collagen fibers also showed a negative linear correlation with POF size at D4 ($R^2: 0.49, p=0.02$, Table 6). Furthermore, a negative quadratic correlation was observed between the abundance of thin collagen fibers in the DGE and P4 concentrations at D4 ($R^2: 0.70, P=0.04$) and a negative cubic correlation between the abundance of thin collagen fibers in the DGE and P4 concentrations at D7 ($R^2: 0.90, p=0.00$; Table 6

Table 5. Collagen abundance detected through Picrosirius stain on days 4 and 7 of the estrous cycle in cows with distinct hormonal profile, Small Follicle-Small Corpus Luteum (SF-SCL); Large Follicle-Large Corpus Luteum (LF-LCL).

End Point	SF-SCL		LF-LCL		Effects (P-value)		
	Superficial	Deep	Superficial	Deep	Group	Region	G*R ^a
Thin fiber abundance on Day 4 (%)	28.5±1.8	29.1±1.9	28.3±2.5	29.6±2.9	0.107	0.434	0.541
Thick fiber abundance on Day 4 (%)	29.4±2.6	30.5±1.6	28.8±2.1	29.8±2.3	0.151	0.342	0.433
Thin fiber abundance on Day 7 (%)	29.6±1.0	30.1±2.3	27.9±1.5	28.6±1.6	0.145	0.335	0.367
Thick fiber abundance on Day 7 (%)	29.0±2.2	30.1±1.8	29.3±2.3	29.4±1.5	0.112	0.448	0.360

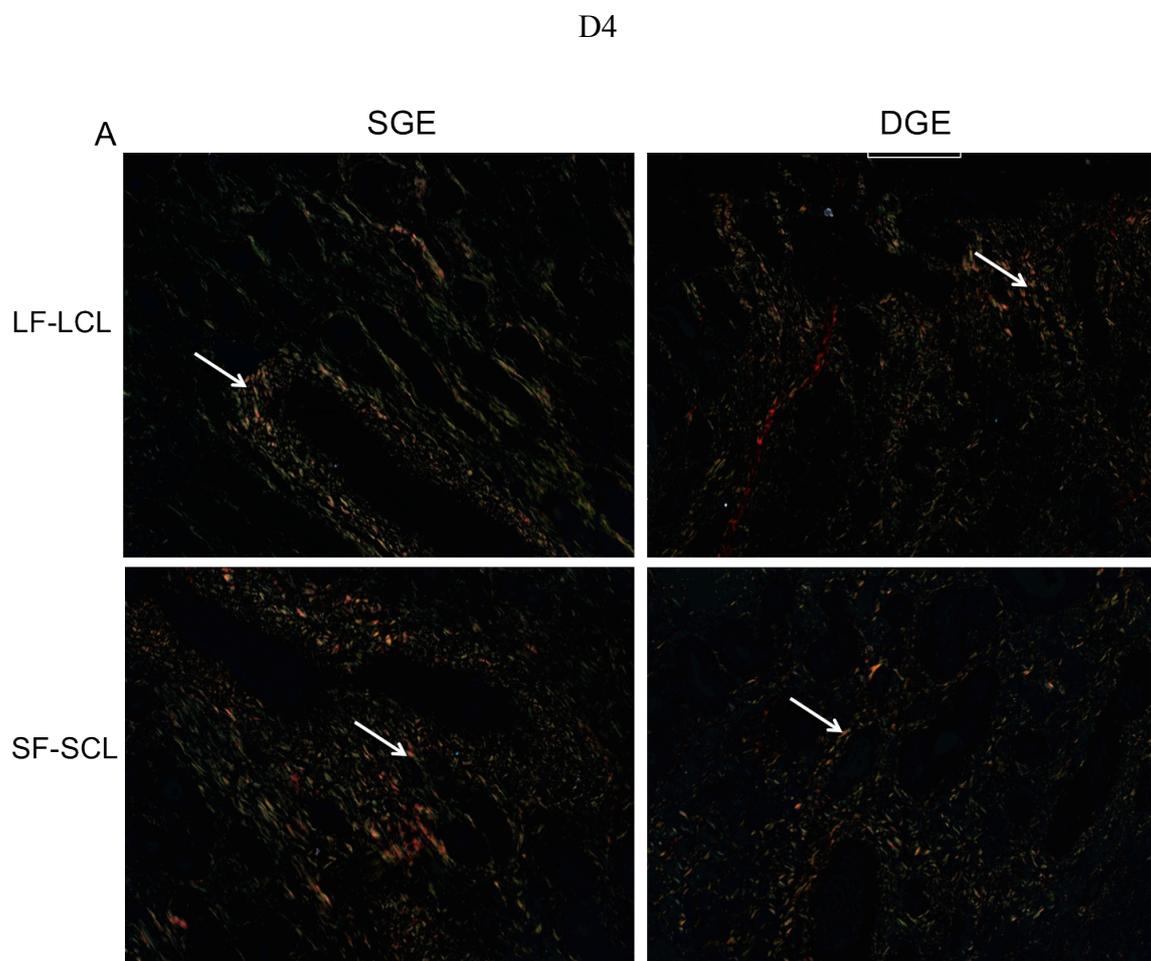
^aG*R=interaction between group and region

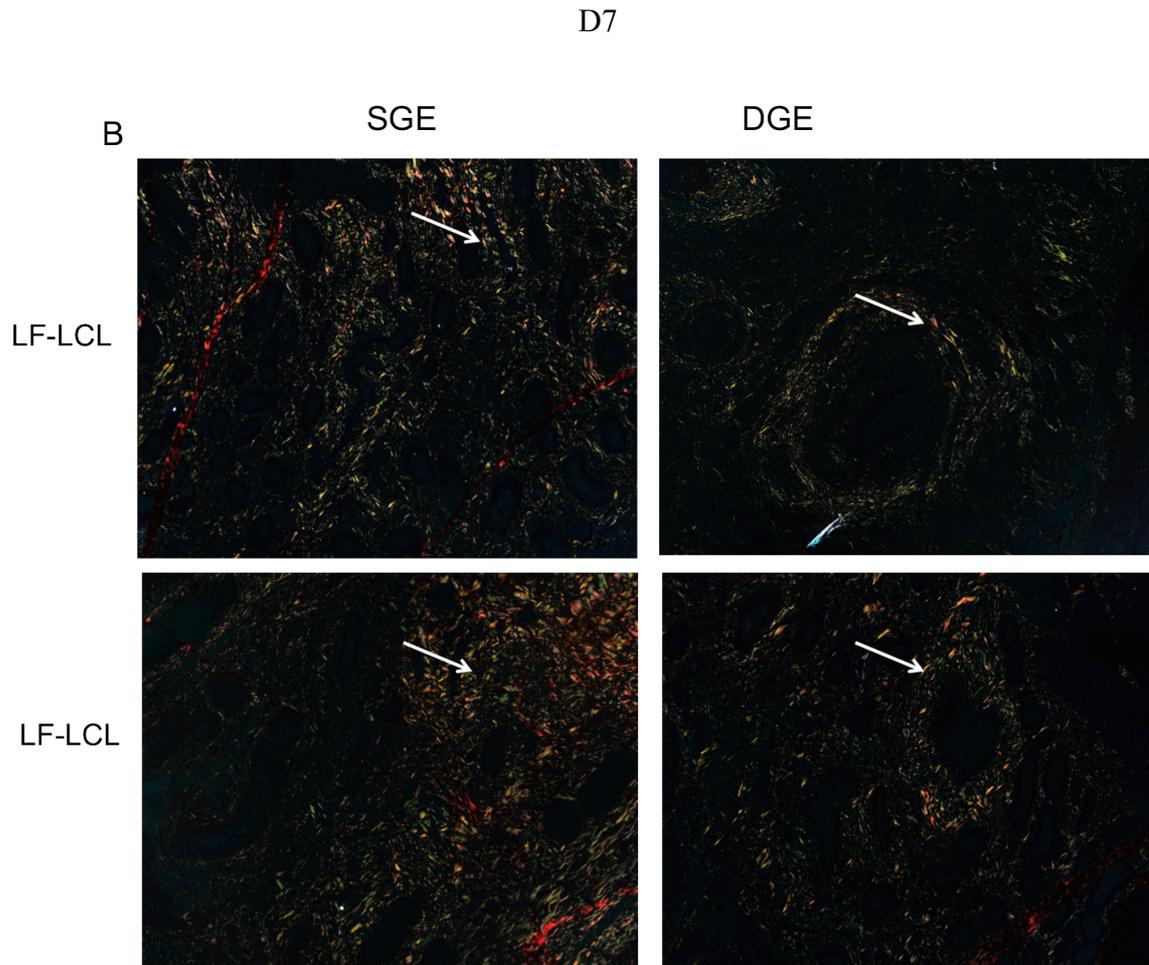
Table 6. Regression analysis between the abundance of thick and thin collagen fibers in the superficial glandular epithelium (SGE) and deep glandular epithelium (DGE) in samples from days 4 and 7 between cows with distinct hormonal profiles, Small Follicle-Small Corpus Luteum (SF-SCL) and Large Follicle-Large Corpus Luteum (LF-LCL).

Variables		r^2	P-value	Equation
Y	X			
SGE Thin Fiber D4	POF ^a	0.63	0.00	$Y = 44032 - 1048X$
DGE Thin Fiber D4	POF ^a	0.63	0.00	$Y = 40013 - 775.5X$
DGE Thin Fiber D4	P ₄ ^b	0.70	0.04	$Y = 38046 - 11493 + 2647X^2$
DGE Thick Fiber D4	POF ^a	0.49	0.02	$Y = 36525 - 537.9X$
DGE Thin Fiber D7	P ₄ ^b	0.90	0.00	$Y = 21273 + 16779 - 7869X^2 + 1029X^3$

^aPre-ovulatory follicle; ^bProgesterone; Significant $p < 0,1$

Figure 3 - Collagen arrangement in the endometrium of cows from SF-SCL and LF-LCL groups on D4 (A) and D7 (B). Sections were stained with Picro Sirius red stain, and images from superficial glandular epithelium (SGE) and deep glandular epithelium (DGE) were taken using polarized light at 10× magnification.





Figures 2. A and B show histological sections stained with Picrosirius stain and analyzed under polarized light. Arrows indicate collagen fibers colored in variations of red and green, indicating red as thicker collagen fibers and green as thinner collagen fibers.

Experiment 2 – ECM remodeling in day 6 endometrial biopsies and its relation to ongoing pregnancy success.

Animal model

Results from the animal model used here were reported previously (Binelli et al., 2015). A total of 51 cows were synchronized and 33 displayed estrus, ovulated and hence, received AI. Cows showing P4 concentrations on day 6 post-AI between 4.3 to 5.8 ng/mL were selected for RNA sequencing P (n = 6) and NP (n = 6).

ECM related gene expression

A comprehensive analysis of the RNA-seq data of Experiment 2 was reported previously (Binelli et al., 2015). Briefly, endometrial ECM related gene expression levels in P versus NP day 6 endometrial tissue P and NP samples were analyzed in an Illumina single flow cell line. The 272,685,768 million filtered reads were mapped to the Bos taurus UMD3.1 reference genome and 14,654 genes were effectively analyzed for differential expression between groups. From six biopsies collected in the NP cows, one sample did not align with the bovine genome and was omitted from the analysis. Transcriptome data showed that 216 genes are differently expressed when comparing P versus NP endometrial tissue ($P_{adj} < 0.1$). More specifically, 36 genes showed a significantly up-regulated expression for pregnant cows and 180 are up-regulated for non-pregnant cows. Functional annotation clustering for the NP group revealed most significantly enriched pathways also associated with ECM remodeling (Table 7).

Table 7. Functional enrichment of pathways related to ECM remodelling upregulated in the endometrium of NP cows on D6. P represents non-adjusted probabilities.

Category	Term	Count	P-Value	Fold Enrichment
GOTERM_CC_FAT	proteinaceous extracellular matrix	14	1,66E+08	77.7
GOTERM_CC_FAT	extracellular region	30	1,75E+08	3.0
GOTERM_CC_FAT	extracellular matrix	14	4,79E+08	7.1
GOTERM_CC_FAT	extracellular region part	19	4,79E+08	4.0
GOTERM_CC_FAT	basement membrane	8	9,00E+07	20.1
GOTERM_CC_FAT	extracellular matrix part	9	1,11E+09	14.8
GOTERM_BP_FAT	extracellular structure organization	6	6,75E+11	839.5
GOTERM_BP_FAT	extracellular matrix organization	5	0.002	896.0
GOTERM_BP_FAT	regulation of cell adhesion	5	0.003	8.1
GOTERM_BP_FAT	positive regulation of cell-substrate adhesion	3	0.014	16.1
GOTERM_BP_FAT	regulation of cell-substrate adhesion	3	0.029	10.9
GOTERM_BP_FAT	positive regulation of cell adhesion	3	0.035	9.8

Experiment 1 and 2. Overlapping ECM related gene expression

The RNA-seq data suggest that most enriched pathways in the SF-SCL and NP groups play a relevant role in endometrial extracellular matrix remodeling. Therefore, we focused on the expression of such genes and used quantitative real-time PCR (qRT-PCR) to compare samples from LF-LCL and SF-SCL animals on days 0, 4 and 7 of the estrous cycle in order to detect changes due to a distinct periovulatory endocrine milieu (Supplemental Tables 1 and 2). The same was done for samples from P and NP animals (Supplemental Table 2). The mRNA expression of *TGFb1* was increased in the NP group and *TGFb2* was increased in both NP as well as in the SF-SCL group on day 7. *MMP2* was increased on day 0 in the LF-LCL. A similar mRNA expression pattern was observed for *MMP2*, *MMP11* and *MMP14* for the NP group. Since Metalloproteinases inhibitors are a crucial factor to control MMP activity in endometrial ECM remodeling in humans (Irwin et al. 2001) we investigated its mRNA expression. *TIMP1* and *TIMP4* expression significantly increased in the SF-SCL and NP groups respectively while *TIMP3* was higher expressed in both SF-SCL and NP groups.

Expression of *TIMP2* was not influenced by steroid hormone levels nor the animal's receptivity status. A significant increase ($p < 0,05$) in several *ADAM* and *ADAMTS* mRNA expression level was observed in both SF-SCL and NP groups. In both experiments, the expression of mRNA was increased in several collagens including, collagen type I (*COL1A2*), collagen type III (*COL3A1*), collagen type VII (*COL7A1*) and collagen type IX (*COL9A3*), although other types of collagens were independently overexpressed in each individual experiment (Table 8). According to the gene ontological classification, such collagens, especially *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL4A1* and *COL4A2* are essentially involved ECM receptor interaction pathway and structure organization and hence, remodeling.

Table 8. ECM related genes and its values detected in the RNAseq data comparing pregnant and non-pregnant (P vs. NP) cows and cows with distinct periovulatory milieu (SF-SCL vs. LF-LCL)

Ensembl Id	Gene Symbol	SF-SCL vs. LF-LCL			NP vs. P		
		Fold Change	log2 Fold Change	P value	Fold Change	log2 Fold Change	P value
ENSBTAG00000020457	TGFB1	1.24	0.31	0.627	2.36	0.55	0.018
ENSBTAG0000005359	TGFB2	1.77	0.82	0.053	-2.39	-0.45	0.016
ENSBTAG00000012004	TGFB3	1.22	0.29	0.93	0.16	0.04	0.870
ENSBTAG0000005043	TIMP1	1.48	0.57	0.017	-0.63	-0.20	0.527
ENSBTAG00000010899	TIMP2	0.86	-0.216	0.368	0.09	0.01	0.927
ENSBTAG00000020638	TIMP3	0.68	-0.55	0.032	3.22	0.49	0.001
ENSBTAG00000019267	MMP2	1.37	0.45	0.240	2.40	0.63	0.016
ENSBTAG00000014824	MMP14	1.44	0.52	0.134	2.54	0.54	0.010
ENSBTAG00000014665	ADAMTS2	1.46	0.54	0.054	2.84	0.63	0.004
ENSBTAG00000000648	ADAMTS5	1.71	0.77	0.000	1.73	0.45	0.08
ENSBTAG00000013103	COL1A1	1.49	0.58	0.058	0.32	0.10	0.745
ENSBTAG00000013472	COL1A2	1.55	0.63	0.001	1.96	0.48	0.049
ENSBTAG00000021466	COL3A1	1.62	0.69	0.000	2.04	0.52	0.040
ENSBTAG00000012849	COL4A1	1.37	0.46	0.032	1.09	0.25	0.274
ENSBTAG00000014575	COL4A5	0.63	-0.64	0.027	-	-	-

Discussion

Peri-ovulatory regulation of mice and human endometrial tissue remodeling has been considered a prerequisite for proper maternal receptivity. In comparison with the latter species, cows are expected to exhibit a much more limited degree of tissue remodeling during the reproductive cycle. However, recent studies identified ECM remodeling pathways as potential key for acquisition maternal receptivity (Mesquita et al., 2015) and pregnancy success (Binelli et al., 2015). Though, so far, clear bovine insights in how, and to which extent, the ECM remodeling events are being regulated during early diestrus are lacking. Therefore, the present study focused on characterization of the ECM signature of the bovine endometrial tissue during early diestrus.

The first set of experiments revealed that specific peri-ovulatory endocrine profiles do impact on the ECM related transcriptome signature of day 4 and day 7 endometrial tissue. More specifically, higher mRNA levels for *MMP2*, *COL1A2*, *TIMP1*, all genes encoding compounds involved in ECM remodeling processes, were observed in the SF-SCL endometrial tissue compared to the LF-LCL counterparts. The process of extracellular matrix remodeling is a dynamic process that requires the degradation of its components. In this context, collagenases, such as the MMPs, are considered as key mediators triggering degradation of the main ECM components (Nagase et al., 2006). More specifically, collagenases (*MMP-1*, *-8*, and *-13*) cleave the interstitial collagens I, II, and III. The denatured collagen, or gelatin, is further degraded by gelatinases (*MMP-2*, and *-9*) (Sluijter et al., 2006; Snoek et al., 2005). Interestingly, based on the temporal fluctuations in gene expression levels between day 4 and day 7 endometrial tissue, a clear switch in ECM remodeling activity can be reported during early diestrus. Thereby, the data seem to confirm that a physiological reorganization of the ECM during diestrus is required in order to promote a receptive endometrial state. Salilew-Wondim et al. (2010) also confirmed a higher expression of *COL1A1*, *COL1A2* and *COL27A1* in cows with a lower receptivity as seen in our animals with SF-SCL. Moreover, a study performed in cows revealed that genes related to extracellular matrix remodeling are more abundant at estrus, whereas at diestrus the more prominent genes are related to immune response and metabolic pathways (Mitko et al. 2008). Besides the gene expression data pointing to ECM remodeling events at transcriptome level, colorimetric assessments were used to evaluate potential phenotypic differences in endometrial ECM remodeling. Overall, the collagen visualization revealed a greater abundance of total collagen fibers in the SF-SCL group both on days 4 and 7. Remarkably, on day 4, follicle size appeared to have a greater influence on difference in collagen abundance in both epithelia, when compared to data retrieved on day 7. At the latter timing, only in the

superficial glandular epithelium collagen content was affected by follicle size and P4 concentration. Apparently, endometrial tissue samples did not show any difference in collagen thickness between the experimental groups (SF-SCL vs. LF-LCL). The latter may be due to the early diestrus timing of sample collection, since according to Yamada et al. (2002) documented on a change in fiber distribution was becoming evident by day 14 of the estrous cycle.

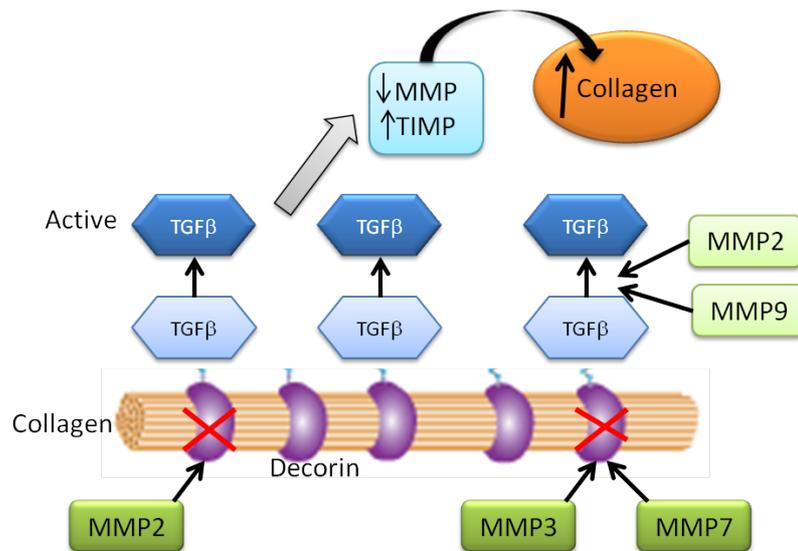
The bovine data documented in the present study, match with human data available in the present study, similar differences in ECM transcripts, as well as effective collagen abundance, are reported when comparing receptive versus low-receptive endometrial samples during early diestrus. Data from human studies also previously showed that hormonal profiles modulate changes in the ECM's composition and distribution (Marbaix et al., 1992; Rodgers and William, 1994; Curry et al., 2001). During the process of decidualization, the expression of MMPs is inhibited and TIMPs are stimulated hence, endometrial MMP expression appears to be negatively regulated by P4. Expression of MMPs is suppressed during the secretory phase of the cycle and increased at menstruation (Osteen et al., 1999). In this context, women with unexplained infertility and recurrent miscarriages exhibit higher expression of for collagen type I, MMP2 and TIMP1 (Jokimaa et al., 2002).

In second experiment described in the present study, the transcriptome signature from day 6 uterine biopsies, all collected in the same cycle of the AI, was determined with particular focus on ECM remodeling pathways. This implies that, data on pregnancy outcome could be retrospectively linked with endometrial transcript characteristics. Samples were collected from contralateral uterine horn in relation to the pregnancy without a negative effect on pregnancy outcome as previously reported (Pugliesi et al., 2014). Main pathways in day 6 P versus NP uterine tissue were related to extracellular matrix (ECM) remodeling processes. Indeed, *COL7A1* and *ADAM12*, which are genes associated with extracellular matrix

formation, belong to the top-20 list of genes with down-regulated expression in the P uterus. In addition, *MMP11* also had a higher expression in the NP group, which has been linked to cell proliferation properties. This is in line with a study conducted by Bauersachs et al. (2006) indicated that the expression of collagen type I (*COL1A1*, *COL1A2*) and collagen type VI (*COL6A1*) were reported to be higher in non-pregnant cows compared to pregnant cows. In accordance, *COL1A2* was also more expressed in NP cows. Other genes that were differently expressed between P and NP day 6 endometrial tissue included *ADAM12*, *ADAMTS1*, *TIMP3*, *BGN*, *EGFLAM*, *Angpt4*, *AGRN* and *BMP4*, *MMP2*. Furthermore, also an increased Decorin (*DCN*) mRNA expression in the NP group and also concomitant up-regulated levels of *TGFβ1* and *TGFβ2* were observed in the NP group compared to their P counterparts. This is highly important as shown in Figure 2. *DCN* is a leucine-rich proteoglycan associated with type I collagen fibrils in tissues to which *TGFβ* binds with high affinity in the ECM and in doing so neutralizes its activity. Thereby, *DCN* acts as a reservoir of *TGFβ* in the extracellular milieu. *TGFβ* is a potent stimulator of collagen synthesis by increasing transcription and decreasing collagen degradation via reduced MMPs or enhanced TIMPs, thus favoring an accumulation of ECM and especially of collagen (Roberts et al., 1992; Brenner et al., 1994; Arici et al., 1996; Siwik and Colucci, 2004). Interestingly, the presented data are in line with human studies, in which uterine tumour formations, such as leiomyomas, are characterized by an increased synthesis and deposition of ECM proteins, mainly collagens type I and III as well as an increased mRNA abundance of *MMP2* and *MMP11* (Wolańska et al., 2004; Malik et al., 2010; Iwahashi and Muragaki, 2011). The increased expression of collagens, in combination with other differences observed in ECM related genes when comparing the low-fertile endometrial tissue, is suggestive for up-regulated cell proliferation activities. In agreement, work performed by Mesquita et al. (Submitted BOR) suggests that early diestral

endometrial tissue of cows with lower probability for ongoing pregnancy are more permissive to proliferation and less favorable to activities related to cell differentiation.

Figure 2 – Metalloproteinase regulation of collagen deposition in the extracellular matrix in a lower steroid hormonal periovulatory state.

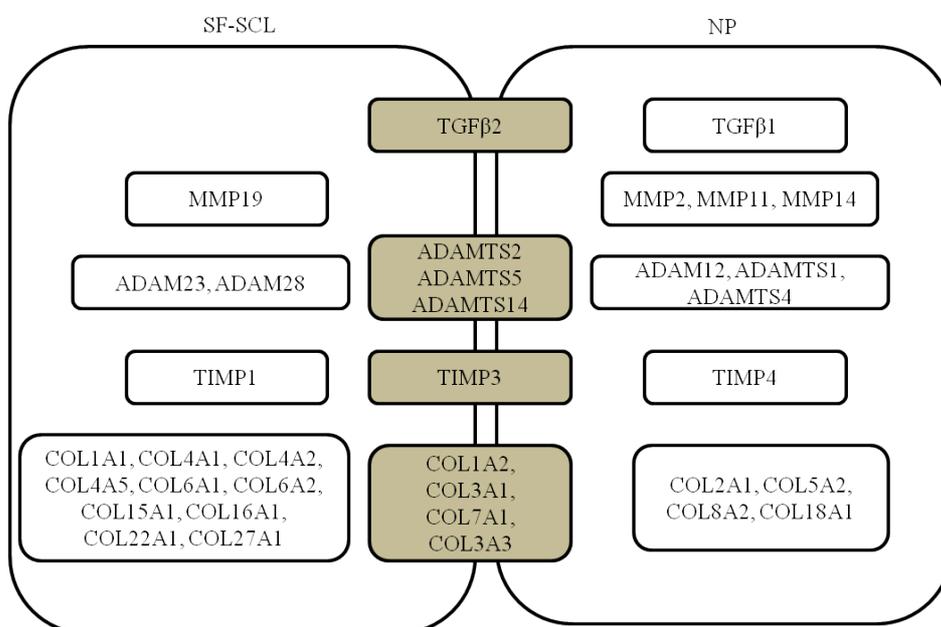


Metalloproteinase 2 (MMP-2), Metalloproteinase 3 (MMP-3) and Metalloproteinase 7 (MMP-7) cleave Decorin (DCN) releasing TGF-β from DCN–TGFβ complexes. Metalloproteinase 9 (MMP-9) and MMP-2 provide proteolytic activation of latent TGFβ, which decreases collagen degradation and hence, its deposition in the extracellular matrix via reduced MMPs or enhanced TIMPs.

When comparing the high-fertile (LF-LCL and P) and low-fertile (SF-SCL and NP) endometrial tissue from experiment 1 and experiment 2, respectively, a significant down-regulated expression of genes involved of ECM remodelling pathways was noticed in both the high-receptive LF-LCL as well in the P endometrial tissue (shown in Figure 3). These results suggest that ECM components should be appropriately expressed or inhibited and it made us propose that ECM over-expression could possibly inhibit the initial embryonic contact with maternal endometrial tissue, thereby prompting pregnancy failure. Several authors have

indeed shown the importance of preovulatory follicle size on pregnancy outcome (Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2005; Baruselli et al., 2012) and here, our analysis confirmed that as follicle size increases, collagen abundance decreases, which may imply that greater endometrial collagen content compromises fertility.

Figure 3. ECM related up-regulated genes in experiment 1 (SF-SCL vs. LF-LCL) and experiment 2 (P vs. NP). Genes in the gray box are overlapped up-regulated in both experiments.



When considering the data originating from the both fertility models used in the present study, both models used in the present study might provide a useful tool to modulate and fine-tune, within physiological limits, the uterine ‘receptive’ environment and thereby influence the probability for ongoing pregnancy. Our main focus was the characterization of specific ECM signatures in bovine endometrial tissue during the early diestrus period; a timing that co-incides with the process of embryo arrival in the uterus. This is a highly crucial moment that need further investigation as several studies identify this receptivity period as the reason for the dramatic incidence in embryonic losses in cattle industry.

In conclusion, early diestral ECM remodeling events can be considered as key factors determining pregnancy outcome. The first set of experiments showed that specific endocrine profiles, that drive endometrial receptivity, also interact with ECM related gene expression profiles and even phenotypic characteristics of ECM tissue. The second set of experiments determined the ECM related gene expression as potential predictors for probability of further pregnancy success. The overlapping set of genes being differently expressed in both fertility related models, highlights the importance of this matter and the potency to use the ECM remodeling data as potential tools to modulate receptivity and predict pregnancy outcome.

References

- [1] Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., and Walter,P. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*, 4. Auflage. WILEY-VCH Verlag, Weinheim.
- [2] Arici A., MacDonald P. C., Casey M. L., *Biol. Reprod.*, 54, 463—469 (1996).
- [3] Baruselli, P. S., et al. "Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle." *Reproduction in Domestic Animals* 47.s4 (2012): 134-141.
- [4] Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E (2006): Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* 132, 319-331
- [5] Binelli M, Scolari SC, Pugliesi G, Van Hoeck V, Gonella-Diaza AM, Andrade SC, Gasparin GR, Coutinho LL. The Transcriptome Signature of the Receptive Bovine Uterus Determined at Early Gestation. *PLoS One*. 2015 Apr 7;10(4):e0122874.
- [6] Brenner DA, Rippe RA, Rhodes K, Trotter JF, Breindl M. Fibrogenesis and type I collagen regulation. *J Lab Clin Med*. 1994;124:755–760.
- [7] Clark, D. E., Hurst, P. R., McLennan, I. S., & Myers, D. B. (1993). Immunolocalization of collagen type I and laminin in the uterus on days 5 to 8 of embryo implantation in the rat. *The Anatomical Record*, 237(1), 8-20.
- [8] Crawford HC, Matrisian LM 1996 Mechanisms controlling the transcription of matrix metalloproteinase genes in normal and neoplastic cells. *Enzyme Protein* 49:20–37

- [9] Curry, Thomas E., and Kevin G. Osteen. "Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus." *Biology of Reproduction* 64.5 (2001): 1285-1296.
- [10] Das, S. K., Yano, S., Wang, J., Edwards, D. R., Nagase, H., & Dey, S. K. (1997). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Developmental genetics*, 21(1), 44-54.
- [11] Dennis Jr, Sherman G, Hosack BT, Yang DA, Gao J, (2003) DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* 4(5), P3.
- [12] Egeblad, M., Rasch, M. G. and Weaver, V. M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 , 697-706.
- [13] Farrar, J. D., & Carson, D. D. (1992). Differential temporal and spatial expression of mRNA encoding extracellular matrix components in decidua during the peri-implantation period. *Biology of reproduction*, 46(6), 1095-1108.
- [14] Garbarino, E. J., Hernandez, J. A., Shearer, J. K., Risco, C. A., & Thatcher, W. W. (2004). Effect of lameness on ovarian activity in postpartum Holstein cows. *Journal of dairy science*, 87(12), 4123-4131.
- [15] Hurst, P. R., & Palmay, R. D. (1999). Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during the implantation period in the rat uterus. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(8), 395-402.
- [16] Iwahashi M, Muragaki Y. Increased type I and V collagen expression in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2011 May;95(6):2137-9.
- [17] Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T. N. and Penttinen, R. (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy *Pharmacol. Rev.* 61 , 198-223.
- [18] Jokimaa V, Oksjoki S, Kujari H, Vuorio E, Anttila L. 2002. Altered expression of genes involved in the production and degradation of endometrial extracellular matrix in patients with unexplained infertility and recurrent miscarriages. *Mol Hum Reprod.* Dec;8(12):1111-6.
- [19] Junqueira, L. C. U., G. S. , and E. M. Sanchez. "The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method." *Histochemistry* 74.1 (1982): 153-156.
- [20] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 2011 May;209(2):139-51. doi: 10.1530/JOE-10-0377. Epub 2011 Feb 9. Review. PubMed PMID: 21307119.
- [21] Malik M, Norian J, McCarthy-Keith D, Britten J, Catherino WH. Why leiomyomas are called fibroids: the central role of extracellular matrix in symptomatic women. *Semin Reprod Med.* 2010 May;28(3):169-79.

- [22] Marbaix, Etienne, et al. "Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.24 (1992): 11789-11793.
- [23] Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, França MR, Ramos RS, Oliveira M, Papa PC, Bressan FF, Meirelles FV, Silva LA, Nogueira GP, Membrive CM, Binelli M. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*. 2014 Apr 1;81(6):861-9.
- [24] Mishra B, Kizaki K, Koshi K, Ushizawa K, Takahashi T, Hosoe M, Sato T, Ito A, Hashizume K. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Jun 11;8:60.
- [25] Mitko K, Ulbrich SE, Wenigerkind H, Sinowatz F, Blum H, Wolf E, Bauersachs S (2008): Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction* 135, 225-240
- [26] Mott, J. D., & Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Current opinion in cell biology*, 16(5), 558-564.
- [27] Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, 69(3), 562-573.
- [28] Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, Melner MH 1999 Paracrine regulation of matrix metalloproteinase expression in normal human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 48:2–13
- [29] Perry, George A., et al. "Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.14 (2005): 5268-5273.
- [30] Pugliesi G, Scolari SC, Mesquita FS, Maturana Filho M, Araújo ER, Cardoso D, Sales JN, Martin I, Sá Filho M, Bertan CM, Binelli M. Impact of probing the reproductive tract during early pregnancy on fertility of beef cows. *Reprod Domest Anim*. 2014 Aug;49(4):e35-9.
- [31] Reiss K, Saftig P. 2009. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*. Apr; 20(2):126-37.
- [32] Roberts, A. B., Mccune, B. K., & Spore, B. (1992). TGF-beta: Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int*, 41(5), 57-59.
- [33] Rodgers, William H., et al. "Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones." *Journal of Clinical Investigation* 94.3 (1994): 946.
- [34] Salilew-Wondim D, Hölker M, Rings F, Ghanem N, Ulas-Cinar M, Peippo J, Tholen E, Looft C, Schellander K, Tesfaye D. Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer. *Physiol Genomics*. 2010 Jul 7;42(2):201-18.

- [35] Schenk, S., & Quaranta, V. (2003). Tales from the crypt [ic] sites of the extracellular matrix. *Trends in cell biology*, 13(7), 366-375.
- [36] Schmidt, S., & Friedl, P. (2010). Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell and tissue research*, 339(1), 83-92.
- [37] Schroen DJ, Brinckerhoff CE 1996 Nuclear hormone receptors inhibit matrix metalloproteinase (MMP) gene expression through diverse mechanisms. *Gene Expr* 6:197–207
- [38] Siddiqui MA, Gastal EL, Gastal MO, Almamun M, Beg MA, Ginther OJ. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro fertilisation and embryo development in heifers. *Reproduction* 2009; 137:689-697.
- [39] Siwik DA, Colucci WS. Regulation of Matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev*. 2004;9:43–51.
- [40] Skinner, J.L., Riley, S.C., Gebbie, A.E., Glasier, A.F. and Critchley, H.O. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel. *Hum . Reprod.*, 14, 793– 799.
- [41] Sluijter J.P.G., D.P.V. de Kleijn, and G. Pasterkamp. Vascular remodeling and protease inhibition - bench to bedside. *Cardiovascular Research*, 69(3):595–603, 2006.
- [42] Snoek P.A.M. van Beurden and J.W. Von den Hoff. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*, 38:73–83, 2005.
- [43] Ulbrich SE, Meyer SU, Zitta K, Hiendleder S, Sinowatz F, Bauersachs S, et al. Bovine endometrial metalloproteinases MMP14 and MMP2 and the metallo- peptidase inhibitor TIMP2 participate in maternal preparation of pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 2011;332:48–57.
- [44] Vasconcelos, J. L. M., et al. "Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate." *Theriogenology* 56.2 (2001): 307-314.
- [45] Wolańska M, Sobolewski K, Bańkowski E, Jaworski S. Matrix metalloproteinases of human leiomyoma in various stages of tumor growth. *Gynecol Obstet Invest*. 2004;58(1):14-8.
- [46] Yamada O, Todoroki J, Takahashi T, Hashizume K. The dynamic expression of extracellular matrix in the bovine endometrium at implantation. *J Vet Med Sci*. 2002 Mar;64(3):207-14.
- [47] Zhang J, Salamonsen LA: In vitro evidence active matrix metalloproteinase in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:52346–52351.

Supplemental Material

Supplemental Table 2. Validation of RNAseq gene expression data by qPCR. Fold change and *p* value of gene expression in SF-SCL vs. LF-LCL uterine samples on D7.

Ensembl Id	Gene Symbol	RNAseq (n=6)			qPCR (n=17)		
		Fold Change	log2 Fold Change	<i>P</i> value	Fold Change	log2 Fold Change	<i>P</i> value
ENSBTAG00000020457	TGFB1	1.24	0.31	0.627	2.05	0.33	0.551
ENSBTAG00000005359	TGFB2	1.77	0.82	0.053	1.86	0.75	0.043
ENSBTAG00000012004	TGFB3	1.22	0.29	0.932	1.43	0.48	0.487
ENSBTAG00000005043	TIMP1	1.48	0.57	0.017	2.04	0.66	0.043
ENSBTAG00000010899	TIMP2	0.86	-0.216	0.368	0.92	-0.226	0.326
ENSBTAG00000020638	TIMP3	0.68	-0.55	0.032	0.59	-0.62	0.019
ENSBTAG00000019267	MMP2	1.37	0.45	0.240	1.22	0.51	0.277
ENSBTAG00000014824	MMP14	1.44	0.52	0.134	1.38	0.55	0.215
ENSBTAG00000014665	ADAMTS2	1.46	0.54	0.054	1.53	0.63	0.042
ENSBTAG00000000648	ADAMTS5	1.71	0.77	0.000	1.24	0.83	0.003
ENSBTAG00000013103	COL1A1	1.49	0.58	0.058	1.80	0.76	0.046
ENSBTAG00000013472	COL1A2	1.55	0.63	0.001	1.87	0.81	0.014
ENSBTAG00000021466	COL3A1	1.62	0.69	0.000	1.32	0.51	0.002
ENSBTAG00000012849	COL4A1	1.37	0.46	0.032	1.92	0.39	0.023
ENSBTAG00000014575	COL4A5	0.63	-0.64	0.027	0.75	-0.92	0.021

Supplemental Table 3. Validation of RNAseq gene expression data by qPCR. Fold change and *p* value of gene expression in PREGNANT vs. NOT-PREGNANT uterine biopsies.

Ensembl Id	Gene Symbol	RNAseq (n=11)			qPCR (n=26)		
		Fold Change	log2 Fold Change	<i>P</i> value	Fold Change	log2 Fold Change	<i>P</i> value
ENSBTAG00000020457	TGFB1	2.36	0.55	0.0181	2.23	0.37	0.051
ENSBTAG00000005359	TGFB2	-2.39	-0.45	0.0164	1.20	-0.57	0.032
ENSBTAG00000005043	TIMP1	-0.63	-0.20	0.527	2.04	-0.66	0.430
ENSBTAG00000010899	TIMP2	0.09	0.01	0.927	0.92	0.02	0.326
ENSBTAG00000020638	TIMP3	3.22	0.49	0.001	0.59	0.62	0.019
ENSBTAG00000019267	MMP2	2.40	0.63	0.016	1.22	0.51	0.027
ENSBTAG00000014824	MMP14	2.54	0.54	0.010	1.38	0.55	0.021
ENSBTAG00000000706	ADAMTS1	3.31	0.72	0.0009	1.21	0.43	0.003
ENSBTAG00000014665	ADAMTS2	2.84	0.63	0.0045	1.22	0.78	0.000
ENSBTAG00000013210	ADAMTS4	2.84	0.69	0.0129	0.99	0.76	0.023
ENSBTAG00000000648	ADAMTS5	1.73	0.45	0.0833	1.22	0.97	0.055
ENSBTAG00000013472	COL1A2	0.32	0.10	0.745	1.49	0.77	0.337
ENSBTAG00000021466	COL3A1	2.04	0.52	0.0409	1.22	0.32	0.023