

MILENA LOPES OLIVEIRA

**Efeito do ambiente endócrino periovulatório na expressão gênica do
endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos:
biossíntese e sinalização de eicosanoides**

São Paulo

2013

MILENA LOPES OLIVEIRA

**Efeito do ambiente endócrino periovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos:
biossíntese e sinalização de eicosanoides**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Mario Binelli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.2826
FMVZ

Oliveira, Milena Lopes

Efeito do ambiente endócrino periovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos: biossíntese e sinalização de eicosanoides / Milena Lopes Oliveira. - 2013.

133 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mário Binelli.

1. Estradiol. 2. Progesterona. 3. Ácido araquidônico. 4. Citologia endometrial. 5. Lavagem uterina. 6. Hemodinâmica uterina. 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 "Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos: via metabólica da prostagladina", protocolado sob o nº 2280/2011, utilizando 30 (trinta) zebuínos, 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 17/8/2011.

We certify that the Research "Effect of the periovulatory endocrine milieu on endometrial gene and protein expression during the first week post-estrus in cattle: the prostaglandin synthesis pathway", protocol number 2280/2011, utilizing 30 (thirty) 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 8/17/2011.

São Paulo, 31 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Milena Lopes

Título: **Efeito do ambiente endócrino periovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos: biossíntese e sinalização de eicosanoides**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

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

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico aos meus pais Maria Helena
e Edmilson, e ao meu irmão
Éverton, meus eternos amores,
minha alegria e paz.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre estar guiando cada passo que dou em minha vida, além da proteção, saúde e força de vontade. Principalmente por sempre colocar anjos em minha vida, me presenteando com uma família linda e grandes amigos.

À minha mãe Maria Helena, ao meu pai Edmilson e ao meu irmão Éverton pelos conselhos, incentivos e esforços sem medida, sempre oferecendo o máximo que podem para que consiga alcançar todos os meus objetivos. E pelo amor, carinho e proteção em qualquer situação, a qualquer hora e lugar. Tudo que eu faço é sempre pensando em ser motivo de orgulho para vocês.

Ao Prof. Mário Binelli por oferecer além do necessário ao desenvolvimento deste trabalho, sempre pensando no crescimento dos seus pós-graduandos. Pela disponibilidade, paciência, conselhos e orientações. Por me fazer despertar o interesse pela pesquisa. Obrigada pelas oportunidades e confiança.

A Cláudia Maria Bertan por toda atenção, confiança e por ter me inspirado a gostar das atividades desenvolvidas no LFEM.

Aos professores Ed Hoffmann, Rubens Arruda, Anneliese Traldi, Luciano Andrade, Flávio Meirelles, Paula de Carvalho Papa e João Negrão pelas orientações e disponibilidade de laboratórios.

A todos os pós-graduandos do VRA: Daniella, Shirley, Henrique, Kleber, Thiago Santin, Milton, Leonardo, Maíra, Mariana, Roberta, Gisele, Bruna, Renata, Fernanda, Ticiano, Mariana e Gabriela, pela boa convivência, amizade e cafezinhos acompanhado de conversas descontraídas nos intervalos de trabalho. Especialmente aos que tive a alegria de conviver na casa do VRA, obrigada carinho e amizade, lembranças especiais permanecerão guardadas em meu coração!

Às minhas irmãs de coração: Juliane Diniz, Julianne Naves, Larissa Parazzi e Qui Geraldo que trouxeram a paz nos momentos difíceis e alegria no desespero, pelas brincadeiras, cumplicidade e amizade, eu amo muito vocês! E aos meus “irmãos” Roney e Éverton por toda paciência em me “aturar” esses dois anos, obrigada pela disponibilidade e grande amizade!

À equipe feminina do LFEM, Estela, Moana, Angela e Saarah por sempre estarem dispostas a ajudar, pela amizade e alegria que distribuem.

Agradeço ao Fábio Pinaffi e a todos da equipe LFEM, em especial, aos pós-doutorandos Fernando Mesquita, Fábio D’Alexandri e Guilherme Pugliesi, pelo incentivo, troca de experiências, intenso trabalho, companheirismo e amizade ao longo do mestrado.

A Juliane Diniz, Éverton, Roney, Moana e Mariana, pela grande ajuda na edição, revisões e força nos momentos finais deste trabalho, agradecimentos sempre serão poucos perto de toda ajuda de vocês.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares que perto ou longe sempre se fazem presentes em minha vida, dando apoio e incentivo para a conquista de meus sonhos.

Aos funcionários, Alexandra, Elaine, Sandra, José Maria, Márcio e João, pela disponibilidade e trabalho.

Aos serviços eficientes de Harumi Doi Shiraishi e Clayton Costa.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia por disponibilizar espaço físico dos laboratórios e animais.

À CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

OLIVEIRA, M. L. **Efeito do ambiente endócrino periovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos: biossíntese e sinalização de eicosanoides.** [Effect of the periovulatory endocrine milieu on endometrial gene expression during the first week post-estrus in cattle: eicosanoid biosynthesis and signaling]. 2013. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2013.

Os esteroides ovarianos modulam a expressão de importantes moléculas no endométrio de fêmeas bovinas, incluindo os eicosanoides. Os eicosanoides sintetizados pelo endométrio controlam uma gama de eventos reprodutivos. A hipótese do presente estudo é que a síntese de eicosanoides pelo endométrio no sétimo dia pós-estro é regulada pelo ambiente endócrino periovulatório. Objetivou-se mensurar a expressão gênica de 23 proteínas envolvidas na síntese, transporte e sinalização de eicosanoides e quantificar uma série de eicosanoides no útero de vacas de corte com diferentes perfis hormonais peri-ovulatórios no início do diestro. O crescimento folicular foi farmacologicamente manipulado para que resultassem grupos apresentando folículo pré-ovulatório e corpo lúteo grande (F/CLG; n=11) ou pequeno (F/CLP; n=11). Vacas Nelores múltiparas, não lactantes, pré-sincronizadas, receberam (F/CLG) ou não (F/CLP) uma dose de PGF2 α e um dispositivo de progesterona, juntamente com benzoato de estradiol. A remoção dos dispositivos de liberação de progesterona e aplicação de PGF2 α foi realizada 60 a 42 horas antes da indução da ovulação no grupo F/CLG e entre 48 a 30 horas no grupo F/CLP. A ovulação foi induzida (GnRH; 10 μ g) no D0. Amostras de sangue foram obtidas entre os dias D-2 a D0 e D0 a D7 para mensuração das concentrações de estradiol os dias progesterona, respectivamente. No dia 7, tecidos e lavados uterinos foram coletados. Em comparação ao grupo F/CLG, os animais do grupo F/CLP apresentaram folículos pré-ovulatórios e CL menores que resultaram em menores concentrações de estradiol e progesterona, respectivamente (P<0,5). A quantificação dos transcritos foi feita por qPCR. A abundância dos genes PTGES, AKR1C3, AKR1C4, CBR1, PTGIS e ALOX12, foi maior para os animais do grupo F/GLG, e PLA2G10 foi menor no mesmo grupo quando comparado com o grupo F/CLP (P<0,10). A concentração de metabólitos foi mensurada no tecido endometrial (pg/g) e lavado uterino (ng/mL) por espectrometria de massas. Maiores

concentrações do metabolito 9-HETE foram encontradas no tecido endometrial do grupo F/CLP ($P < 0,05$). Comparações entre médias foram determinadas pelo teste t de Student. Conclui-se que diferentes concentrações de estradiol (proestro) e progesterona (início do diestro) foram capazes de modular a expressão de genes relativos à síntese de eicosanoides, sem influenciar as concentrações dos eicosanoides no endométrio e lavado uterino de fêmeas bovinas no sétimo dia do ciclo.

Palavras-chave: Estradiol. Progesterona. Ácido araquidônico.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. L. **Effect of the periovulatory endocrine milieu on endometrial gene expression during the first week post-estrus in cattle: eicosanoid biosynthesis and signaling.** [Efeito do ambiente endócrino periovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos: biossíntese e sinalização de eicosanoides]. 2013. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2013.

Ovarian steroids modulate the expression of important molecules on bovine endometrium, including eicosanoids. The eicosanoids synthesized by the endometrium control many reproductive processes. The hypothesis of this study is that the eicosanoids synthesis by the endometrium on day seven after the estrous is regulated by the periovulatory endocrine milieu. The aims of this study were (1) to measure the expression of 23 genes that encode proteins involved in eicosanoids synthesis, transport and signaling and (2) to quantify eicosanoids on beef cows uterus exposed to different periovulatory hormonal profiles. Follicular growth was pharmacologically manipulated to generate two groups presenting large or small preovulatory follicle and corpus luteum (LF/CL and SF/CL respectively; n=11/group). Cyclic, non-lactating Nelore cows received two injections of cloprostenol (PGF2 α ; 0.5mg; i.m.) 14 days apart. Ten days later (D-10), cows received a P4-releasing device along with estradiol benzoate (2mg; i.m.). To modulate the growth of the preovulatory follicles, on D-10, animals received PGF2 α (LF/CL) or not (SF/CL). The P4-releasing devices were removed and PGF2 α injected 60 to 42 hours before the ovulation induction in the LF/CL group and 48 to 30 hours before the ovulation induction in the SF/CL group. Ovulation was induced with buserelin (GnRH; 10 μ g; i.m.) on D0. Plasma was obtained for measurement of estradiol concentrations from D-2 to D0 and from D0 to D7 for progesterone measurements. On D7, the animals that ovulated in response to GnRH were slaughtered and uterus flushing and endometrium were collected. Differences between group means were determined by student's t test. Animals from LF/CL group presented larger preovulatory follicles, corpus luteum, estradiol and progesterone levels when compared to animals from SF/CL group (P<0.1). The quantification of the transcripts was performed by qPCR. PTGES, AKR1C3, AKR1C4, CBR1, PTGIS and ALOX12 were more abundant and PLA2G10 was less expressed in the endometrium from animals from LF/CL when

compared to SF/CL ($P < 0.10$). Metabolites concentration was measured by mass spectrometry in endometrial tissue (pg/g) and uterine flushings (ng/mL). The metabolite 9-HETE was more abundant on uterine flushings from animals with SF/CL ($P < 0.05$). Different concentrations of estradiol (proestrous) and progesterone (beginning of diestrous) modulated the expression of genes related to eicosanoids synthesis, but it did not affect eicosanoids levels in the endometrium and uterine flushing in beef cattle on day 7 of the estrous cycle.

Keywords: Estradiol. Progesterone. Araquidonic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Via de Síntese, Sinalização e Metabolismo de Eicosanoides.....	19
Figura 2 -	Imagens digitalizadas de géis de agarose contendo produtos de amplificação de genes específicos por PCR a partir de cDNA de endométrio de vacas no dia 7 do ciclo estral.....	47
Figura 3 -	Imagens digitalizadas de géis de agarose contendo produtos de amplificação de genes específicos por PCR a partir de cDNA de endométrio de vacas no dia 7 do ciclo estral.....	48
Quadro 1 -	Nomenclatura, <i>primers forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R), sequência dos <i>primers</i> , identificação representativa (ID) e números de pares de bases (pb) dos genes.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das reações de amplificações e da curva padrão para validação dos <i>primers</i>	46
Tabela 2 - Abundância relativa de transcritos de genes representados pela média, erro padrão da média (EPM), razão entre os tratamentos (FCLG/FCLP) e valores de <i>P</i> , relacionados à via de síntese e sinalização de eicosanóides.....	49
Tabela 3 - Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de eicosanoides no lavado uterino representados (média, \pm erro padrão da média), razão das concentrações entre os tratamentos (FCLG/FCLP) e valores de <i>P</i> .	56
Tabela 4 - Quantificação das concentrações ($\mu\text{g/g}$) de eicosanoides presentes no tecido endometrial representados pela média, erro padrão da média (EPM), razão das concentrações entre os tratamentos (FCLG/FCLP) e valores de <i>P</i>	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESE	20
3	OBJETIVOS	20
3.1	OBJETIVO GERAL	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4	REVISÃO DE LITERATURA	21
4.1	ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA), FOSFOLIPASE A2 (PLA2) E CICLOOXIGENASES (PTGS1 E PTGS2).....	21
4.1.1	Via de sinalização	21
4.1.2	Importância no contexto da reprodução animal	22
4.1.3	Controle por Esteroides	23
4.2	PROSTAGLANDINAS (PGE2, PGF2A E PGD2).....	24
4.2.1	Via de sinalização	24
4.2.2	Importância no contexto da reprodução animal	26
4.2.3	Controle por Esteroides	28
4.3	PROSTACICLINA, TROMBOXANOS E LEUCOTRIENOS	29
4.3.1	Via de sinalização	29
4.3.2	Importância no contexto da reprodução animal	30
4.3.3	Controle por Esteroides	31
4.4	ÁCIDOS HIDROXIEICOSATETRAENOICOS	32
4.4.1	Via de sinalização	32
4.4.2	Importância no contexto da reprodução animal	32
4.4.3	Controle por Esteroides	33
5	MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1	ANIMAIS	34
5.2	MANEJO REPRODUTIVO.....	34
5.3	AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS	35
5.4	COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	36
5.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	37
5.5.1	Extração de RNA	37
5.5.2	Síntese de cDNA	37
5.5.3	Desenho de <i>Primers</i>	38
5.5.4	Validação de <i>Primers</i>	38

5.5.5	Eletrforese	41
5.5.6	Sequenciamento de Produtos de PCR	42
5.6	LIPIDÔMICA – ULTRA-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY	43
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6.1	MODELO ANIMAL.....	44
6.2	ABUNDÂNCIA DE RNAM DE FOSFOLIPASES (PLA2) E CICLOOXIGENASES (PTGS1 E PTGS2)	44
6.3	ABUNDÂNCIA DE RNAM E METABÓLITOS DE PROSTAGLANDINAS.....	50
6.4	ABUNDÂNCIA DE RNAM E METABÓLITOS DE PROSTACICLINAS, TROMBOXANOS E LEUCOTRIENOS	55
6.5	ÁCIDO HIDROXIEICOSATETRAENÓICO	57
7	SUMÁRIO DE RESULTADOS	60
8	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICES	77

1 INTRODUÇÃO

A pecuária de corte brasileira tem recebido grande atenção mundial devido ao modelo de criação extensiva com significativo potencial de incremento da produção. O Brasil encontra-se na posição de maior exportador mundial de carne bovina e detém o segundo maior rebanho de bovinos, contando com 212,8 milhões de cabeças, ficando atrás apenas da Índia com um rebanho não comercial 1,5 vez maior (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2011). As raças zebuínas (*Bos indicus*) compreendem cerca de 80% do rebanho de bovinos no Brasil. A raça nelore corresponde a 90% desta parcela e se destaca por sua capacidade de produção e adaptação às condições ambientais do Brasil (ABIEC, 2011). Os países em desenvolvimento são os maiores compradores de carne *in natura* do Brasil, correspondendo a 71% do total exportado em 2011 (ABIEC, 2011). A diminuição do desemprego, aumento do poder aquisitivo, crescimento econômico e populacional em países em desenvolvimento, além do aumento da demanda mundial por alimentos, aponta para a importância em expandir a produção para atender o aumento da demanda interna e externa por carne bovina (FEDOROFF et al., 2010).

Apesar do grande potencial da pecuária nacional, os EUA são os maiores produtores mundiais de carne bovina com uma produção de 11.946 toneladas, seguidos pelo Brasil, segundo no ranking, produzindo 9.771 toneladas em 2011 (ABIEC, 2011). No panorama da pecuária de corte, o mais importante fator limitante aos aumentos na produção é a baixa eficiência reprodutiva nas operações de cria, onde a taxa de desfrute do rebanho nacional é de aproximadamente 18% (ABIEC, 2006). Em comparação, os norte americanos desfrutam cerca de 35% do seu rebanho (USDA, 2007). Neste contexto, a Inseminação Artificial em tempo fixo tem sido usada como estratégia para maximizar as taxas de serviço, inseminando 100% dos animais possíveis de serem inseminados, obtendo-se 100% de taxa de serviço (número de animais disponíveis para reprodução que são efetivamente inseminados). Tal estratégia incrementa o potencial reprodutivo do rebanho por eliminar a necessidade de observação de cio e ainda permitir a utilização de vacas que não estejam ciclando, atingindo por volta de 50% de taxas de prenhez à primeira inseminação (MADUREIRA et al., 2003).

Apesar dos satisfatórios resultados, as taxas de concepção à primeira IA dificilmente são maiores que 60% em vacas de corte e 30% em vacas leiteiras de alta produção, indicando que uma proporção importante de fêmeas inseminadas falharam em se tornar prenhes. De fato, 20 a 40% das falhas de concepção são devidas à mortalidade embrionária que ocorre nas três primeiras semanas de gestação (VANROOSE; DE KRUIF; VAN SOOM, 2000). Desta forma, o incremento das taxas de concepção (número de animais gestantes/número de animais inseminados) nas criações de gado é um ponto chave na determinação da lucratividade na atividade pecuária e, portanto, se faz necessário um amplo entendimento da fisiologia do ciclo reprodutivo das fêmeas bovinas neste período específico.

O ciclo reprodutivo de fêmeas bovinas é caracterizado por duas fases distintas marcadas pela dominância de dois hormônios esteroides. Na fase folicular o estradiol (E2) é produzido pelo folículo ovulatório e durante a fase lútea a progesterona (P4) é produzida pelo corpo lúteo. Sabe-se que folículos ovulatórios com maior diâmetro tem maior capacidade de produzir de E2 (SÁ FILHO et al., 2010) e que o tamanho deste folículo é positivamente correlacionado com o tamanho do corpo lúteo (CL) formado a partir de sua ovulação e com a capacidade deste CL de produzir P4 (VASCONCELOS et al., 2001; PERES et al. 2009). A modulação do ambiente uterino causada pela exposição sequencial do endométrio predominantemente aos esteroides ovarianos P4-E2-P4 durante o diestro – proestro - metaestro/diestro, respectivamente, é fundamental para garantir a sobrevivência embrionária no período pré-implantação (MILLER et al., 1977). Além disso, sabe-se, que os esteroides exercem controle da expressão de moléculas com funções reprodutivas importantes, por exemplo, na expressão de receptores endometriais (receptor de progesterona – PGR; receptor de estradiol – ESR e receptor de ocitocina – OXTR) essenciais ao controle do ciclo estral (MCNEILL et al., 2006).

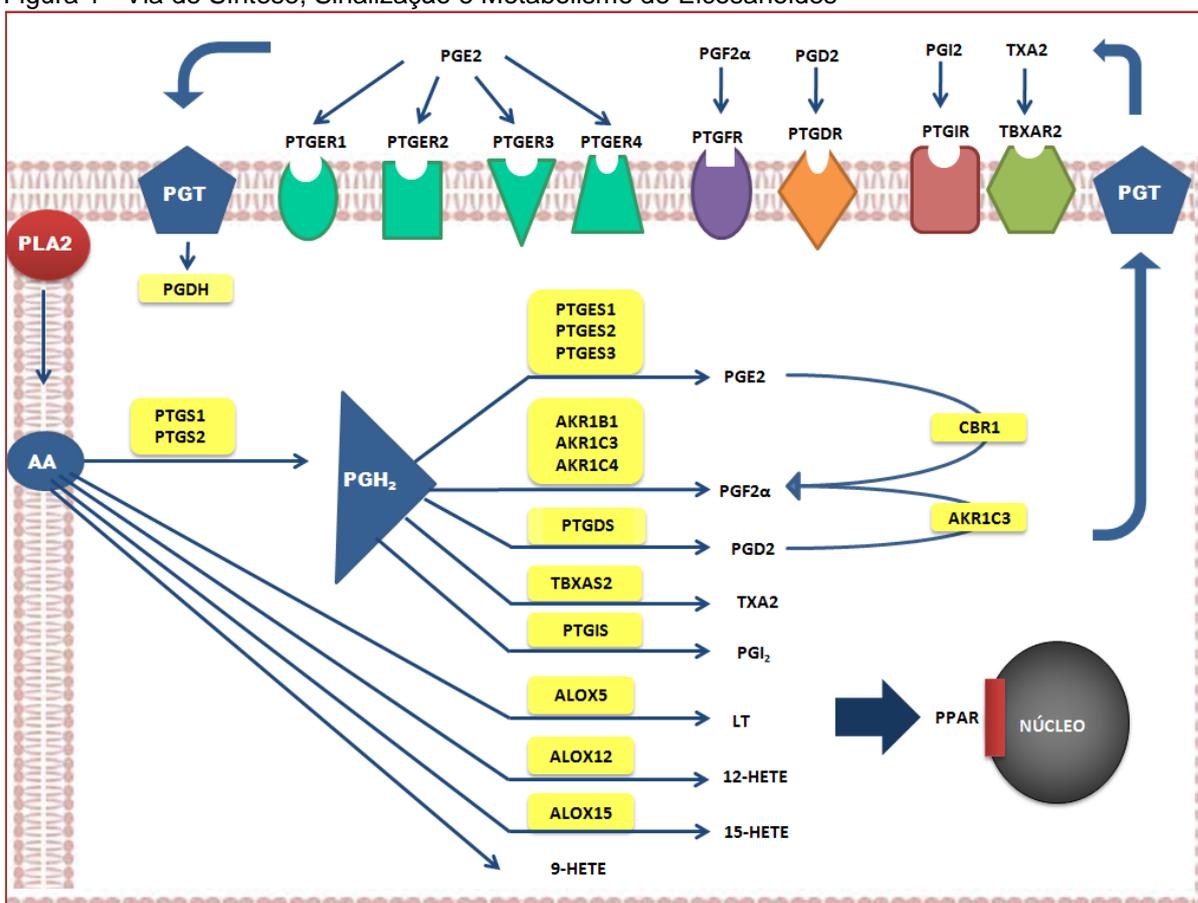
Pesquisas realizadas com análises globais de expressão gênica e proteica no endométrio de fêmeas bovinas mostraram que houve expressão diferencial entre animais apresentando maiores ou menores concentrações de progesterona (FORDE, NIAMH et al., 2012). Além disso, foram elucidados efeitos benéficos da progesterona no desenvolvimento embrionário durante o início do diestro em experimentos utilizando P4 exógena (CARTER et al., 2008). Forde et al. (2011), também evidenciaram os efeitos positivos da progesterona no desenvolvimento de

embriões bovinos no dia 7 do ciclo estral (FORDE, et al., 2011). Mais importante, em experimento conduzido por Demetrio et al., 2007, observou-se correlação positiva entre as concentrações de P4 no dia 7 e a probabilidade de concepção em fêmeas bovinas (DEMETRIO et al., 2007).

Na presente dissertação objetivou-se estudar os eicosanoides, moléculas derivadas do metabolismo do ácido araquidônico, que incluem as prostaglandinas PG, prostaciclina (PGI₂), leucotrienos (LT) e tromboxanos (LTB). Os eicosanoides participam de uma gama de eventos reprodutivos, como ovulação, luteólise, manutenção da gestação, implantação, parto entre outros (WEEMS; WEEMS; RANDEL, 2006). Mais importante, sabe-se que a síntese e função de tais moléculas são moduladas por esteroides sexuais (GOFF, 2004). Contudo, há poucas informações a respeito do controle dos esteroides sobre a síntese destas moléculas no útero de fêmeas bovinas durante o diestro inicial.

Devido à importância reprodutiva dos eicosanoides e a participação dos hormônios esteroides no controle expressão e síntese de moléculas no endométrio, foram estudados os efeitos de menores ou maiores concentrações endógenas de E2 e P4 sobre a via de síntese, sinalização e metabolismo dos eicosanoides pelo endométrio de vacas nelore no dia 7 do ciclo estral (Figura 1).

Figura 1 - Via de Síntese, Sinalização e Metabolismo de Eicosanoides



Fonte: (OLIVEIRA, M. L., 2013).

Legenda: Via de síntese, sinalização e metabolismo de eicosanoides: a enzima fosfolipase A2 (PLA2) libera o ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica e este pode ser convertido a prostanoides pelas cicloxigenase 1 e 2 (PTGS1 e PTGS2) à PGH₂ que é o precursor de todos os prostanóides. A PGH₂ é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 e PTGES3), PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4 e CBR1) PGD sintase (PTGDS), PGI sintase (PTGIS) e TXA1 sintase (TBXAS1) nos produtos PGE₂, PGF₂α, PGD₂, PGI₂, e TXA₂, respectivamente. Após produzidas, as PGs atravessam a membrana plasmática passivamente ou por transporte facilitado pela proteína transportadora membrana SLCO2A1. Uma vez no exterior das células, as prostaglandinas podem se ligar, especificamente, aos seus receptores de membrana PTGER1 a 4, PTGFR, PTGIR, PTGDR e TBXAR2. As prostaglandinas E₂ e F₂α podem entrar na célula alvo utilizando proteína transportadora (SLCO2A1) onde podem ser inativadas pela enzima PGDH. Finalmente, por mecanismos de sinalização intracelulares, a PGI₂ e a PGD₂, podem se ligar ao receptor nuclear PPAR. Alternativamente, o AA pode ser convertido por enzimas lipoxigenases (LOX). As enzimas ALOX12 e ALOX15 permitem a síntese de ácidos hidroxiciclopentadienóicos, enquanto atividade da enzima ALOX5 resulta na síntese de leucotrienos. Os produtos da via das lipoxigenases também promovem seus efeitos biológicos em receptores nucleares da família PPAR. Por outro lado o metabólito 9-HETE sintetizado por atividade de peroxidases.

2 HIPÓTESE

A síntese de eicosanoides pelo endométrio no sétimo dia pós-estro é regulada pelo ambiente endócrino periovulatório.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ambiente endócrino periovulatório sobre a expressão gênica da via de biossíntese dos eicosanoides e a concentração de eicosanoides no endométrio de fêmeas bovinas no dia sete do ciclo estral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar o efeito do ambiente uterino sobre a abundância de transcritos de genes relacionados à síntese, transporte e sinalização de eicosanoides no endométrio utilizando PCR em tempo real.
- Testar o efeito do ambiente uterino sobre a concentração de eicosanoides presentes no lavado uterino e tecido endometrial por técnica de espectrometria de massas (Lipidômica-MS/MS).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA), FOSFOLIPASE A2 (PLA2) E CICLOOXIGENASES (PTGS1 E PTGS2).

4.1.1 Via de sinalização

O ácido araquidônico (AA) é o mais importante precursor de eicosanoides. A enzima fosfolipase A (PLA) possui a importante função de liberar AA, armazenado na membrana plasmática, por hidrólise na posição sn-2. As PLA2 são consideradas as enzimas da primeira linha na síntese de eicosanóides. São conhecidas três famílias de fosfolipases: PLA2s (PLA2 secretória), cPLA2 (PLA2 citosólica) e PLA2i (PLA2 independente de Cálcio). A família cPLA2 é composta por 3 isoformas cPLA2 α , cPLA2 β e cPLA2 γ , que apresentam elevada homologia entre suas sequências gênicas (IRABAYASHI; HIMIZU, 2004).

Após clivagem pela ação das PLA2, o AA livre no citosol é oxigenado por enzimas ciclooxigenases. Existem duas isoformas de ciclooxigenases - Prostaglandina Endoperóxido H Sintase 1 (PTGS1) e PTGS2. A PTGS1 é uma enzima expressa de forma constitutiva nos tecidos, enquanto a expressão de PTGS2 é modulada por estímulos celulares. Ambas isoformas da PTGS possuem a função de converter o AA em Prostaglandina G2 (PGG2). Subsequentemente, peroxidases realizam a redução de PGG2 à Prostaglandina H2 (PGH2), conhecida como o principal substrato predecessor na síntese de todos os prostanóides (SMITH; DEWITT; GARAVITO, 2000). Assim, cada prostanóide é sintetizado a partir da PTGS2, por atividade de enzimas específicas de síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos.

4.1.2 Importância no contexto da reprodução animal

A cPLA2 é a principal enzima que dá início ao metabolismo do AA. Sua atividade consiste em clivar AA dos fosfolipídios de membrana. Tal função é primordial para o desempenho de atividades reprodutivas, uma vez que é a enzima de maior relevância em respostas originadas por estímulos celulares que levam à síntese de prostaglandinas (MURAKAMI; KUDO, 2002). Pesquisas realizadas com camundongos knockout para a PLA2 têm mostrado que esta enzima é essencial para o adequado funcionamento de processos reprodutivos, uma vez que observou-se hipo-expressão da PTGS2, redução das concentrações de PGE2 levando a falhas no parto e redução na prole (BOSETTI; WEERASINGHE, 2003).

As ciclooxygenases (PTGS) são enzimas essenciais para a síntese de prostaglandinas pelas células endometriais. Parent et al. (2003), adicionaram doses crescentes de inibidores de ciclooxygenases em cultivo de células epiteliais do endométrio bovino com ou sem adição de AA e ocitocina. Todos os inibidores utilizados levaram a uma inibição com padrões semelhantes e dose dependentes, tanto para PGE2 e PGF2 α . Contudo, os tratamentos utilizando inibidores e AA ou ocitocina levaram a uma maior intensidade de inibição da síntese de PGF2 α que de PGE2, enquanto a PGE2 foi menos inibida quando foi adicionado AA ao meio. Ainda neste mesmo experimento observou-se que no cultivo de células endometriais com doses crescentes de ocitocina ou de AA observou-se aumento na síntese de PTGS2, e conseqüentemente aumento das concentrações de PGE2 e PGF2 α , evidenciando que a enzima PTGS2 está intimamente relacionada com a síntese de PGs (PARENT; VILLENEUVE; FORTIER, 2003).

Anteriormente, em outro experimento utilizando inibidores de ciclooxygenases, observou-se que baixas concentrações do inibidor de PTGS RS-57067 provocou aumento da ativação de PTGS1, porém este feito não foi observado em PTGS2 (SWINNEY, 1997). Além disso, um efeito cooperativo entre as quantidades de substrato e a ativação de PTGS1 na síntese de prostaglandinas foi evidenciado por Swinney (1997).

Identificaram-se falhas na ovulação, fertilização e implantação em fêmeas de camundongos manipuladas para se obter o silenciamento gênico de PTGS2, indicando a importância desta enzima nos processos reprodutivos (LIM et al., 1997).

No entanto, o silenciamento de PTGS1 não ocasionou tais falhas reprodutivas. Portanto essa enzima aparentemente não é crucial nestes eventos. Contraditoriamente, outras pesquisas com silenciamento de PTGS1 em camundongos, mostraram atraso no início do parto, menor desenvolvimento do concepto, falhas no parto e ausência de sobrevivência da prole (GROSS et al., 1998).

Yu et al. (2005) mensuraram as concentrações de prostaglandinas presentes no tecido uterino de camundongos manipulados geneticamente para expressar os fenótipos PTGS1^{Neo/Neo} (controle negativo) e PTGS1-KO, e de camundongos não manipulados geneticamente (controle negativo; WT). Assim, entre todos os animais, a concentração de PGF2 α , PGE2 e PGD2 foi maior nos camundongos WT (normais) e entre os animais com fenótipo manipulados, os animais PTGS1^{Neo/Neo} apresentaram maiores concentrações de prostaglandinas comparado ao PTGS1-KO que correspondeu ao grupo com as menores concentrações de PGs. Também foi observado que animais com baixa expressão ou ausência de expressão de PTGS1 são férteis, porém apresentam atraso na gestação. Além disso, também foi observado que a administração de aspirina (inibidor de PTGS) em camundongos normais também resultou em atraso na gestação (YU et al., 2005).

Coletivamente, as enzimas PTGS1 e PTGS2 estão relacionadas com a síntese de diferentes PGs em momentos específicos do ciclo reprodutivo em diferentes espécies.

4.1.3 Controle por Esteroides

A PLA2 é produzida em elevadas concentrações na placenta de humanos no momento do parto e sua inibição leva à diminuição de mais de 80% das concentrações de P4 (LAPPAS; RICE, 2004).

Pesquisas realizadas por Kowalik et al. (2009) mostraram os efeitos dos esteroides sob a expressão gênica e proteica de PTGS2 em células endometriais bovinas coletadas entre os dias 14 e 16 do ciclo estral. Em tais células, a incubação com P4 por 4 horas ou 6 horas não foi capaz de alterar a expressão de RNAm e proteína da PTGS2. Em células endometriais e em células miometriais bovinas,

resultados semelhantes foram obtidos (SLONINA et al., 2009). Contudo, em explantes endometriais de suínos foram observados efeitos estimulantes da adição de esteroides (E2 e P4) na expressão de PTGS2 (BLITEK et al., 2010).

4.2 PROSTAGLANDINAS (PGE2, PGF2 α e PGD2)

4.2.1 Via de sinalização

Como relatado na sessão anterior, sintases específicas e isomerases catalisam a conversão da instável PGH2 às distintas PGs. Existem três isoformas de enzimas de síntese de PGE2 (PTGES), duas isoformas microsossomais (PTGES1 e PTGES2) e uma citosólica (PTGES3). Todas as isoformas de PTGES estão associadas a ambas ciclooxigenases na síntese de PGE2, entretanto apresentam maior afinidade por PTGS2 (MURAKAMI; KUDO, 2004)

As enzimas pertencentes à família aldo-ceto redutase (AKR) AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4, convertem a PGH2 em PGF2 α (GAUVREAU et al., 2010). Contudo, outras PGs podem servir de substrato para a síntese de PGF2 α . Por exemplo, a PGD2 pode ser convertida pela AKR1B1 ao metabólito 9 α ,11 β PGF2 e a PGE2 ser transformada pela CBR1 em PGF2 α (KANKOFER; WIERCIŃSKI, 1999; KANKOFER; WIERCIŃSKI; ZERBE, 2002).

Atualmente foram identificadas duas sintases de PGD2 distintas: enzima L-PGDS (lipocalina) e H-PTGDS (hematopoiética). Ambas possuem a capacidade de converter PTGS2 em PGD2. (GABLER et al., 2009).

Após a síntese das PGs estas são levadas para o meio extracelular onde podem se ligar a receptores específicos. As PGs são transportadas por enzimas carreadoras de ânios orgânicos pertencentes à família OA1 (SLCO2A1). Assim, as prostaglandinas podem deixar a célula via membrana celular de forma passiva, ou por meio de transporte facilitado pela família de carreadores de proteínas multidrogas resistente (MRP; MRP1, MPR2, MPR3 e MPR4), ou ainda serem sequestradas do meio extracelular para o interior da célula por meio de proteínas transportadoras (SCHUSTER, 2002). Contudo, a SLCO2A1 e MPR4 são os

principais carreadores de prostaglandinas avaliados em pesquisas envolvendo o transporte de PGs em bovinos no âmbito reprodutivo (BANU et al., 2003; BANU et al., 2005; LACROIX-PÉPIN et al., 2011).

As proteínas transportadoras de prostaglandinas foram identificadas em várias espécies, sendo que SLCO2A1 (proteína transportadora de prostaglandina da espécie bovina) foi encontrada em abundância no pulmão, indicando ter função importante no metabolismo de PGs. Adicionalmente, este transportador de PGs apresenta grande afinidade por PGE2, PGF2 α e PGD2, porém possui baixa afinidade pelo ácido araquidônico. As prostaglandinas PGF2 α , PGE2 e PGD2 possuem receptores específicos compostos por sete domínios transmembrana acoplados a proteína G, localizados na superfície externa da membrana celular (KANAI et al., 1995).

A PGE2 possui quatro subtipos de receptores (PTGER1, PTGER2, PTGER3 e PTGER4) com que ocasiona diferentes efeitos celulares. Os receptores PTGER2 e PTGER4 estão ligados à proteína Gs (estimulante), e após ativados estimulam a liberação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). Em bovinos foram identificadas mais quatro isoformas de PGER3 (EP_{3A}, EP_B, EP_C e EP_D). Estas isoformas apresentam elevada especificidade ao seu agonista e estão ligadas a três tipos de proteínas G que permitem diferentes formas de sinalização intracelular. Desta forma, a sinalização destes receptores ocorre tanto por respostas estimulantes como inibitórias sob o AMPc, assim como pela mobilização do cálcio intracelular e de inositol trifosfato (IP3) quando ativados (COLEMAN; SMITH; NARUMIYA, 1994). Logo, os efeitos biológicos da PGE2 dependerão do tipo de receptor expresso. Assim como os receptores de PGE2, o receptor de PGD2 ativado estimula a adenilato ciclase, via proteína G. Contudo, o receptor de PGF2 α (PGFR) induz aumento da mobilização intracelular de cálcio por mecanismo independente de IP3 (NARUMIYA; SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999). Assim esta variedade de receptores e suas especificidades, aliada às diversas isoformas de PGs possibilitam uma ampla diversidade de respostas biológicas.

Por fim, a prostaglandinas são metabolizadas por enzimas hidroxiprostaglandina desidrogenase (HPGD). Este processo se inicia pela remoção da dupla ligação entre os carbonos 13,14,dihidro-15-ceto PGs (PGMs) por ação da enzima 13,14-prostaglandina redutase (PRG-1) originando os metabólitos 13, 14-dihidro- 15-ceto PGF2 α (PGFM) e 13, 14-dihydro-15-ceto PGE2 (PGEM). Contudo,

a PGD2 ser metabolizada em PGs das séries ou J (PGJ2, Delta 12 PGJ2, 15-deoxy-delta-12,14PGJ2) ou F ($9\alpha,11\beta$ PGF2; isômero de PGF2 α) (SAITO; TSUDA; MICHIMATA, 2002).

4.2.2 Importância no contexto da reprodução animal

As prostaglandinas e seus receptores estão presentes em uma gama de tecidos e possuem variadas funções. Concernente aos órgãos reprodutivos, esta classe de eicosanoides são pontos críticos em variados eventos reprodutivos englobando a ovulação, reconhecimento materno da gestação, implantação, parto, luteólise e prenhez (WEEMS; WEEMS; RANDEL, 2006).

É notória a importância da PGF2 α no desencadeamento da luteólise e início de um novo ciclo em uma grande variedade de espécies (POYSER, 1995). Além disso, a PGF2 α é fundamental para o desencadeamento do parto e está envolvida no aumento da contratilidade e vasodilatação endometrial. Por outro lado, a PGE2 é conhecida por apresentar efeitos opostos à PGF2 α , caracterizada por seus efeitos luteotróficos, promove diminuição da contratilidade e vasodilatação no endométrio (HELLIWELL; ADAMS; MITCHELL, 2004)

A PGE2 é considerada uma das principais prostaglandinas envolvidas no sucesso da implantação em camundongos. Assim, observaram-se elevadas concentrações de PGE2 associadas às enzimas PTGS2 e PTGES1 no local de implantação no útero de camundongos (KENNEDY; GILLIO-MEINA; PHANG, 1973 PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006).

Diferente da PGE2, a PGF2 α tem sido relacionada à diminuição do sucesso gestacional. Por exemplo, em trabalho realizado com uso exógeno de PGF2 α demonstrou-se que os embriões bovinos em estágio de desenvolvimento de mórula a blastocisto expandido (dias 5-8) são mais susceptíveis aos efeitos negativos desta prostaglandina (SEALS et al., 1998). Scenna et al. (2005) mostraram que a manipulação inadequada do útero no momento da transferência de embriões pode provocar a liberação de prostaglandinas causando efeitos tóxicos aos embriões (SCENNA et al., 2005). Contudo, a PGE2 e PGF2 α são consideradas de grande importância no reconhecimento e manutenção da gestação (CHALLIS et al., 2002).

Entre as prostaglandinas, a PGD2 é o principal mediador químico liberado por mastócitos em processos inflamatórios, promove dilatação vascular local, permeabilidade vascular e quimiotaxia de linfócitos Th2 e eosinófilos (SAITO; TSUDA; MICHIMATA, 2002). Em machos a PTGDS é amplamente pesquisada em sêmen de bovinos e está relacionada com a qualidade do sêmen de touros (GERENA et al., 1998). Entretanto, a PTGDS está presente no trato reprodutivo feminino e em células do sistema imune. Em virtude das funções imunológicas da PGD2 e PGE2, estas prostaglandinas têm sido estudadas no endométrio de fêmeas bovinas portadoras de endometrite (GABLER et al., 2009; HERATH et al., 2009). A PTGDS e PTGES3 apresentaram concentrações 4 e 2 vezes maiores em vacas com endometrite subclínica que vacas saudáveis, respectivamente. De maneira similar, elevadas concentrações de PTGDS foram encontradas no endométrio de vacas portadoras de endometriose subclínica (GABLER et al., 2009). Entretanto, apesar da participação de PGE2 em processos imunológicos, os receptores PTGER2 e PTGER4 não foram diferencialmente expressos no endométrio de vacas portadoras de endometrites e vacas saudáveis (HERATH et al., 2009). PGDS foi avaliada durante todo o ciclo estral de vacas. A expressão da PGDS foi três vezes maior durante a primeira semana (dia 1-5) e durante toda a fase lútea permaneceu baixa (GABLER et al., 2009). Além disso, foram obtidas baixas concentrações de PGD2 em lavados endometriais realizados nos dias 12, 15 e 18 do ciclo estral de vacas prenhes e vazias (ULBRICH et al., 2009). Contudo, a função biológica da maior presença desta enzima no início do ciclo estral de fêmeas bovinas ainda não foi esclarecida.

A expressão de proteínas transportadoras de prostaglandinas como a SLCO2A1 aumenta entre os dias 13 e 18, no endométrio ipsilateral ao CL, indicando que esta proteína pode atuar no transporte de PGF2 α no momento da luteólise (BANU et al., 2003). Além disso, maiores concentrações de SLCO2A1 foram encontradas no útero e anexos placentários de vacas durante a gestação em comparação ao ciclo estral, sugerindo sua participação no transporte de PGs nos tecidos materno-fetais e no metabolismo de PGs durante a prenhez (BANU et al., 2005).

Os receptores de PTGER2 são abundantes no útero e na placenta e sua inativação em camundongos resulta na redução da ovulação, fertilização e implantação, indicando que o mesmo possui função importante na fertilidade de

fêmeas (KENNEDY et al., 1999). Durante a fase proliferativa, a inibição de PTGER2 e PTGER4 levou à inibição da invasão de células imortalizadas endometriais e estromais de humanos (LEE et al., 2011). Os receptores PTGER2, PTGER3 e PTGFR foram diferencialmente expressos entre o endométrio e os anexos placentários. Entretanto o receptor PTGER4 não foi expresso no endométrio nem em anexos placentários em amostras coletadas entre 50 e 250 dias da gestação em bovinos. Tal observação indicou que existem diferentes formas de sinalização pela PGE2 e PGF2 α entre os anexos fetais e a porção materna da placenta (AROSH et al., 2004). Finalmente, a enzima PTGS2 e o receptor PTGFR apresentaram elevada expressão em animais com o parto induzido, enquanto não foram observadas mudanças na expressão dos receptores PTGER2. Desta forma, as mudanças na expressão e distribuição dos receptores PTGFR e da enzima PTGS2 parecem estar associados aos mecanismos de indução do parto em bovinos (WEHBRINK et al., 2008).

4.2.3 Controle por Esteroides

Os efeitos dos esteroides nas células endometriais bovinas foi demonstrado por Kowalik et al. (2009) e em células miometriais, por Slonina et al. (2009). Células endometriais do dia 14-16 foram incubadas por 4 horas ou 6 horas sem progesterona e não houve alteração das concentrações basais de PGFM, entretanto houve aumento de PGE2 quando ao meio de cultivo foi adicionado P4 e ocitocina (KOWALIK et al., 2009). Contudo, em células miometriais a adição de P4 e ocitona ao meio não levou a aumento das concentrações de PGE2 ou de PGF2 α (SLONINA, et al., 2009).

Em outro experimento, a adição de estradiol, progesterona ou de AA resultou em aumento das concentrações de prostaglandinas em meios de cultivos de células endometriais de suínos. De forma que, a adição de AA aumentou pelo menos três vezes a concentração de PGE2 e PGF2 α . Enquanto a suplementação de meios com estradiol levou ao aumento das concentrações de PGE2 (10nM), sem alterar as concentrações de PGF2 α (BLITEK et al., 2010).

Anteriormente, em experimento realizado com fêmeas bovinas ovariectomizadas, também foi evidenciado o controle de esteroides sobre a síntese de PGF₂α. Assim, foi verificado que somente os animais que receberam o *primed* de P4 foram capazes de aumentar as concentrações do PGFM no sangue periférico 6 horas após a administração de estradiol, mostrando a importância da progesterona na síntese de PGF₂α (LAFRANCE; GOFF, 1988).

Em vacas de leite com ovulação sincronizada por ovsysch com aplicação de E2 17β no dia 0 (dia da ovulação) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) no dia 6, para obtenção de CL acessório. Este CL acessório levou ao aumento de P4 e resultou em maiores concentrações de PGFM, evidenciando que tanto o E2 como a P4 estimulam a síntese de PGF₂α (SANTOS et al., 2009).

Além disso, em outro experimento foi mostrado que a presença isolada de P4 ou E2 nos meios de cultivos não foi capaz de estimular a síntese de PGF₂α em explantes endometriais de fêmeas bovinas do dia 17 do ciclo estral. Contudo, a presença de ambos esteroides (P4 e E2) estimulou o aumento das concentrações de PGF₂α (MIGUEZ et al., 2005). Enfatizando o controle destes esteroides sobre a síntese de prostaglandinas.

4.3 PROSTACICLINA, TROMBOXANOS E LEUCOTRIENOS

4.3.1 Via de sinalização

Assim como as prostaglandinas e prostanóides, os tromboxanos são sintetizados a partir da PGH₂ por sintases específicas, e exercem suas funções biológicas através de receptores específicos localizados na superfície das células-alvo (NARUMIYA; FITZGERALD, 2001). Atualmente não foram identificadas isoformas de PGI₂ ou de TBXA₂ em bovinos. Desta forma, PTGIS e TBXAS1 são as enzimas responsáveis pela síntese de PGI₂ e de TBXA₂, respectivamente.

Os receptores de membrana PGIR e TBXAR2 são acoplados a proteína G e, ao serem ativados por PGI₂ ou TBXA₂, podem aumentar ou diminuir a produção de AMP cíclico ou induzir a mobilização do Cálcio (NARUMIYA et al., 1999). Assim

como a PGI₂, os leucotrienos também exercem seus efeitos em receptores associados a proteína G e podem agir em receptores ativados pelo proliferador de peroxissoma (PPAR) (FUNK, 2001; MURPHY; GIJÓN, 2007).

A família de receptores PPAR possuem semelhantes características estruturais e funcionais. Os receptores PPAR têm como principal função desencadear mecanismos de transcrição gênica e estão envolvidos em vários processos biológicos. Contudo, foram identificados genes diferentes para seus três maiores subtipos: PPAR α (NR1C1), PPAR δ/β (NR1C2) e PPAR γ (NR1C3). Contudo, os eicosanoides são ligantes endógenos do subtipo PPAR γ (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005).

A SLCO2A1 transporta TxA₂ com baixa afinidade entretanto não transporta PGI₂. Contudo, a PGI e o seu metabólito 6-ceto-PGF_{1 α} também tem afinidade por receptores nucleares da família PPAR (NARUMIYA et al., 1999).

4.3.2 Importância no contexto da reprodução animal

A PGI₂ é conhecida por sua alta capacidade vasodilatadora e inibitória da agregação plaquetária. Além disso, a síntese de PGI₂ via PGSH₂ reduz a apoptose e é benéfica ao desenvolvimento embrionário em camundongos (YIN et al., 2007; PAKRASI; JAIN, 2008). Contudo, em processos reprodutivos está relacionado principalmente com processo de implantação (KENNEDY et al., 1973). A PGI₂ é bastante instável e é rapidamente convertida a 6-ceto-PGF_{1 α} . Elevadas concentrações de 6-ceto-PGF_{1 α} foram encontradas no endométrio de vacas e porcas prenhes comparados ao endométrio de não prenhes (ULBRICH et al., 2009; MORAWSKA; KACZMAREK; BLITEK, 2012). Contudo, no útero de ratas a expressão da enzima PGIS foi significativamente elevada no início da gestação, enquanto que a expressão da enzima PGDS apresentou-se elevada ao final da gestação (SHOONER et al., 1999; KENGNI et al., 2007). Evidenciando as funções destas PGs em distintas etapas do ciclo estral, PGI durante a implantação e PGD no parto.

Por outro lado, em cultivos de embriões de camundongos foi observado que a presença de inibidores de PTGS₂ e de PGI₂ levaram ao aumento da apoptose,

contudo a presença de análogo de PGI diminui a apoptose. Nesta mesma pesquisa, a exposição a inibidores de PTGS2 e PGI2 decaiu taxa de implantação no experimento de transferência de embriões e houve aumento da implantação quando PGI2 foi suplementada (PAKRASI; JAIN, 2008).

Foi evidenciado a participação de outros eicosanoides em eventos reprodutivos. Desta forma, observou-se que camundongos transgênicos expressando o receptor de tromboxano TBXAR2 em excesso apresentaram um aumento da incidência de isquemia em placentas, retardando o crescimento embrionário, sugerindo uma função importante destas moléculas (ROCCA et al., 2000).

Além disso, foi mostrada a relevância dos leucotrienos como componentes efetivos na resposta inflamatória e na reprodução tem sido alvo de pesquisas envolvendo manutenção da gestação e luteólise (KORZEKWA et al., 2010; KORZEKWA; LUKASIK; SKARZYNSKI, 2010).

4.3.3 Controle por Esteroides

Os hormônios esteroides ovarianos são reguladores da vascularização do endométrio, este controle ocorre via regulação da expressão das enzimas de síntese de PGI2 e TxA2. O E2 atua promovendo a vasodilatação através da liberação de vários compostos, dentre eles os prostanóides, como as PGI2 e os TBXA2, que por sua vez exercem funções opostas sobre o tônus uterino (SOBRINO et al., 2010).

Em pesquisa realizada com cultivos de células esteroidogênicas luteais coletadas no início (2-4), na metade (8-10) e no final (17-19) do ciclo estral de bovinos, foi observado que metabólitos ativos de araquidonato 5 lipoxigenase (ALOX5) provocaram alterações na produção de P4. Assim, o LTB4 elevou as concentrações de P4 e inibiu a produção de PGF2 α no meio de cultivo entre os dias 8 e 10 enquanto a LTB3 apresentou efeitos opostos inibindo a P4 e estimulando a PGF2 α (KORZEKWA et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por pesquisa *in vivo* em bovinos (KORZEKWA et al., 2010). Desta forma, especula-se que LTB4 seja luteotrópico e o LTB3 tenha função luteolítica. Mostrando a interessante participação da lipoxigenase e dos leucotrienos na síntese de P4.

4.4 ÁCIDOS HIDROXIEICOSATETRAENOICOS

4.4.1 Via de sinalização

Os ácidos hidroxieicosatetraenóicos, diferente das prostaglandinas, prostanóides e leucotrienos, não utilizam um metabólito intermediário como precursor de todos os ácidos hidroxieicosatetraenóicos. Desta forma, as enzimas específicas desta via (ALOX12, ALOX15) ou peroxidases metabolizam o AA diretamente em ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenóicos (HPETEs), que são convertidos a ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) por reações não enzimáticas (BRASH, 1999; COFFA; SCHNEIDER; BRASH, 2005). Os metabólitos das lipoxigenases são os ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenóicos (HPETEs) que posteriormente são convertidos por peroxidases originando os hidroxigraxos (HETEs). Os produtos resultantes HETEs exercem seus efeitos biológicos por meio de receptores acoplados a Proteína G e da família PPGAR (BRASH, 1999; SHERWIN; CATALANO; SHARKEY, 2006; EL-SAYED et al., 2013).

4.4.2 Importância no contexto da reprodução animal

Diferente dos prostanóides, há poucas informações relacionadas às atividades biológicas dos ácidos hidroxieicosatetraenóicos no sistema reprodutivo de fêmeas bovinas. Contudo, uma gama de pesquisas tem sido realizada envolvendo este grupo de eicosanóides. As funções das enzimas ALOX12 e ALOX15 são alvo de pesquisas sobre alterações reprodutivas e durante a implantação, principalmente em humanos e camundongos (CHEON, 2002; LIU et al., 2010).

Em pesquisas com camundongos demonstrou-se que a ALOX15 é expressa no epitélio luminal do endométrio de camundongos no período de implantação. Ainda neste mesmo experimento a ALOX15 foi regulada pela administração de progesterona exógena (CHEON, 2002). Outras pesquisas utilizando inibidores de ALOX15 demonstraram que estes levaram a aproximadamente 90% de falhas na

implantação em camundongos (LI et al., 2004). Demonstrou-se ainda que o metabólito de ALOX15, 12-HETE exerce atividades biológicas benéficas à implantação via receptores PPAR (LI et al., 2004). Finalmente, em bovinos ALOX15 teve a expressão reduzida em embriões que após transferidos em receptoras não levaram a gestação a termo (EL-SAYED et al., 2013). Estes fatos indicam a relevância da ALOX15 no processo de implantação.

4.4.3 Controle por Esteroides

A adição de P4 estimulou a expressão de mRNA da enzima ALOX15 em tecidos endometriais de camundongos ovariectomizados tratados com progesterona (40 mg/kg peso vivo) por 4, 8 e 24 horas. A expressão de mRNA de ALOX12 apresentou crescentes padrões de expressão para os tecidos endometriais tratados com progesterona de 4 a 24 horas. Contudo, presença do inibidor de progesterona RU486 (8 mg/kg peso vivo) levou a ausência da expressão gênica de ALOX15 (SHERWIN; CATALANO; SHARKEY, 2006).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

O experimento foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no campus de Pirassununga. Foram utilizadas vacas da raça nelore, cíclicas, múltiparas, solteiras, sem a presença de alterações patológicas em avaliações clínicas e ultrassonográficas prévias à realização do experimento. As vacas apresentaram escore de condição corporal entre 3,5 e 4 numa escala de 1 a 5 (1 muito magra e 5 obesa). Os animais permaneceram alojados em piquetes com pastagem de braquiaria (*Brachiaria spp.*) e foram suplementadas com silagem de milho, cana de açúcar picada, concentrado e minerais, balanceados para atender às exigências de manutenção e ganho de peso moderado, e água *ad libitum*. Os grupos, descritos abaixo, foram divididos de forma homogênea levando em consideração peso e escore de condição corporal.

5.2 MANEJO REPRODUTIVO

O modelo animal foi fundamentado na manipulação farmacológica do crescimento de folículos ovarianos que resultassem em grupos apresentando folículo pré-ovulatório (FPO) e corpo lúteo (CL; subsequente à ovulação desse folículo) grande (F/CLG; n=11) ou pequeno (F/CLP; n=11). Tal manipulação objetivou o controle da produção de estradiol pelo FPO e de progesterona (P4) pelo CL, durante o proestro e início do diestro, respectivamente. Desta forma, pretendeu-se obter grupos de animais expostos a ambientes endócrinos distintos, especificamente caracterizados por elevadas (F/CLG) ou baixas (F/CLP) concentrações de esteroides.

Assim, os animais foram pré-sincronizados por duas injeções de PGF2 α (0,5 mg – IM, Sincro-cio, Ouro Fino, Cravinhos-SP, Brasil) com 14 dias de intervalo. Dez dias após a segunda injeção, a sincronização foi iniciada com a inserção de

dispositivo intravaginal de liberação de P4 (1,0 g – Sincrogest, Ouro Fino, Cravinhos-SP, Brasil) e administração de benzoato de estradiol (BE) (2,0 mg – IM, Sincrodiol, Ouro Fino, Cravinhos-SP, Brasil) para induzir o recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular. O crescimento folicular dos animais foi controlado pela presença (nenhuma injeção; F/CLP) ou ausência (injeção de PGF2 α no dia da inserção do dispositivo; F/CLG) de um CL funcional (P4 endógena) e por manipular um menor (F/CLP) ou maior (F/CLG) intervalo entre a remoção do dispositivo de liberação de P4 e a indução da ovulação por injeção de GnRH (1,0 μ g de acetato de buserelina, Sincroforte, Ouro Fino, Cravinhos-SP, Brasil) nos animais. Tal estratégia foi eficaz na manipulação das concentrações de E2 durante o proestro e P4 no diestro conforme descrito no artigo submetido por Mesquita et al. (2013): “Manipulation of the periovulatory sex-steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression on early diestrus Nelore cows”, (Apendice A). O abate dos animais foi realizado 7 dias após a indução da ovulação para coleta do trato reprodutivo.

5.3 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Para realização de avaliações ultrassonográficas (US) via transretal foi utilizado o equipamento da marca ALOKA (Aloka echo câmera, modelo SSD-500, Tóquio, Japão), conectado a uma sonda linear de 5 MHz. O exame ultrassonográfico realizado no dia da inserção do dispositivo de liberação de P4 (D-10) teve como finalidade a confirmação da presença de CLs responsivos ao tratamento com PGF2 α , uma premissa para a estratégia de formação dos grupos experimentais. As avaliações realizadas no D-2, D-1 e DO objetivaram a localização e mensuração do diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) e no D1 para identificação da ovulação que foi atribuída ao desaparecimento do FPO identificado em avaliações US anteriores. Entre os D2 e D7 foram realizadas avaliações US para acompanhar o desenvolvimento dos CLs. Os animais com ausência de CL no D-10 e que não ovularam em resposta ao GnRH foram excluídos deste experimento.

5.4 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Amostras de sangue foram obtidas entre os dias D-2 a D0 e D0 a D7 para análises das concentrações de E2 e P4, respectivamente. As amostras de sangue foram obtidas por punção jugular utilizando agulha 21G unida à tubo evacuado contendo heparina de sódio acoplados à aparato de coleta a vácuo. As amostras de sangue permaneceram em gelo até a sua centrifugação. A centrifugação das amostras foi realizada em centrífuga Sorvall (SORVALL[®] RC-3B Plus High Capacity Centrifuge) a 650 x g durante 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o plasma foi aliquoteado e armazenado a -20°C.

O abate dos animais foi realizado no Abatedouro Escola da Prefeitura do Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo e as amostras foram processadas no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), localizado a 300 metros do abatedouro. Após o abate, o trato reprodutivo foi coletado e transportado em gelo até o CBRA. Posteriormente, o trato reprodutivo foi colocado em bandeja previamente identificada com o local da ovulação, indicando o corno uterino ipsolateral ao ovário contendo o CL e contralateral àquele ovário. Em seguida, os ovários foram retirados e a bandeja com útero foi levada ao Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Animal do CBRA para processamento.

O lúmen de cada corno uterino foi lavado com 20 mL de solução tampão fosfato (PBS). Os lavados uterinos foram centrifugados a 10.000 x g, aliquoteados em criotubos de 2 mL e armazenados a -80°C. Cada corno uterino foi incisado longitudinalmente na sua porção anti-mesometrial, para dissecação do tecido endometrial da região intercaruncular. O processamento de tecidos endometriais foi realizado conforme descrito por (MESQUITA et al., 2012). Alíquotas de lavado e tecido endometrial foram congeladas em nitrogênio líquido e em seguida armazenadas a -80°C, para análise de transcritos e metabólitos.

5.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

5.5.1 Extração de RNA

Aproximadamente 30 mg de tecido endometrial da porção medial do corno uterino ipsolateral ao CL foram submersas em nitrogênio líquido e maceradas em aparato de aço inoxidável pela aplicação de pressão, resultando na pulverização do tecido endometrial. Em seguida, foi realizada a extração de RNA das amostras utilizando-se Kit “RNAeasy mini” (Quiagen Laboratories, Valência, CA, Estados Unidos) de acordo com instruções do fabricante. A concentração do extrato de RNA foi mensurada por espectrofotômetro de baixo volume (NanoDrop, Termo Scientific, Wilmington, U.S.A.). Os extratos foram armazenados a -80°C.

5.5.2 Síntese de cDNA

Previamente à transcrição reversa (RT), as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Pure Link™ Genomic DNA Purification; Deoxyribonuclease I – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), segundo indicações do fabricante. O tratamento com DNase I foi realizado em temperatura ambiente utilizando 1,0 µg de RNA em reação com volume total de 10,0 µL. Após incubação por 15 minutos foi adicionado 1,0 µL de EDTA (25mM; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e aquecimento a 65°C durante 10 minutos. Para a transcrição reversa, preparou-se 9,0 µL de solução Master Mix contendo RT buffer (2,0 µL), dNTP mix (0,8 µL), *primers* randômicos (2,0 µL), inibidor de RNase (1,0 µL), transcriptase reversa (1,0 µL) e água livre de nucleases (3,2 µL), seguindo instruções do fabricante (High Capacity cDNA Reverse Transcrição Transcription Kit, Life Technologies™, Frederick, Maryland, USA). Em seguida, o Master Mix (9,0 µL) foi adicionado aos 11,0 µL de amostras tratadas com DNase I. As amostras permaneceram sob incubação durante 10 minutos a 25°C e por 2 horas a 37°C, seguido por inativação da transcriptase reversa à 85°C por 5 minutos, e estocadas a 20°C.

5.5.3 Desenho de *Primers*

Os *primers* senso e anti-senso, disponíveis na tabela 1, foram obtidos por meio de publicações científicas ou desenhados utilizando ferramentas disponíveis na internet e/ou o *software Primer Express V.3.0.1* (Life Technologies™Frederick, Maryland, USA).

Todas as identificações dos genes alvo utilizadas no desenho de *primers* foram encontradas por pesquisas nas bases de dados da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Utilizando-se a identidade adquirida pelo NCBI foram obtidas as sequências de *primers* senso e anti-senso pelo *software* PrimerQuest disponível no site *Integrated DNA Technologies* (IDT) (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Em seguida, a ferramenta *Oligo Analyzer 3.1* (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) foi utilizada para avaliar a qualidade dos *primers* levando em consideração a probabilidade de formação de homodímeros, heterodímeros e *hairpins*. Sequências dos genes contendo as ligações éxon-éxon utilizadas para os *primers* desenhados no *software Primer Express® 3.0.1* (Life Technologies™Frederick, Maryland, USA) foram encontradas no programa *Genome Browser Gateway*, disponível no site *USDC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/index.html>). O programa Blast® “Basic Local Alignment Search Tool” (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) foi utilizado para avaliar a especificidade dos *primers* obtidos tanto pelo *software Oligo Analyzer* como pelo *Primer Express*. Os *primers* foram sintetizados por laboratório terceirizado (<https://commerce.invitrogen.com/>).

5.5.4 Validação de *Primers*

As reações de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR) foram executadas em termociclador *Step One Plus™ Real Time System* (Applied Biosystems® – Life Technologies Corporation, Frederick, Maryland, USA). O termociclador foi programado para iniciar com estágio de espera (95°C por 10 minutos), seguido por 40 ciclos compostos por fase de desnaturação (95°C por 15

segundos) e anelamento e extensão (60°C por 1 minuto). A curva de dissociação (“melting”) foi obtida imediatamente após a amplificação permanecendo a 95°C por 15 minutos, passando a 60°C por 1 minuto e voltando a 95°C por 15 minutos.

Quadro 1 - Nomenclatura, *primers forward* (F) e *reverse* (R), sequência dos *primers*, identificação representativa (ID) e números de pares de bases (pb) dos genes

(continua)

Nomenclatura Gene	Gene	Sequência 5'-3'	ID	N° PB
Aldo-ceto reductase family1, member B1 ^A	AKR1B1_F	ATACAAGCCGGCGGTTAAC	NM_001012519	188
	AKR1B1_R	TGTCTGCAATCGCTTTGATC		
Aldo-ceto reductase family1, member C3 ^B	AKR1C3_F	GACTCAGTTCTTTGTGCCATTGC	NM_001038584.1	154
	AKR1C3_R	TCAGTTCAAAGTCAAACACCTGTATG		
Aldo-ceto reductase family1, member C4 ^C	AKR1C4_F	TCCTGTCCTGGGATTTGGAACCTT	NM_181027.2	166
	AKR1C4_R	ATCGGCAATCTTGCTTCGAATGGC		
Arachidonate 5-lipoxygenase ^C	ALOX5_F	CAAGCAGCACAGACGCAAAGAACT	NM_001192792.1	108
	ALOX5_R	AAGTCCTTGTGGCATTGGCATCG		
Arachidonate 12-lipoxygenase ^C	ALOX12_F	AGACATGGTGCCTCTGGGGCAT	NM_001192336.1	134
	ALOX12_R	GGTCAAGTTGCTCATTGCGGGC		
Arachidonate 12-lipoxygenase ^C	ALOX12S_F	GGAAAGGGAAATTACAGCCCGCAA	NM_001192336.1	85
	ALOX12S_R	AGTGACGCTGTTCTCTATGTGGCT		
Arachidonate 15-lipoxygenase B ^C	ALOX15B_F	TCTTCAAGCTGCTGATCCCTCACA	NM_001205703.1	187
	ALOX15B_R	ATATCATCAGGCAGACACAGGGCA		
Carbonyl reductase 1 ^B	CBR1_F	TTGCCTTCAAGACTGCTGACA	NM_001034513.1	153
	CBR1_R	CACTGACAAAGCTGGATACATTCAC		
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD) ^A	HPGD_F	TGATCAGTGGAACTACCTGG	NM_001034419	183
	HPGD_R	TGAGATTAGCAGCCATCGC		
Phospholipase A2, group X, transcript variant1	PLA2G10_F	TGTGCCCGAAGGTAGGGCTGTT	XM_864950.4	138
	PLA2G10_R	GGCGAGGGCCAACACAGTCAAT		
Prostaglandin D2 receptor ^C	PTGDR_F	TTCAGCACAGCAACAAGCTCACAG	NM_001098034.1	115
	PTGDR_R	ATCTTACCATCTCCACCAAGGGCA		
Prostaglandin D2 synthase ^C	PTGDS_F	AGGTCAAGGAACACTTCACCACCT	NM_174791.4	82
	PTGDS_R	TTGTCAGTCTTCGGCAGGAACACA		
Prostaglandin E receptor 2 ^A	PTGER2_F	CTACTTGCCTTTTCCATGACC	NM_174588	210
	PTGER2_R	GATGAAGCACACGTC		
Prostaglandin E receptor 4 ^A	PTGER4_F	CGATGAGTATTGAGCGCTACC	NM_174589	237
	PTGER4_R	AGCCCGCATACATGTAGGAG		
Prostaglandin E synthase ^C	PTGES_F	GCTGCGGAAGAAGGCTTTTGCC	NM_174443.2	101
	PTGES_R	GGGCTCTGAGGCAGCGTTCC		

(conclusão)

Nomenclatura Gene	Gene	Sequência 5'-3'	ID	N° PB
Prostaglandin E synthase 2 ^C	PTGES2_F	GTGGGCGGACGACTGGTTGG	NM_001166554.1	192
	PTGES2_R	CGGAGGTGGTGCCTGCGTTT		
Prostaglandin E synthase 3 ^B	PTGES3_F	CAGTCATGGCCAAGGTTAACAAA	NM_001007806.2	150
	PTGES3_R	ATCACCACCCATGTTGTTTCATC		
Prostaglandin endoperoxide synthase 1 ^C	PTGS1_F	CACCCGCTCATGCCGACTC	NM_001105323.1	155
	PTGS1_R	TTCCTACCCCCACCGATCCGG		
Prostaglandin endoperoxide synthase 2 ^C	PTGS2_F	CCAGAGCTCTTCCTCCTGTG	NM_174445.2	161
	PTGS2_R	GGCAAAGAATGCAAACATCA		
Prostaglandin I2 synthase ^C	PTGIS_F	AAGATGGGAAGCGACTGAAG	NM_174444.1	136
	PTGIS_R	ATCAGCTCCAGGTCAAACCTG		
Solute carrier organic anion transporter family, member 2A1 ^B	SLCO2A1_F	TGTGGAGACGATGGGATTGA	NM_174829.3	150
	SLCO2A1_R	GGGACACGGGCCTGTCTT		
Thromboxane A2 receptor ^C	TBXA2R_F	TGTCCTTCCTGCTCAACACCATCA	NM_001167919.1	141
	TBXA2R_R	AAATGCTGGCCACCACCATAATGC		
Thromboxane A synthase 1 ^C	TBXAS1_F	TCACCAACACTCTCTCTTTTCGCCA	NM_001046027.1	94
	TBXAS1_R	TCCTTGCTGAAACAGTCCACCTCT		

Software utilizado no delineamento das sequências de *primers* ou referência de artigo de origem: ^AUlbrich et al., 2009; ^BPrimer Express; ^CPrimerQuest

Os *primers* (Quadro1) liofilizados foram diluídos em água DEPC (livre de nucleases) originando soluções de estoque com concentração de 100 mM. As soluções de trabalho com concentração de 20mM foram preparadas por rediluição das soluções de estoque. Ambas soluções foram armazenadas a -20°C.

De forma simplificada, as reações de qPCR continham uma mistura de soluções contendo os *primers* senso e anti-senso, solução *Master Mix* pré-preparada (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Life Technologies Corporation, Frederick, Maryland, USA) e água totalizando 16,0 µL. A essa solução foram adicionados 4,0 µL de solução contendo cDNA, exceto os poços que serviram como controle negativo que receberam 4,0 µL de água DEPC no lugar dos 4,0 µL de solução de cDNA. Quando utilizada, a solução de cDNA foi diluída em água DEPC a 1:80, a menos que especificamente mencionado.

Realizaram-se testes com o intuito de encontrar concentrações de *primers* que estabelecessem maior eficiência nas reações de qPCR. Os critérios para

escolha da melhor concentração de *primers* foram: (1) eficiência de amplificação entre 85 e 110% (2) ausência de amplificação no controle negativo (3) único pico na curva de *melting* e (4) menor ciclo limiar (cycle threshold; CT). Primeiramente foram realizados testes nas concentrações de 150 ou 300 nM para cada par de *primer* (senso e anti-senso), e quando necessário, concentrações maiores ou menores foram testadas. Cada concentração foi testada em duplicata e com um poço usado como controle negativo. Para verificação da eficiência, dados extraídos do termociclador foram avaliados pelo programa *LinReg* (Ruijter et al., 2009; <http://www.gene-quantification.de/download.html#linregpqr>). Foram escolhidas as concentrações de *primers* que apresentaram melhores resultados segundo os critérios acima. A seguir, foi testada uma curva padrão composta por cinco pontos, em duplicatas, contendo *pool* de cDNA diluído em série, normalmente de 1:20 a 1:320, em água DEPC. Os dados de amplificação foram analisados pelo programa *StepOne Plus™* (Software v2.2.2, Life Technologies Frederick, Maryland, USA). A eficiência de amplificação foi calculada pela seguinte equação: Eficiência = $-1 + 10^{(-1/\text{inclinação})}$. Foram consideradas validadas as curvas padrão com eficiência entre 85 e 110% e coeficiente de determinação (R^2) próximo a 1. Estabelecidas as validações foram realizadas reações para comparar a abundância de cada transcrito entre os grupos F/CLP e F/CLG. Todas as amostras com cDNA e os controles negativos foram analisadas em triplicata na comparação. A quantificação de transcritos presentes nas amostras de cada vaca que compõe os grupos F/CLP e F/CLG foi realizada de forma relativa à quantidade de transcritos de um gene endógeno (ciclofilina), pelo método delta delta CT ajustado para a eficiência de amplificação, segundo descrito por Pfaffl (2001).

5.5.5 Eletroforese

Para verificar se os produtos da reação de PCR continham *aplicons* únicos e com o peso molecular esperado, estes foram avaliados por eletroforese em géis de agarose a 2% em tampão tris-borato EDTA (TBE Tris 0,045 M, ácido bórico 0,045 M e EDTA 0,001 M) com espessura de 5 mm. Durante a preparação da solução de

agarose, foram adicionados 3,5 μL de corante fluorescente para ácidos nucleicos (GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain, Biotium Glowing Products for Science™, Hayward, USA). Após enrijecimento do gel, adicionaram-se as amostras aos poços. Cada amostra continha 3,0 μL de loading buffer e 3,0 μL de produtos de PCR. Um padrão de peso molecular de 100 pb (100 bp DNA Ladder; Promega Corporation, Madison, USA) ou 50 pb (50 pb DNA ladder, New England Biolabs, Ontario, Canadá) foi adicionado a cada gel e corrido junto às amostras. Para a eletroforese, os géis foram submersos em tampão TBE 0,5 X e aplicou-se tensão de 150 V durante 1 hora. Para cada transcrito testado, adicionou-se produto de amplificação oriundo de reação de PCR contendo (controle positivo) ou não contendo cDNA (controle negativo). Após a eletroforese, os produtos de amplificação foram visualizados nos géis a partir de imagens obtidas por fotodocumentador (MiniBis Camera; DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém, Israel) com luz UV e processadas por *software GelCapture* (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalém, Israel). Buscou-se estimar o peso molecular dos *amplicons* usando como base os padrões de peso molecular. Buscou-se ainda avaliar a presença de um ou múltiplos *amplicons* no controle positivo e ausência de *amplicons* no controle negativo.

5.5.6 Sequenciamento de Produtos de PCR

Para verificar se os produtos da reação de PCR apresentaram sequência de nucleotídeos condizente com a esperada, baseando-se no desenho de *primers*, estes foram purificados e sequenciados. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se *kit QIAquick*® (PCR Purification Kit; Qiagen Laboratories, Valência, CA, Estados Unidos), seguindo instruções do fabricante. Foram utilizados 200 μL de um *pool* de diversas reações de amplificação de PCR de um mesmo transcrito seguindo as instruções do fabricante. A concentração dos produtos de PCR purificados foi quantificada utilizando-se espectrofotômetro modelo *NanoVue* (GE Healthcare, Life Sciences, Freiburg, German). Amostras com volume final de 7,5 μL contendo produtos de PCR purificados (concentração 10 ng/ μL) e seus respectivos *primers* (5 μM ; senso ou anti-senso) foram enviadas para o sequenciamento, realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. As

sequências dos resultados foram acessadas pelo software *Chromas* (<http://technelysium.com.au/>) e sua especificidade foi avaliada pelo programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

5.6 LIPIDÔMICA – ULTRA-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Análises de lipidômica de tecido endometrial (n= 5 animais por grupo) e lavados uterinos (n=5; FGLP e n=8; FCLG) foram realizadas em colaboração com o Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas do instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual de Campinas e Institutet Karolinska, na Suécia. Resumidamente, foi realizada quantificação de oxilípides nas amostras de tecido e lavado endometrial usando a técnica de Target Lipidomics como descrita por Newman et al. (2002).

De forma resumida, 4,0 mL de lavado uterino foram carregados em coluna de extração sólida Oasis-HBL 60 mg (Waters), e em seguida foi realizada a purificação dos oxilípides. A extração de oxilípides do tecido endometrial (100 mg) foi realizada por suspensões em metanol e hexano. Tanto as amostras de lavado uterino como de tecido endometrial foram analisadas por Cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC-MS/MS) no modo SRM (Single Reaction Monitoring) em modo negativo utilizando aparelho ABI QTRAP 5500 (Hybrid Triple Quadrupole/Linear Ion Trap Mass Spectrometer, Agilent) ou um XEVO TQ MS (Triple Quadrupolo Mass Spectrometer, Waters) ambos operando com um aparelho UPLC ACQUITY (Waters).

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado Test t de Student para comparação de médias entre o grupo F/CLP e F/CLG tanto para quantificação de transcritos quanto para quantificação de metabólitos. Consideraram-se valores de $P < 0,01$ como significativos para análise de expressão gênica e $P < 0,05$ para análise dos dados obtidos na lipidômica.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 MODELO ANIMAL

Os grupos de animais utilizados neste experimento, F/CLP e F/CLG, foram manipulados farmacologicamente para obtenção de ambientes endócrinos periovulatórios sob baixas ou elevadas concentrações de esteroides, respectivamente. Para verificar a eficácia desta manipulação, variáveis envolvendo o crescimento do folículo pré-ovulatório e do CL, assim como as concentrações de E2 e P4 foram avaliados. Como esperado, os folículos pré-ovulatórios do grupo F/CLP tiveram menor diâmetro em mensurações realizadas no dia -2 ($7,88 \pm 0,31$ vs. $10,31 \pm 0,42$ mm; $P < 0,0001$) e no dia 0 ($10,35 \pm 0,30$ vs. $12,94 \pm 0,31$ mm; $P < 0,0001$, quando comparados aos do grupo F/CLG. Conseqüentemente, o CL do grupo F/CLP apresentou menor massa ($1,99 \pm 0,16$ vs. $3,05 \pm 0,42$ g; $P < 0,01$) e volume ($1,85 \pm 0,18$ vs. $2,51 \pm 0,32$ cm³; $P < 0,08$) comparado ao grupo F/CLG. Desta forma, o grupo F/CLP apresentou concentrações de P4 inferiores às do grupo F/CLG no dia 7 ($2,74 \pm 0,32$ vs. $3,79 \pm 0,29$ ng/mL; $P < 0,06$) e de P4 acumulada do dia 3 ao dia 7 ($2,47 \pm 0,30$ vs. $3,44 \pm 0,27$ ng/mL; $P < 0,06$). Portanto, a manipulação do crescimento folicular para a obtenção de animais capazes de gerar folículos menores (F/CLP) ou maiores (F/CLG) e de produzir maiores ou menores concentrações de progesterona durante o período periovulatório foi alcançada com êxito. Informações adicionais a estes resultados encontram-se no (apêndice A).

6.2 ABUNDÂNCIA DE RNAm DE FOSFOLIPASES (PLA2) E CICLOOXIGENASES (PTGS1 E PTGS2)

Análises de qPCR foram realizadas para verificar se os ambientes uterinos submetido às condições hormonais apresentadas nos grupos F/CLG e F/CLP modularam a expressão gênica de proteínas envolvidas na síntese e sinalização de eicosanoides. Todos os pares de *primers* utilizados nas análises de qPCR foram validados conforme descrito anteriormente e os resultados das validações

encontram-se na tabela 1. A especificidade da amplificação dos *primers* utilizados foi confirmada por eletroforese dos produtos de amplificação em gel de agarose. Para cada gene testado, observou-se banda única no controle positivo e ausência de bandas no controle negativo (Figuras 2 e 3). Adicionalmente, foi realizado sequenciamento dos produtos da PCR e confirmou-se que os cDNAs amplificados corresponderam aos genes alvo testados. O gel e sequenciamento do gene PLA2G10 não foi realizado devido à quantidade insuficiente de produto de PCR.

As enzimas fosfolipases são as principais enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides. Estas enzimas disponibilizam o AA, principal precursor na síntese de todos eicosanoides (KUDO; MURAKAMI, 2002). O AA disponível pode ser oxigenado por cicloxigenases (PTGS1 e 2) ou lipoxigenases (ALOX), gerando uma série de metabólitos biologicamente ativos (BUCZYNSKI; DURLAO; DENNIS, 2009).

É estabelecido que as PLAs atuam na regulação da síntese de PGs em células epiteliais endometriais bovinas cultivadas *in vitro*. Assim, foi observado que este tipo de célula produz maior quantidade de PGF2 α , de forma constitutiva, que de PGE2. Entretanto, a presença de PLA2 resultou em aumento da síntese de PGE2 e diferentes PLA2 (PLA2G10 e PLA2G4) promoveram diferentes estímulos na síntese de PGF2 α e PGE2. Assim, a regulação depende da síntese de PGs depende do tipo de PLA2 expressa (TITHOF *et al.*, 2007). Contudo, em experimento realizado em ratas ovariectomizadas a inserção de implantes subcutâneos de P4 e E2, foi observado que tanto o E2 como a P4 aumentam a atividade de PLA2 (PAKRASI; CHENG; DEY, 1983). Assim, análises realizadas por microarranjo de DNA e qPCR do endométrio de vacas mostrou aumento da abundância da enzima PLA2G10 do metaestro ao diestro (dia 3,5 ao dia 12) que coincidiu com o período de aumento das concentrações plasmáticas de P4, demonstrando o possível envolvimento dos esteroides na expressão de genes da enzima PLA2 (MITKO *et al.*, 1998). Contudo, no presente estudo foi observada maior expressão gênica de PLA2G10 nos animais do grupo F/CLP (P<0,10; Tabela 3).

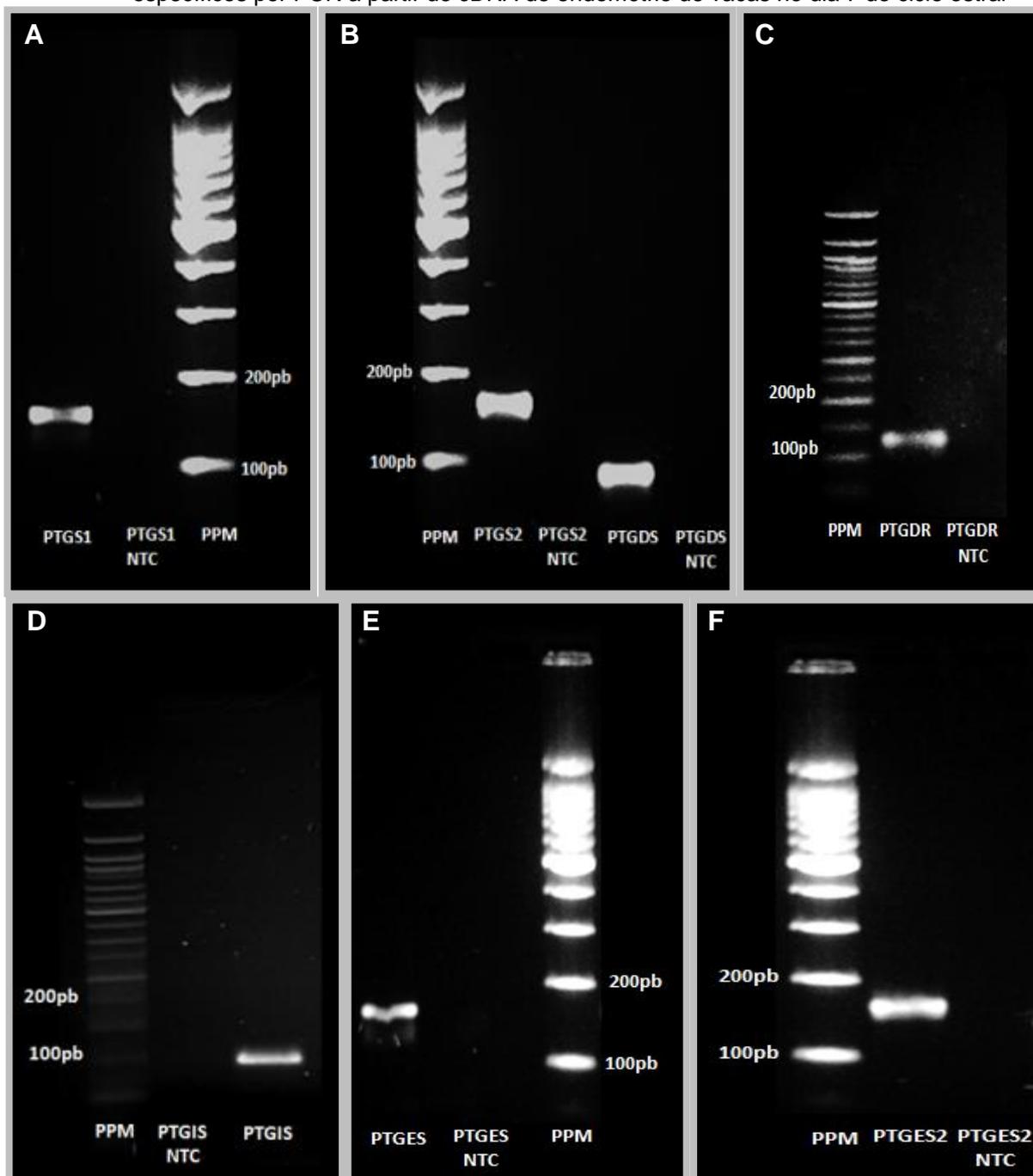
As PTGS são enzimas que catalisam a conversão de AA em PGG2 e PGH2 (SIMMONS; BOTTING; HLA, 2004). Tais produtos são utilizados por sintases específicas na produção de PGs, PGI2 e TBX (FUNK, 2001). Diferentes padrões de expressão foram encontrados para estas duas enzimas durante o ciclo estral de ovelhas, de forma que a enzima PTGS1 foi constantemente expressa ao longo do ciclo estral, enquanto a PTGS2 manteve-se ausente nos primeiros dias do diestro

seguido por aumento em sua expressão até o dia 17 tanto em ovelhas prenhes como em vazias. Além disso, a PTGS2 não foi expressa no endométrio de ovelhas castradas, ou seja, na ausência de E2 e P4, devido à possível regulação destas enzimas por esteroides. Dentro do presente estudo esperava-se diferentes padrões de expressão gênica destas enzimas nos grupos F/CLG e F/CLP, no entanto, os transcritos das PTGS1 e PTGS2 não foram diferencialmente expressos entre os grupos ($P > 0,10$; Tabela 3). Mostrando que a manipulação das concentrações endógenas de esteroides não influenciou a síntese das enzimas ciclooxigenases entre os grupos F/CLG e F/CLP.

Tabela 1 - Características das reações de amplificações e da curva padrão para validação dos primers

Nomenclatura Gene	Gene	Inclinação da Curva Padrão (Slope)	R ²	Eficiência Curva-padrão (%)
Aldo-ceto reductase, family1, member B1	AKR1B1	-3,48	1,00	93,9
Aldo-ceto reductase, family1, member C3	AKR1C3	-3,27	0,94	102,2
Aldo-ceto reductase, family1, member C4	AKR1C4	-3,51	1,00	92,6
Arachidonate 12-lipoxygenase	ALOX12	-3,22	0,99	104,7
Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type	ALOX 12S	-3,46	0,98	95,8
Arachidonate 15-lipoxygenase B	ALOX15B	-3,54	0,99	91,6
Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	-3,24	0,99	103,6
Carbonyl reductase 1	CBR1	-3,39	1,00	97,1
Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	HPGD	-3,52	0,98	92,5
Phospholipase A2, group X, transcript variant1	PLA2G10	-3,19	0,99	105,8
Prostaglandin D2 receptor	PTGDR	-3,07	0,97	100,6
Prostaglandin D2 synthase	PTGDS	-3,37	0,99	97,9
Prostaglandin E receptor 2	PTGER2	-3,24	0,96	103,3
Prostaglandin E receptor 4	PTGER4	-3,24	0,99	103,6
Prostaglandin E synthase	PTGES	-3,33	0,99	99,6
Prostaglandin E synthase 2	PTGES2	-3,44	0,99	95,3
Prostaglandin E synthase 3	PTGES3	-3,55	0,99	91,2
Prostaglandin endoperoxide synthase1	PTGS1	-3,61	0,94	88,9
Prostaglandin endoperoxide synthase2	PTGS2	-3,30	0,97	100,8
Prostaglandin I2 synthase	PTGIS	-3,34	0,99	99,4
Solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	SLCO2A1	-3,30	1,00	100,9
Thromboxane A synthase 1	TBXAS1	-3,32	0,99	100,0
Thromboxane A2 receptor	TBXA2R	-3,46	0,98	94,5

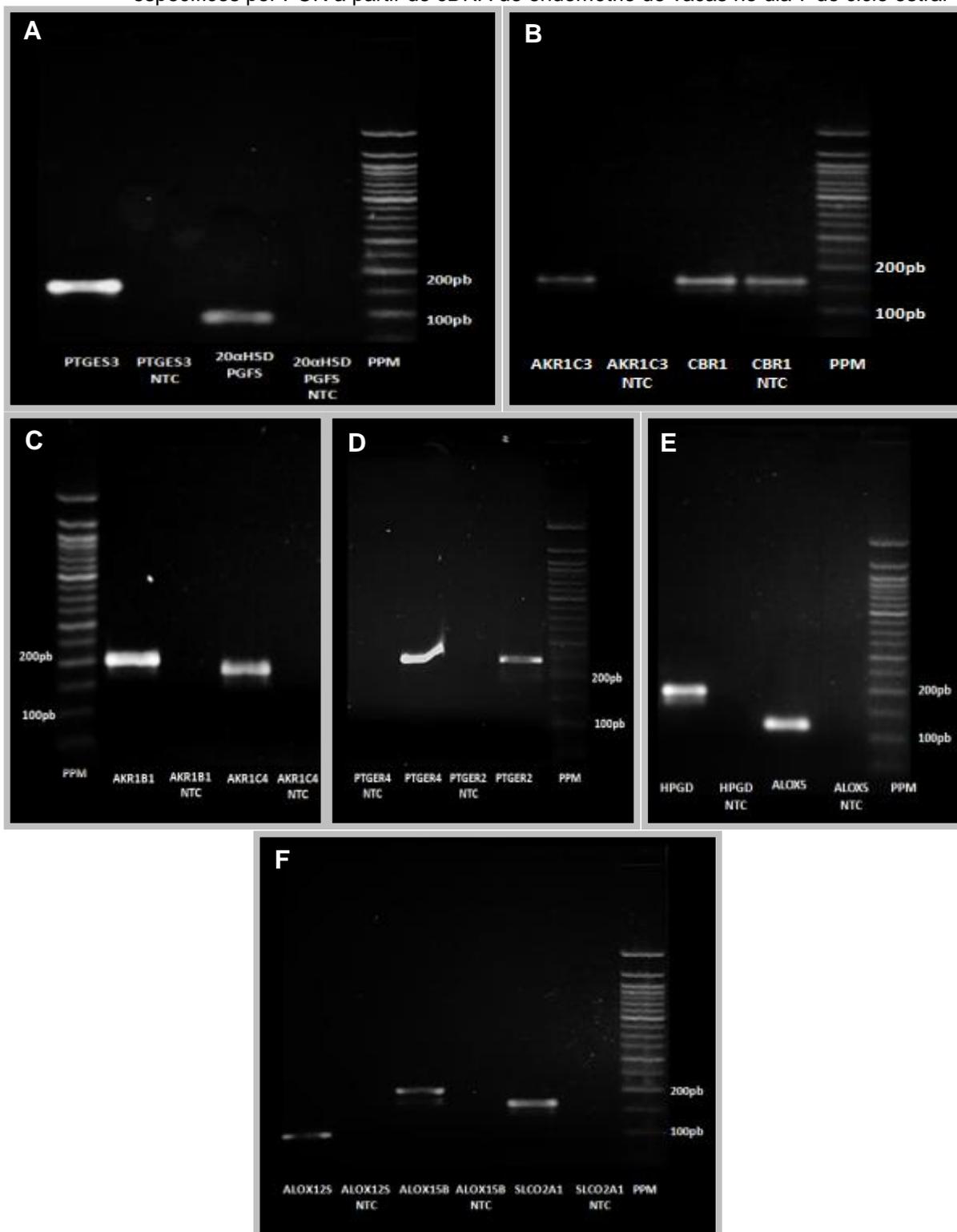
Figura 2 - Imagens digitalizadas de géis de agarose contendo produtos de amplificação de genes específicos por PCR a partir de cDNA de endométrio de vacas no dia 7 do ciclo estral



Fonte: (OLIVEIRA, M. L., 2013)

Legenda: Presença de banda no gel indica o peso molecular dos produtos de PCR correspondentes aos genes PTGS1 (A), PTGS2 (B), PTGDS (B), PTGDR (C), PTGIS (D), PTGES (E) e PTGES2 (F); NTC: controle negativo, reação de PCR na ausência de cDNA; PPM: padrão de peso molecular

Figura 3 - Imagens digitalizadas de géis de agarose contendo produtos de amplificação de genes específicos por PCR a partir de cDNA de endométrio de vacas no dia 7 do ciclo estral



Fonte: (OLIVEIRA, M. L., 2013)

Legenda: Presença de banda no gel indica o peso molecular dos produtos de PCR correspondentes aos genes PTGES3 (A), 20αHSDPGF(A), AKR1C3 (B), CBR1(B), AKR1B1(C) e AKR1C4(C), PTGER4(D), PTGER2(D), HPGD (E), ALOX5(E), ALOX12S(F), ALOX15B(F), SLCO2A1(F); NTC: controle negativo, reação de PCR na ausência de cDNA; PPM: padrão de peso molecular

Interpretou-se que maiores quantidades de RNAm de PLA2G10 do F/CLP poderiam estar associadas a uma maior disponibilização de AA, e conseqüentemente, maior produção de eicosanóides pelo endométrio dos animais desse grupo. Assim sendo, no intuito de entender a dinâmica do fluxo de AA para a produção de eicosanóides, foram realizadas análises da expressão gênica de proteínas que participam na síntese, transporte, sinalização e catabolismo dos eicosanóides e análises de lipidômica quantitativa para os metabólitos do AA.

Tabela 2 - Abundância relativa de transcritos de genes representados pela média, erro padrão da média (EPM), razão entre os tratamentos (FCLG/FCLP) e valores de *P*, relacionados à via de síntese e sinalização de eicosanóides

Nomenclatura Gene	Gene	Média± EPM F/CLG	Média± EPM F/CLP	Razão FCLG/ FCLP	<i>P</i> < <i>t</i>
Aldo-ceto reductase, family1, member B1	AKR1B1	0,3389±0,0176	0,3110±0,0286	1,09	0,24
Aldo-ceto reductase, family1, member C3	AKR1C3	0,0045±0,0008	0,0025±0,0003	1,84	0,02
Aldo-ceto reductase, family1, member C4	AKR1C4	0,0068±0,0011	0,0041±0,0005	1,65	0,04
Arachidonate 12-lipoxygenase	ALOX12	0,0055±0,0003	0,0039±0,0004	1,41	0,01
Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type	ALOX 12S	0,0071±0,0008	0,0048±0,0007	1,46	0,04
Arachidonate 15-lipoxygenase B	ALOX15B	0,0045±0,0006	0,0049±0,0007	0,92	0,39
Arachidonate 5-lipoxygenase	ALOX5	0,0013±0,0001	0,0011±0,0002	1,15	0,25
Carbonyl reductase 1	CBR1	0,0183±0,0018	0,0147±0,0021	1,25	0,07
Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15-(NAD)	HPGD	0,1727±0,0175	0,1441±0,0139	1,20	0,15
Phospholipase A2, group X, transcript variant1	PLA2G10	0,0690±0,0830	0,1200±0,0140	0,57	0,04
Prostaglandin D2 receptor	PTGDR	0,0007±0,0001	0,0006±0,0001	1,03	0,45
Prostaglandin D2 synthase	PTGDS	0,0653±0,0092	0,0616±0,0063	1,06	0,38
Prostaglandin E receptor 2	PTGER2	0,0012±0,0001	0,0013±0,0001	0,92	0,32
Prostaglandin E receptor 4	PTGER4	0,0067±0,0010	0,0062±0,0009	1,09	0,35
Prostaglandin E synthase 1	PTGES1	0,0037±0,0004	0,0028±0,0002	1,32	0,05
Prostaglandin E synthase 2	PTGES2	0,0104±0,0006	0,0098±0,0005	1,06	0,24
Prostaglandin E synthase 3	PTGES3	0,2247±0,0207	0,1880±0,0268	1,20	0,17
Prostaglandin endoperoxide synthase1	PTGS1	0,0018±0,0003	0,0014±0,0001	1,32	0,14
Prostaglandin endoperoxide synthase2	PTGS2	0,0016±0,0002	0,0016±0,0003	1,00	0,50
Prostaglandin I2 synthase	PTGIS	0,0360±0,0026	0,0296±0,0022	1,22	0,04
Solute carrier organic anion transporter family2, member 2A1	SLCO2A1	0,0032±0,0007	0,0026±0,0005	1,22	0,27
Thromboxane A synthase 1	TBXAS1	0,0013±0,0002	0,0012±0,0002	1,08	0,39
Thromboxane A2 receptor	TBXA2R	0,0014±0,0001	0,0004±0,0001	3,39	0,34

6.3 ABUNDÂNCIA DE RNAm E METABÓLITOS DE PROSTAGLANDINAS

Foram validados pares de *primers* referentes a enzimas que promovem a síntese, transporte e metabolização de prostaglandinas (PGs), bem como seus receptores, conforme a tabela 1. Especificamente, comparou-se a expressão gênica das enzimas de sintases de PGD₂ (PTGDS), PGF₂α - aldo-ceto redutase - (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4 e CBR1) e PGE₂ (PTGES1, PTGES2, PTGES3) nos grupos F/CLG e F/CLP. Estas enzimas utilizam a PGH₂ como substrato para síntese direta de prostaglandinas específicas. Entretanto, algumas enzimas tem a capacidade de converter outras prostaglandinas em PGF₂α. Desta forma, a enzima AKR1C3 é capaz de converter a PGD₂ em PGF₂α e a CBR1 (Carbonil Redutase 1) reduz a PGE₂ em 11βPGF₂α (metabólito com semelhante função biológica de PGF₂α (KENGNI et al., 2007; WACLAWIK; ZIECIK, 2007).

Isto exposto, a expressão dos genes que codificam estas enzimas estão diretamente relacionados com a síntese das PGs investigadas em processos reprodutivos (FRANCZAK et al., 2006; BRIDGES; FORTUNE, 2007; NUTTINCK et al., 2008). A PTGDS tem sido estudada principalmente em vacas com alterações patológicas endometriais, por estar envolvida em atividades relacionadas às respostas imunes (MICHIMATA et al., 2002; GABLER et al., 2009). Em camundongos, verificou-se que a expressão da PTGDS permaneceu constante durante todo o ciclo estral, evidenciando que os esteroides sexuais não devem influenciar a expressão da mesma (SHOONER et al., 1999). Corroborando os resultados obtidos no presente estudo, foi observada semelhante abundância de transcritos de PTGDS entre os grupos (P>0,10; Tabela 2).

Dentre as enzimas sintases de PGF₂α, foram estudadas as enzimas da família AKR1C. A enzima AKR1C3 é conhecida por 3α-hydroxysteroid dehydrogenase type II e AKR1C4 por 3α-hydroxysteroid dehydrogenase, type I (MINDNICH; PENNING, 2009), estas enzimas apresentam por volta de 80% de homologia na sequência gênica (MADORE et al., 2003). No presente estudo ambas sintases apresentaram maior expressão no grupo F/CLG (AKR1C3, 65%; AKR1C4, 58%; P<0,10; Tabela 2).

Apesar das diferenças encontradas na expressão dos transcritos da maioria das sintases de PGF₂α, não foi observada diferença significativa entre os grupos F/CLG e F/CLP para os transcritos de AKR1B1 (P>0,10; Tabela 2). Tais resultados

foram similares aos encontrados por Clemente et al. (2009), nos quais, a expressão de AKR1B1 e PTGS2 em células endometriais não diferiu entre vacas suplementados com progesterona e vacas controle (CLEMENTE et al., 2009). A AKR1B1 foi indicada como a mais importante PGF sintase no período da luteólise, apresentando elevada expressão, do dia 7 ao dia 17 do ciclo estral, no endométrio de fêmeas bovinas (MADORE et al., 2003). Adicionalmente, foi observado aumento da expressão de transcritos desta enzima durante o pré-parto e parto em bovinos (SCHULER et al., 2006). Em pesquisas utilizando técnicas de microarranjo, foi encontrada elevada expressão de transcritos da enzima AKR1B1 em biópsias de blastocistos de vacas que falharam em tornarem-se gestantes comparada a uma menor expressão em blastocistos de vacas que completaram a gestação (EL-SAYED et al., 2013). As enzimas da família das AKRs, além da síntese de PGs, possuem a capacidade de metabolizar progesterona (MINDNICH; PENNING, 2009). Assim, sua maior expressão no presente trabalho pode estar associada à necessidade de controlar as concentrações teciduais de progesterona, principalmente nos animais do grupo F/CLG.

Diferente das enzimas da família AKR1C, a CBR1 possui elevada atividade de 9-ceto-redutase, com capacidade de metabolizar PGE2 a PGF2 α (SCHIEBER et al., 1992) e pode ser regulada negativamente por interferon em cultivos de células endometriais bovinas (ASSELIN; FORTIER, 2000). No presente estudo o gene da CBR1 apresentou tendência para maior expressão no grupo F/CLG (25%; $P < 0,10$; Tabela 2). Tal achado está de acordo com os dados encontrados em suínos, nos quais, esta enzima parece ser regulada pela progesterona de maneira que a abundância de CBR1 permaneceu baixa no início do ciclo estral e aumentou por volta do dia 17 em porcas vazias e do dia 24 em prenhes (WACLAWIK; ZIECIK, 2007).

Para verificar a influência dos esteroides na síntese de PGE2, foi realizada a quantificação dos transcritos para as três isoformas da PGE sintase. Entretanto, dentre as sintases de PGE2, os esteroides foram capazes de modular somente a expressão gênica da isoforma PTGES1, apresentando maior expressão no grupo F/CLG (32%; $P > 0,10$; Tabela 2). Tais resultados contrastaram com os obtidos por pesquisas envolvendo cultivo de células miometriais por 14 a 16 dias, onde a suplementação com esteroides não alterou a expressão de PTGES1 (SLONINA et al., 2009). Adicionalmente, em experimento retrospectivo, as enzimas PTGES1 e

PTGES2 não apresentaram expressão gênica diferenciada entre grupos de vacas apresentando endométrio associado à alta ou baixa receptividade, tanto em análises de microarranjo como em qPCR (PONSUKSILI et al., 2012).

As PGs possuem atividade autócrina, parácrina e endócrina necessitando de transportadores para que ocorra a saída das células produtoras e acesso ao meio extracelular e de maneira a possibilitar a comunicação com seus receptores específicos (BANU et al., 2003). Por tanto, para verificação da expressão de genes relacionados à maquinaria de sinalização das PGs, foram analisados o transportador, os receptores e a enzima metabolizadora de PGs.

As prostaglandinas possuem a capacidade de passar através das membranas plasmáticas das células, no entanto este transporte é facilitado por transportadores conhecidos como SLCO2A1 (SCHUSTER, 1998). Este transportador está presente em muitos tecidos e possui elevada afinidade por PGF2 α , PGE2 e PGD2 (LU et al., 1996). Foi observado que durante a gestação em bovinos há aumento da expressão de SLCO2A1 nas carúnculas e tecidos inter-carunculares, entretanto nas membranas fetais sua expressão permanece constante (BANU et al., 2005). O aumento na expressão gênica e proteica de SLCO2A1 ocorre a partir da primeira semana após o estro no endométrio de fêmeas bovinas prenhes e de não prenhes (BANU et al., 2003). Assim, é possível que a expressão de SLCO2A1 possa ser influenciada das alterações endócrinas periovulatórias. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos FCLP e FCLG na quantificação de transcritos do transportador (SLCO2A1; $P > 0,10$; Tabela 2) na presente dissertação.

Após serem transportadas (NARUMIYA; SUGIMOTO; USHIKUBI, 1999) para o exterior das células as PGs podem atuar de maneira autócrina, parácrina ou endócrina em seus receptores (PTGDR para PGD2; PTGFR para PGF2 α ; PTGER1, PTGER2, PTGER3 e PTGER4 para PGE2) (BANU et al., 2003). Os receptores de PGs têm sido estudados quanto à sua especificidade e efeitos biológicos, sendo a regulação destes um ponto crítico para ação das prostaglandinas (NARUMIYA; SHUH; FITZGERALD, 2001). No âmbito reprodutivo, a expressão do receptor PTGDR no endométrio participa da regulação do fluxo sanguíneo, contração do músculo liso e recrutamento de células Th2 e Tc2 durante o período de implantação (BRAUN; SCHROR, 1992; MICHIMATA et al., 2002). Enquanto o receptor PTGFR apresenta elevada expressão em células endometriais próximo ao parto em ovelhas

(MA; WU; NATHANIELSZ, 1999) e menor expressão em membranas fetais durante a gestação de vacas (AROSH et al., 2004). Os receptores PTGER1 e PTGER3 foram pouco ou não foram expressos durante início do ciclo estral de ovelhas, enquanto a expressão dos receptores PTGER2 e PTGER4 no endométrio, aumentou no dia 7 (LEE et al., 2012). Entretanto, no endométrio de bovinos, tanto a proteína como o RNAm de PTGER4 não foram expressos em células endometriais durante ciclo estral, enquanto o receptor PTGER2 foi expresso e teve aumento de sua expressão do dia 7 ao 17 do ciclo estral (AROSH et al., 2004). No presente estudo, apesar de ter sido observada amplificação do mRNA dos genes PTGDR, PTGER2 e PTGER4, nenhum foi diferencialmente expresso entre os tratamentos ($P > 0,10$; Tabela 2) demonstrando que a manipulação das concentrações endógenas de esteroides ao redor da ovulação não regulou a expressão dos receptores de PGs. Adicionalmente, não obteve-se êxito na validação dos *primers* para receptores de PGF2 α (PTGFR) e de PGE2 (PTGER1 e PTGER2). Especificamente, nas reações de amplificação utilizando-se os *primers* para os receptores PTGFR, PTGER1 e PTGER3 encontraram-se valores de CT de 38, 35 e 37, respectivamente, indicando uma baixa expressão no dia 7 do ciclo estral destes animais (dados não apresentados) corroborando com dados encontrados em ovinos na literatura anteriormente citada.

Outra forma de controle das respostas causadas pelas PGs se dá pela presença da enzima metabolizadora de PGs, conhecida como HPGD. A enzima HPGD promove rápida metabolização de PGs no pulmão de bovinos por converter PGE2 e PGF2 α aos compostos inativos PGFM e PGEM, respectivamente (TAI et al., 2002). Segundo (PONSUKSILI et al., 2012) os transcritos da enzima HPGD foram mais expressos no dia 7, quando comparados aos do dia 3, no endométrio de vacas prenhes. No mesmo estudo, a abundância de transcritos desse receptor mostrou-se elevada no grupo de menor fertilidade comparando ao grupo de maior fertilidade. Apesar disso, na presente dissertação não foi encontrada diferença significativa na abundância dos transcritos de HPGD entre os grupos F/CLG e F/CLP (Tabela 2; $P > 0,10$).

A manipulação das concentrações de esteroides sexuais nos grupos F/CLG e F/CLP foi capaz de modular a expressão gênica de enzimas sintases de prostaglandinas (Tabela 2; $P < 0,10$), exceto os RNAm para os genes de PGDS (Tabela 2; $P > 0,10$), destacando-se as enzimas de síntese de PGF2 α cuja maioria

apresentou diferenças significativas entre os grupos. Apesar das maiores quantidades de sintases no grupo F/CLG, na análise de lipidômica as concentrações de PGE₂, iso-PGE, PGE₃ e PGF₂α foram similares entre os grupos F/CLG e F/CLP, tanto nos lavados quanto nos tecidos uterinos (Tabelas 4 e 5; P>0,10). O mesmo foi observado para uma gama de outros metabólitos resultantes do metabolismo de PGD₂ (11BPGF₂α; PGD₂; PGJ₂/Delta 12-PGJ₂; 15-deoxy- delta-12,14-PGJ₂).

Baseado nas pesquisas acima citadas e nos resultados apresentados na presente dissertação, especula-se que os esteroides exerçam controle na produção de transcritos de enzimas sintases de PGE₂ e PGF₂α. Entretanto, algumas sintases de prostaglandinas apresentam capacidade de metabolizar progesterona, indicando que as mesmas possam coordenar sua própria síntese através do controle das concentrações de progesterona.

Em pesquisa utilizando cultivos de células miometriais bovinas foi exposto que a maior disponibilidade de AA aumentou as concentrações de PGF₂α e PGE₂ no meio de cultivo (SLONINA et al., 2009). Os presentes resultados mostraram que o grupo F/CLP apresentou maior quantidade de transcritos para PLA₂G₁₀, indicando uma possível maior liberação de AA da membrana fosfolipídica e apresentou menores quantidades de transcritos para sintases de PGF₂α e PGE₂. Possivelmente, mesmo em menores quantidades disponíveis de AA, o endométrio dos animais do grupo F/CLG metabolizaram o AA de forma mais eficaz, estimulando a transcrição de genes de sintases de PGs. Uma vez que a quantidade de PGs foi similar para ambos os grupos, aparentemente houve o acionamento de diversos mecanismos reguladores, desde a disponibilização de AA até a regulação da expressão de sintases específicas, que levaram a tal resultado.

Outra maneira pela qual PGs poderiam exercer efeitos diferenciais no endométrio dos animais dos grupos experimentais seria por diferentes eficácias nos mecanismos de sinalização, transporte e metabolização das PGs. Contudo, as diferentes concentrações de esteroides no período periovulatório entre os grupos experimentais, também não refletiram na modulação da expressão gênica dos receptores, transportadores e catabolisadores de PGs.

Com o intuito de verificar se outros eicosanoides estariam sendo regulado pelas concentrações de esteroides realizamos a análise de outras enzimas-chave na síntese de prostanóides.

6.4 ABUNDÂNCIA DE RNAm E METABÓLITOS DE PROSTACICLINAS, TROMBOXANOS E LEUCOTRIENOS

Da mesma forma que as prostaglandinas, as sintases de PGI₂ (PGIS) e de tromboxanos (TBXAS) convertem a PGH₂ à prostaciclina e tromboxanos (FUNK, 2001). Elucidaram-se os efeitos do estradiol na produção de PGI₂ e TBXA₂ em culturas de células endoteliais humanas, mostrando que o estradiol aumentou a produção de PGI₂ enquanto não houve diferença na síntese de TBXA₂ (SOBRINO et al., 2010). Corroborando com estes resultados, foi demonstrada maior expressão gênica da enzima de síntese de prostaciclina no grupo F/CLG (22%; PTGIS; $P < 0,10$; Tabela 2). Entretanto, os transcritos para enzima de síntese de tromboxanos (TBXAS1) apresentaram semelhante expressão entre os grupos ($P > 0,10$; Tabela 2).

Diferentemente dos prostanóides, a síntese de leucotrienos não se dá pela atividade de PTGS, e sim por lipoxigenases (PETERS-GOLDEN; BROCK, 2001). A enzima ALOX5 é a primeira enzima da casacata de síntese dos leucotrienos, sendo crucial na produção do principal substrato (5-HPETE) utilizado por outras enzimas na síntese das séries A, B, C, D e E dos leucotrienos (PETERS-GOLDEN; BROCK, 2001). Estes eicosanóides são produzidos durante a resposta inflamatória por macrófagos e granulócitos, possibilitando sua ligação a receptores específicos (MURPHY; GIJÓN, 2007). No presente experimento, a expressão do gene codificante da enzima ALOX5 não diferiu entre os grupos ($P > 0,10$; Tabela 2). A expressão dos genes referente às demais enzimas envolvidas na síntese de leucotrienos não foi avaliada neste experimento.

Quantificaram-se as concentrações de prostanóides, utilizando-se análises de lipidômica, para averiguar sua associação com as quantidades de transcritos para PTGIS. Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de prostanóides PGI₂ entre os grupos F/CLG e F/CLP no lavado e tecido uterino (Tabelas 3 e 4).

Ainda, foi encontrada uma variedade de metabólitos da via de síntese de leucotrienos, tanto nos lavados uterinos (ALOX5; LTB₃; LTB₄; 6-trans-LTB₄; 20-COO-LTB₄; LXB₄; 5HETE e 20-HETE; Tabela 3), quanto no tecido endometrial (ALOX5; LTB₄; 6-trans-LTB₄ e 5HETE; Tabela 4). Por outro lado, na via

correspondente aos tromboxanos, somente um metabólito (TBX2) foi identificado no lavado e no tecido endometrial (Tabelas 4 e 3). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos na quantificação dos metabólitos de prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos identificados nos grupos F/CLP e F/CLG nem nos lavados uterinos (Tabela 3) nem no endométrio (Tabela 4).

Tabela 3 - Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de eicosanoides no lavado uterino representados (média, \pm erro padrão da média), razão das concentrações entre os tratamentos (FCLG/FCLP) e valores de P

Símbolo do metabólito	Média \pm EPM FCLG	Média \pm EPM FCLP	Razão FCLG/FCLP	$P < t$
12-HETE	435,53 \pm 162,12	564,10 \pm 278,17	0,77	0,68
15-deoxy-delta-12,14-PGJ2	7,63 \pm 0,73	8,41 \pm 0,81	0,91	0,53
15-HETE	107,15 \pm 10,19	88,05 \pm 23,04	1,22	0,42
20-COO-LTB4	17,71 \pm 11,92	13,17 \pm 2,11	1,34	0,77
5-HETE	46,67 \pm 6,45	37,86 \pm 16,25	1,23	0,55
6-Ceto PGF1α	508,77 \pm 118,67	507,37 \pm 164,49	1,00	0,99
6-trans-LTB4	8,41 \pm 5,05	5,05 \pm 1,68	1,68	0,45
8-HETE	21,14 \pm 3,91	10,55 \pm 4,51	2,00	0,17
8-Iso PGE2	7,05 \pm 3,05	3,82 \pm 0,29	1,85	0,35
9-HETE	16,42 \pm 3,30	22,43 \pm 6,41	0,73	0,40
LTB4	8,36 \pm 1,12	7,49 \pm 1,41	1,12	0,64
LXB4	39,27 \pm 10,19	62,12 \pm 28,93	0,63	0,19
PGD2	53,12 \pm 14,96	40,68 \pm 21,43	1,31	0,66
PGE2	115,19 \pm 28,00	75,43 \pm 36,58	1,53	0,40
PGF2α	675,31 \pm 154,77	664,39 \pm 249,42	1,02	0,97
PGJ2/Delta 12-PGJ2	1,94 \pm 0,24	1,88 \pm 0,21	1,03	0,91
TXB2	10,81 \pm 4,60	20,03 \pm 9,79	0,54	0,37

A quantificação de transcritos para o receptor de TBXA2 (TBXA2R) não diferiu entre os grupos F/CLG e F/CLP ($P > 0,10$; Tabela 2). Não foi possível a validação dos *primers* para receptor de PGIR por não atenderem às premissas utilizadas nas validações anteriormente descritas (dados não apresentados).

Em pesquisas realizadas em estágios mais avançados do ciclo estral, foram observadas maiores concentrações de PGI2, PGF2 α e PGE2, e menores concentrações para PGD2 e TXB2 em vacas não prenhes do que em vacas

prenhes. Em vacas prenhes as concentrações de PGs foram superiores às concentrações obtidas nas vacas não prenhes, mostrando a importância do aumento da síntese de PGs no endométrio de vacas prenhes (ULBRICH et al., 2009). Aqui, observou-se maior expressão de transcritos das enzimas de síntese de prostaglandinas (secção anterior) e de prostaciclina no grupo F/CLG, porém esta modulação não foi observada nas enzimas sintéticas de tromboxano e leucotrieno. Contudo, as concentrações dos metabólitos de prostaglandinas e prostaciclina não foram significativamente diferentes entre os grupos. Desta forma, buscando identificar outras rotas de síntese de eicosanóides, realizamos a quantificação de transcritos da via de síntese de ácidos hidroxi-eicosanóicos.

6.5 ÁCIDO HIDROXI-EICOSATETRAENOÍCO

As lipoxigenases ALOX12, ALOX12S e ALOX15 metabolizam o AA para a síntese dos ácidos hidroxi-eicosatetraenoícos (COFFA; SCHNEIDER; BRASH, 2005); (BRASH, 1999). Estes ácidos são produzidos por oxigenação direta do AA, seguida pela redução realizada por oxidases ou de forma espontânea (i.e., não enzimática) (COFFA; SCHNEIDER; BRASH, 2005).

As enzimas ALOX12 e ALOX15 e seus metabólitos têm sido alvo de pesquisas envolvendo principalmente homeostase, trombose, alterações patológicas da pele e uma ampla variedade de neoplasias (YU, et al., 2003; KISLEY et al., 2002; YEUNG; NIGAM et al., 2008; HOLINSTAT, 2011). Além disso, as enzimas ALOX12 parecem ter atividade pró-carcinogênica enquanto a enzima ALOX15 foi caracterizada como anticarcinogênica (SHUREIQI; LIPPMAN, 2001). Há poucas pesquisas realizadas com esta classe de eicosanóides no escopo reprodutivo em bovinos. Entretanto, são indicadas como enzimas-chave no controle da menopausa, neoplasias cervicais e implantação (SHUREIQI; LIPPMAN, 2001; LI et al., 2004; SHERWIN; CATALANO; SHARKEY, 2006). Por exemplo, observou-se que o gene da enzima ALOX15 teve a expressão reduzida em biópsias de embriões bovinos que falharam manter a gestação (EL-SAYED et al., 2013).

Tabela 4 - Quantificação das concentrações ($\mu\text{g/g}$) de eicosanoides presentes no tecido endometrial representados pela média, erro padrão da média (EPM), razão das concentrações entre os tratamentos (FCLG/FCLP) e valores de P

Símbolo do metabólito	Média±EPM FCLG	Média±EPM FCLP	Razão FCLG/FCLP	$P < t$
11β-PGF2α	1,14±0,44	0,94±0,25	1,21	0,69
11-HETE	0,13±0,04	0,09±0,01	1,36	0,50
12-HETE	0,18±0,04	0,14±0,04	1,30	0,51
15-deoxy-delta-12,14-PGJ2	0,37±0,06	0,31±0,03	1,20	0,44
15-HETE	0,17±0,04	0,22±0,11	0,78	0,68
20-HETE	18,56±3,75	18,04±3,99	1,03	0,93
5-HETE	0,19±0,03	0,30±0,09	0,64	0,27
6-Ceto-PGF1α	52,95±1,13	75,46±23,23	0,70	0,42
6-trans-LTB4	1,01±0,25	1,19±0,39	0,85	0,69
8-HETE	0,20±0,08	0,50±0,27	0,39	0,26
8-isoPGE2	1,37±0,34	1,15±0,58	1,19	0,74
9-HETE	0,15±0,05	0,97±0,28	0,15	0,02
Delta-12-PGJ2/ PGJ2	0,08±0,01	0,12±0,02	0,72	0,30
LTB4	0,22±0,04	0,20±0,03	1,14	0,61
PGD2	90,62±16,14	86,86±18,28	1,04	0,88
PGE2	9,72±2,51	9,50±1,41	1,02	0,94
PGF2α	14,69±1,58	17,62±2,42	0,83	0,37
TXB2	0,56±0,12	0,48±0,08	1,16	0,64

Análises de microrranjo indicam que tanto a enzima ALOX15 como o metabólito 12-HETE sejam essenciais para implantação em mulheres (SHERWIN; CATALANO; SHARKEY, 2006). Assim, também tem se especulado a essencial interação entre o metabólito 12-HETE e o receptor nuclear de prostaglandinas PPAR durante a implantação em camundongos (LI et al., 2004). Desta forma, foi quantificada a expressão dos transcritos para ALOX12, ALOX12S e ALOX15B com o intuito de verificar se diferentes padrões de liberação de esteroides associados aos grupos F/CLG e F/CLP são capazes de regular a expressão gênica destas enzimas. Os genes ALOX12 e ALOX12S foram mais expressos no F/CLG que no grupo F/CLP (41 e 46%, respectivamente; $P > 0,10$; Tabela 2). Apesar da ALOX15 exercer atividades em conjunto com a ALOX 12, como por exemplo, na resposta inflamatória e na implantação (LI et al., 2004; WUEST et al., 2012), não foram observadas diferenças nas quantidades de transcritos do gene ALOX15B entre os grupo F/CLG e F/CLP.

Os metabólitos das ALOX: 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE e 15-HETE foram encontrados em concentrações semelhantes entre os grupos experimentais, tanto nos lavados como nos tecidos endometriais ($P > 0,10$; Tabelas 4 e 5). No entanto, o metabólito 9-HETE, foi diferencialmente expresso no tecido endometrial, apresentando maiores concentrações no grupo F/CLP ($P < 0,10$; Tabela 4). Entretanto, não há pesquisas realizadas com este metabólito envolvendo sua função em processos reprodutivos. Tal metabólito tem sido estudado principalmente em patologias envolvendo o estresse oxidativo, podendo ser utilizada para identificação de peroxidação oxidativa em doenças cardíacas (SHISHEHBOR et al., 2006). Este metabólito é produzido por peroxidação não enzimática, assim, por não possuir enzimas específicas que promova sua síntese não foi possível realizar análises de expressão gênica neste ponto da via de síntese.

Os ácidos hidroxieicosatetraenóicos são compostos pouco estudados nos processos reprodutivos de bovinos, durante o diestro inicial. Desta forma, estes compostos representam notável importância na descoberta de suas funções reprodutivas em bovinos.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

A enzima PLA2 representa um ponto crítico na síntese de eicosanoides, favorecendo a disponibilização de substrato (AA) para a síntese desses compostos. No presente estudo, apenas o gene desta enzima (PLA2G10) foi mais expressa no grupo F/CLP, entretanto, não foi observado aumento da expressão gênica na via de síntese e sinalização de eicosanoides ou das concentrações dos eicosanoides neste grupo. Em contraste, houve maior expressão gênica da maioria das PGs sintases (AKR1C3, AKR1C4, CBR1, PTGES e PTGIS) e de uma sintase de ácido hidroieicosatetraenóico (ALOX12) no grupo F/CLG. Entretanto, não foram observadas diferenças na expressão de RNAm das PTGS (PTGS1 e PTGS2), outras sintases (AKR1B1, PTGES2, PTGES3 e TBXAS1), proteína transportadora de PG (SLCO2A1), receptores (PTGER2, PTGER4, PTGDR e TBXAR2) e enzima metabolizadora (HPGD). Os eicosanoides quantificados em cada ramificação da via de metabolização do AA não foram diferencialmente expressos, exceto o metabólito 9-HETE, com maiores concentrações no grupo F/CLP. Desta forma, a manipulação da síntese endógena de esteroides ovarianos foi capaz de modular a expressão gênica de enzimas envolvidas na síntese de eicosanoides e de modular a presença de apenas um metabólito. Contudo, a expressão gênica é o ponto inicial da cascata de síntese de eicosanoides. Esta cascata é composta por uma ampla variedade de eventos biológicos que estão associados a uma complexa rede de interações enzimáticas e não enzimáticas que interferem na síntese de eicosanoides. Estes mecanismos de controle poderiam explicar o fato de não haver diferenças entre os grupos experimentais na síntese de eicosanoides. Contudo, novas pesquisas envolvendo outras técnicas serão necessárias para explicar o controle dos esteroides na síntese de eicosanoides.

8 CONCLUSÃO

A manipulação do crescimento folicular e do corpo lúteo foi capaz de promover diferentes concentrações de estradiol no proestro e de progesterona no dia sete do ciclo estral de fêmeas bovinas.

Menores concentrações de estradiol e progesterona levaram ao aumento da expressão gênica da enzima PLA2G10. Por outro lado, elevadas concentrações destes esteroides aumentaram a expressão gênica das enzimas AKR1C3, AKR1C4, CBR1, PTGES, PTGIS e ALOX12, relacionadas à síntese de eicosanoides no endométrio.

Contudo, diferentes ambientes endócrinos periovulatórios não influenciaram as concentrações de eicosanoides no lavado e tecido endometrial, exceto as do metabólito 9-HETE, que apresentou maiores concentrações no tecido endometrial sob menores concentrações de estradiol e progesterona.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que as concentrações de estradiol e progesterona foram capazes de modular a expressão de genes relativos a síntese de eicosanoides, porém não influenciaram as concentrações dos eicosanoides no endométrio de fêmeas bovinas no sétimo dia do ciclo.

REFERÊNCIAS

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. A. Temporal and tissue-specific expression of prostaglandin receptors EP2, EP3, EP4, FP, and cyclooxygenases 1 and 2 in uterus and fetal membranes during bovine pregnancy. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 407-417, 2004.

ASSELIN, E.; FORTIER, M. A. Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E(2) reductase: effect of oxytocin and interferon-tau. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 125-131, 2000

BANU, S. K.; AROSH, J. A.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. A. Expression of prostaglandin transporter in the bovine uterus and fetal membranes during pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 2, p. 230-236, 2005.

BANU, S. K.; AROSH, J. A.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. A. Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11747-11752, 2003.

BLITEK, A.; KIEWISZ, J.; WACLAWIK, A.; KACZMAREK, M. M.; ZIECIK, A. J. Effect of steroids on HOXA10 mRNA and protein expression and prostaglandin production in the porcine endometrium. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, p. 6, p. 643–648, 2010.

BOSETTI, F.; WEERASINGHE, G. R. The expression of brain cyclooxygenase-2 is down-regulated in the cytosolic phospholipase A2 knockout mouse. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, n. 6, p. 1471–1477, 2003

BRASH, A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. **Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 34, 23679-23682, 1999.

BRAUN, M.; SCHROR, K. Prostaglandin D2 relaxes bovine coronary arteries by endothelium-dependent nitric oxide-mediated cGMP formation. **Circulation Research**, v. 71, n. 6, p. 1305–1313, 1992.

BRIDGES, P. J.; FORTUNE, J. E. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 263, n. 1-2, p. 1–9, 2007

BUCZYNSKI, M. W.; DUMLAO, D. S.; DENNIS, E. A. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 6, p. 1015–1038, 2009.

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

CHALLIS, J. R. G.; SLOBODA, D. M.; ALFAIDY, N.; LYE, S. J.; GIBB, W.; PATEL, F. A.; WHITTLE, W. L.; NEWNHAM, J. P. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. **Reproduction**, v. 124, n. 1, p. 1–17, 2002.

CHEON, Y. P.; LI, Q.; XU, X.; DEMAYO, F. J.; BAGCHI, I. C.; BAGCHI, M. K. (2002). A genomic approach to identify novel progesterone receptor regulated pathways in the uterus during implantation. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 12, p. 2853–2871, 2002

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

COFFA, G.; SCHNEIDER, C.; BRASH, A. R. A comprehensive model of positional and stereo control in lipoxygenases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 87-92, 2005.

COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 205-229, 1994.

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.

EI-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; SIRARD, M.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, n.1, p. 84-96, 2006.

FAO. **World Livestock 2011 – Livestock in food security**. Rome: FAO, 2011.

FEDOROFF, N. V.; BATTISTI, D. S.; BEACHY, R. N.; COOPER, P. J. M.; FISCHHOFF, D. A.; HODGES, C. N.; KNAUF, V. C.; LOBELL, D.; MAZUR, B. J.; MOLDEN, D.; REYNOLDS, M. P.; RONALD, P. C.; ROSEGRANT, M. W.; SANCHEZ, P. A.; VONSHAK, A.; ZHU, J. K. Radically rethinking agriculture for the 21st century. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 833–834, 2010.

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

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

FRANCZAK, A.; KOTWICA, G.; KUROWICKA, B.; OPONOWICZ, A.; WOŁAWEK-POTOCKA, I.; PETROFF, B. K. Expression of enzymes of cyclooxygenase pathway and secretion of prostaglandin E2 and F2 alpha by porcine myometrium during luteolysis and early pregnancy. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1049–1056, 2006.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, v. 294, n. 5548, p. 1871–1875, 2001.

GABLER, C.; DRILLICH, M.; FISCHER, C.; HOLDER, C.; HEUWIESER, W.; EINSPIANIER, R. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 993-1004, 2009.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 826-833, 1998.

GOFF, A. K. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 11–16, 2004.

GROSS, G. A.; IMAMURA, T.; LUEDKE, C.; VOGT, S. K.; OLSON, L. M.; NELSON, D. M.; SADOVSKY, Y.; MUGLIA, L. J. Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 20, p. 11875-11879, 1998.

HELLIWELL, R. J.; ADAMS, L. F.; MITCHELL, M. D. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n. 2, p. 101-113, 2004.

HERATH, S.; LILLY, S. T.; SANTOS, N. R.; GILBERT, R. O.; GOETZE, L.; BRYANT, C. E.; WHITE, J. O.; CRONIN, J.; SHELDON, I. M. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 55, 2009.

HIRABAYASHI, T.; MURAYAMA, T.; SHIMIZU, T. Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A2. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p.1168-1173, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro. IBGE, 2011.

KENGNI, J. H. C.; ST-LOUIS, I.; PARENT, S.; LEBLANC, V.; SHOONER, C.; ASSELIN, E. Regulation of prostaglandin D synthase and prostacyclin synthase in the endometrium of cyclic, pregnant, and pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. **Journal of Endocrinology**, v. 195, n. 2, p. 301–311, 2007.

KENNEDY, C. R.; ZHANG, Y.; BRANDON, S.; GUAN, Y.; COFFEE, K.; FUNK, C. D.; MAGNUSON, M. A.; OATES, J. A.; BREYER, M. D.; BREYER, R. M. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. **Nature Medicine**, v. 5, n. 2, p. 217–220, 1999.

KENNEDY, T. G.; GILLIO-MEINA, C.; PHANG, S. H. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 635-643, 2007.

KISLEY, L. R.; BARRETT, B. S.; DWYER-NIELD, L. D.; BAUER, A. K.; THOMPSON, D. C.; MALKINSON, A. M. Celecoxib reduces pulmonary inflammation but not lung tumorigenesis in mice. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 10, p. 1653-1660, 2002.

KORZEKWA, A. J.; BAH, M. M.; KURZYNOWSKI, A.; LUKASIK, K.; GROBLEWSKA, A.; SKARZYNSKI, D. J. Leukotrienes modulate secretion of progesterone and prostaglandins during the estrous cycle and early pregnancy in cattle: an in vivo study. **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 767–776, 2010.

KORZEKWA, A.; LUKASIK, K.; SKARZYNSKI, D. J. Leukotrienes are auto-/paracrine factors in the bovine corpus luteum: an in vitro study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 1089–1097, 2010.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H. W.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 2, p. 85-94, 2005.

KOWALIK, M. K.; SLONINA, D.; KOTWICA, J. Genomic and non-genomic effects of progesterone and pregnenolone on the function of bovine endometrial cells. *Veterinari Medicina*, v. 54, n. 2, p. 205-214, 2009.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 68–69, p. 3-58, 2002.

LACROIX-PÉPIN, N.; DANYOD, G.; KRISHNASWAMY, N.; MONDAL, S.; RONG, P. M.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. A. The multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) appears as a functional carrier of prostaglandins regulated by oxytocin in the bovine endometrium. **Endocrinology**, v. 152, n. 12, p. 4993–5004, 2011.

LaFRANCE, M.; GOFF, A. K. Effects of progesterone and oestradiol-17 beta on oxytocin-induced release of prostaglandin F-2 alpha in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, n. 2, p. 429-436, 1988.

LAPPAS, M.; RICE, G. Phospholipase A2 isozymes in pregnancy and parturition. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n. 2, p. 87–100, 2004.

LEE, J.; BANU, S. K.; NITHY, T. K.; STANLEY, J. A.; AROSH, J. A. Early pregnancy induced expression of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 in the ovine endometrium and regulated by interferon tau through multiple cell signaling pathways. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 211–223, 2012.

LEE, J.; BANU, S. K.; SUBBARAO, T.; STARZINSKI-POWITZ, A.; AROSH, J. A. Selective inhibition of prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4 inhibits invasion of human immortalized endometriotic epithelial and stromal cells through suppression of metalloproteinases. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 332, n. 1-2, p. 306-313, 2011.

LI, Q.; CHEON, Y. P.; KANNAN, A.; SHANKER, S.; BAGCHI, I. C.; BAGCHI, M. K. A novel pathway involving progesterone receptor, 12/15-lipoxygenase-derived eicosanoids, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates implantation in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 12, p. 11570–11581, 2004.

LIM, H.; PARIA, B. C.; DAS, S. K.; DINCHUK, J. E.; LANGENBACH, R.; TRZASKOS, J. M.; DEY, S. K. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 197–208, 1997.

LIU, P.; LU, Y.; RECKER, R. R.; DENG, H. W.; DVORNYK, V. ALOX12 gene is associated with the onset of natural menopause in white women. **Menopause**. v. 17, n. 1; p. 152-156, 2010.

LU, R.; KANAI, N.; BAO, Y.; SCHUSTER, V. L. Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA(hPGT). *Journal of Clinical Investigation*, v. 98, n. 5, p. 1142-1149, 1996.

MA, X.; WU, W. X.; NATHANIELSZ, P. W. Differential regulation of prostaglandin EP and FP receptors in pregnant sheep myometrium and endometrium during spontaneous term labor. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 5, p. 1281–1286, 1999.

MACHADO, R.; SUDANO, M. J.; BARBOSA, R. T.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BINELLI, M. Metodologia para obtenção de conceito bovino. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 19, p. 5 -21, 2009.

MADORE, E.; HARVEY, N.; PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; AROSH, J. A.; FORTIER, M. A. An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium, **Journal Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, 11205–11212, 2003.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V.; ALMEIDA, A. B.; ROSSA, L. A. F. Sincronização com progestágenos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2003. p.117–128.

MATSUURA, K.; SHIRAISHI, H.; HARA, A.; SATO, K.; DEYASHIKI, Y.; NINOMIYA, M.; SAKAI, S. Identification of a Principal mRNA Species for Human 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoform (AKR1C3) That Exhibits High Prostaglandin D2 11-Ketoreductase Activity. **J. Biochemistry.**, v. 946, p. 940–946, 1998.

McNEILL, R. E. A.; SREENAN, J. M. A.; DISKIN, M. G. A.; CAIRNS, M. T. B.; FITZPATRICK, R. A.; SMITH, T. J. C.; MORRIS, D. G. A. Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 5, 573-583, 2006.

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

MICHIMATA, T.; TSUDA, H.; SAKAI, M.; FUJIMURA, M.; NAGATA, K.; NAKAMURA, M.; SAITO, S. Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D(2)-mediated manner. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 2, p. 181–187, 2002.

MIGUEZ, P. H. P.; CUNHA, P. M.; MARQUES, V. B.; BERTAN, C. M.; BINELLI, M. Combination of estradiol-17 β and progesterone is required for synthesis of PGF2 α in bovine endometrial explants. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 172-177, 2005.

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

MINDNICH, R. D.; PENNING, T. M. Aldo-keto reductase (AKR) superfamily: genomics and annotation. **Human Genomics**, v. 3, n. 4, p. 362–370, 2009

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. **Focus on Mammalian Embryogenomics**, v. 135, n. 2, p. 225-240, 1998.

MORAWSKA, E.; KACZMAREK, M. M.; BLITEK, A. Regulation of prostacyclin synthase expression and prostacyclin content in the pig endometrium. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 2071–2086, 2012.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A2. **Journal of Biochemistry**, v. 131, n. 3, p. 285–292, 2002.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 3-35, 2004.

MURPHY, R. C.; GIJÓN, M. A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. **Biochemical Journal**, v. 405, n. 3, p. 379-395, 2007.

NARUMIYA, S.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and their precursors Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 1, p. 25–30, 2001.

NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1193–1226, 1999.

NEWMAN, J. W.; WATANABE, T.; HAMMOCK, B. D. The simultaneous quantification of cytochrome P450 dependent linoleate and arachidonate metabolites in urine by HPLC-MS/MS. **Journal of Lipid Research** v. 43, p.1543-1578, 2002.

NIGAM, S.; ZAFIRIOU, M.; DEVA, R.; KERSTIN, N.; GEILEN, C.; CICCOLI, R.; SCZEPANSKI, M.; LOHSE M. Hepoxilin A 3 (HXA 3) synthase deficiency is causative of a novel ichthyosis form. **FEBS Letter**, v. 582, p. 279-285, 2008.

NUTTINCK, F.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; CLÉMENT, L.; REINAUD, P.; CHARPIGNY, G.; GRIMARD, B. Expression of genes involved in prostaglandin E2 and progesterone production in bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation and fertilization. **Reproduction**, v. 135, n. 5, p. 593–603, 2008.

PAKRASI, P. L.; CHENG, H. C.; DEY, S. K. Prostaglandins in the uterus: modulation by steroid hormones. **Prostaglandins**, v. 26, n. 6, p. 991–1009, 1983

PAKRASI, P. L.; JAIN, A. K. Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin reduces apoptosis and enhances embryo viability in mouse. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 79, n. 1-2, p. 27–33, 2008.

PARENT, J.; VILLENEUVE, C.; FORTIER, M. A. Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium. **Reproduction**, v. 126, n. 4, p. 539-547, 2003.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. **Clinical immunology**, v. 119, n. 3, p. 229-240, 2006.

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

PETERS-GOLDEN, M.; BROCK, T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. **FEBS Letters**, v. 487, n. 3, p. 323-326, 2001.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. 203-207, 2001.

PONSUKSILI, S.; MURANI, E.; SCHWERIN, M.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D.; WIMMERS, K. Gene expression and DNA-methylation of bovine pretransfer endometrium depending on its receptivity after in vitro-produced embryo transfer. **PloS one**, v. 7, p. 8, 2012.

POYSER, N. L. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 53, n. 3, p. 147–195, 1995.

ROCCA, B.; LOEB, A. L.; STRAUSS, J. F.; VEZZA, R.; HABIB, A.; LI, H.; FITZGERALD, G. A. Directed vascular expression of the thromboxane A2 receptor results in intrauterine growth retardation. **Nature Medicine**, v. 6, n. 2, p. 219-221, 2000.

RUIJTER, J. M.; RAMAKERS, C.; HOOGAARS, W. M.; KARLEN, Y.; BAKKER, O.; VAN DEN HOFF, M. J.; MOORMAN, A. F. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 6, 2009

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 23–30, 2010.

SAITO, S.; TSUDA, H.; MICHIMATA, T. Prostaglandin D2 and reproduction. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 5, p. 295–302, 2002.

SCENNA, F. N.; HOCKETT, M. E.; TOWNS, T. M.; SAXTON, A. M.; ROHRBACH, N. R.; WEHRMAN, M. E.; SCHRICK, F. N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 78, n 1-4, p. 38–45, 2005.

SCHIEBER, A.; FRANK, R. W.; GHISLA, S. Purification and properties of prostaglandin 9-ketoreductase from pig and human kidney. **European Journal of Biochemistry**, v. 206, p. 491–502, 1992.

SCHULER, G.; TEICHMANN, U.; KOWALEWSKI, M. P.; HOFFMANN, B.; MADORE, E.; FORTIER, M. A.; KLISCH, K. Expression of cyclooxygenase-II (COX-II) and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (20alpha-HSD)/prostaglandin F-synthase (PGFS) in bovine placentomes: implications for the initiation of parturition in cattle. **Placenta**, v. 27, n. 9-10, p. 1022–1029, 2006.

SCHUSTER, V. L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 221 - 242, 1998.

SCHUSTER, V. L. Prostaglandin transport. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 68-69, p. 633 – 647, 2002.

SEALS, R. C.; LEMASTER, J. W.; HOPKINS, F. M.; SCHRICK, F. N. Effects of elevated concentrations of prostaglandin F2 alpha on pregnancy rates in progestogen supplemented cattle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 56, n. 5-6, p.377–89, 1998.

SHERWIN, R.; CATALANO, R.; SHARKEY, A. Large-scale gene expression studies of the endometrium: what have we learnt? **Reproduction**, v. 132, n. 1, p. 1–10, 2006.

SHISHEBOR, M. H.; ZHANG, R.; MEDINA, H.; BRENNAN, M. L.; BRENNAN, D. M.; ELLIS, S. G.; TOPOL, E. J.; HAZEN, S. L. Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, n. 11, p.1678–1683, 2006.

SHUREIQI, I.; LIPPMAN, S. M. Lipoxygenase Modulation to Reverse Carcinogenesis. **Cancer Research** v. 61, n. 1, p. 6307–6312, 2001.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition, **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 387–437, 2004.

SIMTH, W. L.; DeWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 145–182, 2000.

SLONINA, D.; KOWALIK, M. K.; SUBOCZ, M.; KOTWICA, J. The effect of ovarian steroids on oxytocin-stimulated secretion and synthesis of prostaglandins in bovine myometrial cells. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 90, n. 3-4, p. 69–75, 2009

SOBRINO, A.; OVIEDO, P. J.; NOVELLA, S.; LAGUNA-FERNANDEZ, A.; BUENO, C.; GARCÍA-PÉREZ, M. A.; TARÍN, J. J. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor-alpha. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 44, n. 4, p. 237–246, 2009.

SONG, B. S.; KIM, J. S.; KIM, C. H.; HAN, Y. M.; LEE, D. S.; LEE, K. K.; KOO, D. B. Prostacyclin stimulates embryonic development via regulation of the cAMP response element-binding protein-cyclo-oxygenase-2 signalling pathway in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v. 21, n.3, p. 400–407, 2009.

SWINNEY, D. C. Differential Allosteric Regulation of Prostaglandin H Synthase 1 and 2 by Arachidonic Acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 19, p. 12393–12398, 1997.

TITHOF, P. K.; ROBERTS, M. P.; GUAN, W.; ELGAYYAR, M.; GODKIN, J. D. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2alpha production by bovine endometrial epithelial cells. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 5, n. 16, p.1-12, 2007

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

VANROOSE, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 131-143, 2001.

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

WACLAWIK, A.; ZIECIK, A. J. Differential expression of prostaglandin (PG) synthesis enzymes in conceptus during peri-implantation period and endometrial expression of carbonyl reductase/PG 9-ketoreductase in the pig. **Journal of Endocrinology**, v. 194, n. 3, p. 499–510, 2007.

WEEMS, C. W.; WEEMS, Y. S.; RANDEL, R. D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 206–228, 2006.

WEHBRINK, D.; HÄSSIG, M.; RITTER, N.; ZERBE, H.; BLEUL, U.; BOOS, A. Immunohistochemical demonstration of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin receptors EP2 and FP expression in the bovine intercaruncular uterine wall around term. **Animal reproduction science**, v. 106, n. 3-4, p. 241-254, 2008.

WUEST, S. J. A.; CRUCET, M.; GEMPERLE, C.; LORETZ, C.; HERSBERGER, M. Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages. **Atherosclerosis**, v. 225, n. 1, p. 121–127, 2012.

YEUNG, J.; HOLINSTAT, M. 12-lipoxygenase: a potential target for novel anti-platelet therapeutics. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, v. 9, n. 3, p. 154-164, 2011.

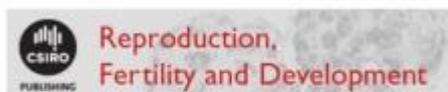
YIN, H.; CHENG, L.; LANGENBACH, R.; JU, C. Prostaglandin I(2) and E(2) mediate the protective effects of cyclooxygenase-2 in a mouse model of immune-mediated liver injury. **Hepatology**, v. 2, p. 159-169, 2007.

YU, Y.; CHENG, Y.; FAN, J.; CHEN, X.; KLEIN-SZANTO, A.; FITZGERALD, G. A.; FUNK, C. D. Differential impact of prostaglandin H synthase 1 knockdown on platelets and parturition. **Journal Clinical Investigation**, v. 115, n. 4, p. 986-995, 2005.

YU, Z.; SCHNEIDER, C.; BOEGLIN, W. E.; MARNETT, L. J.; BRASH, A. R. The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9162-9167, 2003.

APÉNDICES

APÊNDICE A



Manipulation of the periovulatory sex-steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression on early diestrus Nelore cows.

Journal:	<i>Reproduction, Fertility and Development</i>
Manuscript ID:	RD13108
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	02-Apr-2013
Complete List of Authors:	Mesquita, Fernando; University of São Paulo - FMVZ, Pugliesi, Guilherme; University of São Paulo - FMVZ, Scolari, Saara; University of São Paulo - FMVZ, França, Moana; University of São Paulo - FMVZ, Ramos, Roney; University of São Paulo - FMVZ, Oliveira, Milena; University of São Paulo - FMVZ, Papa, Paula; University of São Paulo - FMVZ, Bressan, Fabiana; University of São Paulo - FZEA, Meirelles, Flávio Silva, Luciano; University of São Paulo - FZEA, Nogueira, Guilherme; São Paulo State University, Membrive, Claudia; São Paulo State University, Binelli, Mario; University of São Paulo - FMVZ,
Keyword:	endocrinology, endometrium, follicle, gene expression, oestrogen, progesterone, uterus, corpus luteum

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://www.publish.csiro.au/journals/rfd>

1 Manipulation of the periovulatory sex-steroidal milieu affects endometrial but not luteal
2 gene expression on early diestrus Nelore cows.

3

4 Running title: Periovulatory endocrine milieu controls endometrium in cows

5

6 Mesquita, FS^{A,E}; Pugliesi, G^A; Scolari, SC^A; França, MR^A; Ramos, RS^A; Oliveira, M^A;
7 Papa, PC^A; Bressan, FF^B; Meirelles, FV^B; Silva, LA^B; Nogueira, GP^C; Membrive, CMB^D;
8 Binelli, M^A

9

10 ^A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo,
11 Pirassununga, SP, Brazil.

12 ^B Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo,
13 Pirassununga, SP, Brazil.

14 ^C Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita
15 Filho", Araçatuba, SP, Brazil.

16 ^D Campus Experimental de Dracena, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita
17 Filho", Dracena, SP, Brazil.

18

19 ^E Corresponding author: Dr. Fernando S. Mesquita
20 Duque de Caxias Norte, 225
21 Pirassununga, São Paulo, Brazil
22 13635-900
23 Tel: +55 019 3565-4220
24 fermesq@gmail.com

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38 **Abstract**

39 Aims of the present study were to characterize an animal model to result in
40 distinct estradiol (E2) and progesterone (P4) concentrations during the periovulatory
41 phase of the estrous cycle by manipulating dominant follicle growth during the preceding
42 estrous cycle, and assess the relationship between distinct preovulatory follicle (POF)
43 sizes, preovulatory E2 and postovulatory P4 concentrations and luteal and endometrial
44 gene expression. Eighty-three non-lactating, presynchronized Nelore cows received a
45 P4-releasing device and estradiol benzoate on day -10 (D-10). Animals received
46 cloprostenol (Large Follicle – Large CL group; LF-LCL; N=42) or not (Small Follicle –
47 Small CL group; SF-SCL; N=41) on D-10. Progesterone devices were withdrawn and
48 cloprostenol injected between 42h and 60h for LF-LCL cows, and between 30h and 36h,
49 prior to GnRH injection, for SF-SCL cows. Ovarian structures, E2 and P4 were measured
50 by ultrasound and RIA, respectively. Tissues were collected at slaughter (D7 post-
51 GnRH). The LF-LCL group had larger pre-ovulatory follicles (13.24 ± 0.33 mm vs. 10.76
52 ± 0.29 mm), greater E2 concentrations on D0 (2.94 ± 0.28 pg/mL vs. 1.27 ± 0.20 pg/mL)
53 and greater P4 concentrations on D7 (3.71 ± 0.25 ng/mL vs. 2.62 ± 0.26 ng/mL).
54 Additionally, a greater rate of P4 increase and overall P4 production were observed in
55 LF-LCL versus SF-SCL. Luteal gene expression of VEGFA, KDR, FLT1, STAR,
56 CYP11A1 and HSD3B7 was not different between groups. Endometrial gene expression
57 of OXTR and PI3 was reduced, whereas ESR2, AKR1C4 and LPL expression was
58 increased in LF-LCL versus SF-SCL. Results support the hypothesis that the
59 manipulation of the dominant follicle growth is a useful tool to modulate, within
60 physiological limits, the periovulatory endocrine milieu, which in turn acts on the
61 endometrium to alter gene expression, and potentially modulate uterine environment and
62 receptivity.

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75 **Introduction**

76 Dairy and beef cattle commercial operations have reached significant
77 improvements in sanitary, nutritional and reproductive statuses worldwide. Particularly
78 regarding cattle reproductive performance, protocols for hormonal manipulation of the
79 estrous cycle that maximize service rates have made possible to expose a greater
80 percentage of females to the opportunity of becoming pregnant. However, despite the
81 importance of such an achievement, there is a significant percentage of ovulated and
82 inseminated cows that are detected not-pregnant 30 days after insemination.
83 Acknowledging the critical influence of general health and nutrition of the cow, as well as
84 the quality of the oocyte and health of the early embryo to conception rates, it has been
85 proposed that the oviductal and uterine environments play a relevant role during the
86 establishment and maintenance of early pregnancy (Gandolfi *et al.* 1989a; Gandolfi *et al.*
87 1989b; Murray 1993; Binelli *et al.* 1999). Furthermore, early classic studies demonstrated
88 the significant impact of the coordinated, sequential exposure of the uterus to the ovarian
89 steroids on uterine function (Miller and Moore 1976). The role of the periovulatory
90 endocrine milieu has been studied by Demetrio *et al.* (2007), who demonstrated a
91 positive relationship between progesterone (P4) concentrations on D7 post-estrus and
92 the probability of conception on D28, for inseminated dairy cows. They suggested that
93 P4 influenced the embryo and/or the uterine environment critically during the first week
94 of pregnancy (Demetrio *et al.* 2007).

95 Several molecular studies (Gandolfi *et al.* 1989b; Murray 1993; Binelli *et al.* 1999;
96 Bauersachs *et al.* 2005; Satterfield *et al.* 2009a) have confirmed the effects of P4 and
97 estradiol (E2) on the composition of secretions of the oviduct and endometrium during
98 early pregnancy or early and late diestrus in ruminants. Animal models that focused on
99 the stage of maternal recognition of pregnancy (days 15-18 post-estrus) in cattle have
100 identified molecules that are induced by interferon tau and stimulated by P4 and E2
101 (Satterfield *et al.* 2006). Other studies demonstrated that P4 regulates the expression of
102 numerous genes and that during the first week of pregnancy an early rise or decrease in
103 P4 concentrations can advance or delay the expression of specific molecules,
104 respectively (Carter *et al.* 2008; Beltman *et al.* 2009). Current experimental models that
105 aimed to modulate the uterine environment by increasing P4 concentrations during early
106 diestrus (i.e. D7 post-estrus) advanced embryo growth and development in cattle (Forde
107 *et al.* 2009a). However, the exogenous supplementation used in the aforementioned
108 study lead to a sudden increase in P4 concentrations on D3 post-estrus unlike what is
109 observed during physiologic diestrus. Furthermore, E2 concentrations in the proestrus

110 phase are not considered by such approach. In this regard, it has been demonstrated
111 that proestrus E2 concentrations are positively correlated with the size of pre-ovulatory
112 follicle (POF) and with subsequent corpus luteum size and P4 concentrations during
113 early diestrus, as well as with pregnancy rates in dairy cows (Vasconcelos *et al.* 2001).

114 Alternative approaches aiming to increase early diestrus P4 concentrations
115 include the manipulation of the growth rate of the POF. Recent studies (Meneghetti *et al.*
116 2009; Peres *et al.* 2009) have shown that an increased POF diameter was achieved by
117 reducing P4 concentration during synchronized follicle growth of Nelore cows (*Bos*
118 *indicus*) submitted to timed-AI (Meneghetti *et al.* 2009; Peres *et al.* 2009). Despite the
119 pharmacological manipulation of the follicle development and ovulation, such approach
120 altered post-ovulatory P4 concentrations in a physiological manner. This is because the
121 ovarian steroid secreting profile becomes a consequence of the size and functional
122 capacity of the dominant follicle and the resulting corpus luteum. Most importantly,
123 manipulation of the follicle growth that resulted in larger POFs was associated with
124 higher pregnancy rates in *Bos indicus* cattle (Meneghetti *et al.* 2009; Peres *et al.* 2009).

125 Numerous research groups studying cattle uterine biology and its relevance to
126 fertility have been working under the overarching hypotheses that (1) composition of
127 oviductal and endometrial secretions are regulated by their exposure to the ovarian
128 steroids, and that (2) optimal composition of secretions is associated positively with
129 pregnancy success. It is our understanding that to test these hypotheses the
130 establishment of a suitable animal model is imperative. Therefore, the aims of the
131 present study were (1) to modulate sex-steroidal milieu within physiological limits of rate
132 and magnitude of increase, mimicking the sequential uterine exposure to these
133 hormones; (2) to obtain two groups of animals with sufficiently distinct POF diameters,
134 proestrus E2 concentrations, luteal sizes and diestrus P4 concentrations (i.e., exposure
135 to the periovulatory endocrine milieu); (3) to measure the relationship between the P4
136 secretion profile and luteal tissue gene expression in the proposed animal model; (4) to
137 verify the effects of distinct periovulatory endocrine milieus on endometrial gene
138 expression.

139

140 **Material and Methods**

141 *Animals*

142 Experiment was carried out at the University of São Paulo, Pirassununga, São
143 Paulo, Brazil, where animals were kept under grazing conditions and supplemented with
144 sugar cane and/or corn silage, concentrate and minerals to fulfill their maintenance
145 requirements, and water *ad libitum*. Animal procedures were approved by the Ethics and

146 Animal Handling Committee of the University of São Paulo. Eighty-three, non-lactating,
147 multiparous Nelore (*Bos indicus*) cows presenting no gross reproductive abnormalities
148 by gynecological examination, with a body condition score between 3 and 4 (0,
149 emaciated; 5, obese), were pre-synchronized by two intramuscular injections of
150 prostaglandin F2 alpha analog (PGF; 0.5 mg of sodium cloprostenol; Sincrocio®, Ouro
151 Fino, Cravinhos, Brazil), 14 days apart. Subsequent treatments were administered 10
152 days after second PGF injection (D-10). Rationale was that animals should have a
153 functional, PGF-responsive CL (at least 5 days old) on D-10, because this was critical for
154 the manipulations of POF growth. Combinations of treatments were employed in three
155 experiments with the overall objective of inducing synchronous ovulations in two groups
156 of animals with distinctly different sizes of preovulatory follicles and subsequent CLs as
157 well as proestrus E2 and early diestrus P4 concentrations. Animals that responded to
158 treatments as expected and specified below were slaughtered 7 days after the induction
159 of ovulation and endometrium was used for gene expression analyses.

160

161 *Reproductive management and experimental designs*

162

163 *Experiment 1*

164 Ten days after the second PGF injection of the pre-synchronization protocol (D-10),
165 cows were distributed evenly into two experimental groups, according to body weight
166 and body condition score, and received pharmacological manipulations aiming to result
167 in animals with either small (SF-SCL group; N=13) or large (LF-LCL group; N=10) pre-
168 ovulatory follicle diameters and, consequently, low or high post-ovulatory P4
169 concentrations, respectively. All animals received a second-use intravaginal P4-releasing
170 device (1g; Sincrogest®, Ouro Fino) on D-10 along with an intramuscular injection of
171 estradiol benzoate (2 mg, Sincrodiol®, Ouro Fino) to induce recruitment of a new
172 follicular wave. Simultaneously, cows in the LF-LCL group received a single
173 intramuscular injection of PGF. Devices were removed 60h (LF-LCL group) and 36h (SF-
174 SCL group) before the injection of an ovulatory dose of a GnRH agonist (1 µg of
175 buserelin acetate; Sincroforte®, Ouro Fino) on D0. All animals received a single PGF
176 injection at P4 device removal. Nine animals were eliminated from further analyses, due
177 to the reasons described on Table 1.

178

179 *Experiment 2*

180 Experiment 1 was successful in inducing distinctly different POF diameters
181 between groups LF-LCL and SF-SCL. However, whereas 100% of SF-SCL cows

182 ovulated between 24h and 48h post-GnRH, only 42.9% of LF-LCL cows ovulated within
183 that window. In Experiment 2, aiming to improve the synchronization of ovulation in the
184 LF-LCL group by reducing the growth of the dominant follicle, the length of the proestrus
185 was reduced. Moreover, to assure that animals starting the synchronization protocol on
186 D-10 had a PGF-responsive CL, at the second PGF injection of the pre-synch protocol
187 (D-20) animals received an Estroject® (Rockway, Inc., Spring Valley, WI, USA) device.
188 Estrus detection was performed twice daily from D-19 to D-16 and once daily from D-15
189 to D-10. Cows detected in estrus from D-14 to D-10 were removed from the experiment.
190 All animals received a second-use intravaginal P4-releasing device (1g; Sincrogest®,
191 Ourofino) on day -10 (D-10) along with an intramuscular injection of 2 mg estradiol
192 benzoate. Simultaneously, cows in the LF-LCL received an intramuscular injection of
193 PGF. Devices were removed between 48 and 54h, and at 36h before the GnRH injection
194 in the LF-LCL (N=20) and the SF-SCL (N=17) groups, respectively. All animals received
195 a PGF injection at P4 device removal and a second PGF injection 6h later to assure the
196 induction of luteolysis. Ovulation was induced by an injection of 1 µg GnRH agonist on
197 D0. Fourteen animals were eliminated from further analyses, due to the reasons
198 described on Table 1.

199

200 *Experiment 3*

201 Experiment 2 was successful in modulating dominant follicle growth. However,
202 similar P4 concentrations on D7 between groups and low overall rates of synchronized
203 ovulation (38.1% between 24h and 48h post-GnRH) indicated the need for further
204 adjustments on the hormonal protocol. Therefore, Experiment 3 aimed to maintain the
205 difference in POF between groups obtained in Experiment 2, while achieving a better
206 overall synchronization of ovulation and generating distinct P4 secretion profiles between
207 groups. On Experiment 3, at the second PGF injection (D-20; Sincrocio, Ourofino)
208 animals received an Estroject (Rockway, Inc.) device, and estrus detection was
209 performed twice daily from D-19 to D-16 and once daily from D-15 to D-10. Aiming to
210 reduce the rate of early ovulations in both groups, all animals received a new intravaginal
211 P4-releasing device (1g; Sincrogest, Ourofino) on D-10 along with an intramuscular
212 injection of 2 mg estradiol benzoate (Sincrodiol, Ourofino). Simultaneously, cows in the
213 LF-LCL received an intramuscular injection of PGF. Additionally, P4 device removal was
214 performed earlier than in Experiment 2. Specifically, devices were removed 42h and 30 h
215 before the GnRH injection in the LF-LCL (N=12) and the SF-SCL (N=10) groups,
216 respectively. This manipulation aimed to further reduce dominant follicle growth in the
217 LF-LCL group and, consequently, reduce rate of early ovulations. All animals received a

218 PGF injection at P4 device removal and a second PGF injection 6h later (Sincrocio,
219 Ourofino). Ovulation was induced by an injection of 1 µg GnRH on D0 (Sincroforte,
220 Ourofino). Eleven animals were eliminated from further analyses, due to the reasons
221 described on Table 1. In addition, due to unforeseen sample handling problems, plasma
222 P4 concentrations on D7 was available in only 3 out of 12 animals.

223

224 *Blood sampling and hormone measurements*

225 Blood sampling for determination of P4 concentrations was performed once on D-
226 10, D-6 and D-2, and daily from D1 to D7. Estradiol concentrations on D-2, D-1 and D0
227 were determined on a subset of animals from Experiment 3 (N=13). Blood samples were
228 collected by jugular venipuncture using evacuated tubes containing EDTA (BD, São
229 Paulo, SP, Brazil). Plasma was separated by centrifugation at 4°C, 1,500 x g for 30
230 minutes, and stored at -20°C. Progesterone concentrations were measured in all
231 samples using a solid-phase radioimmunoassay (Coat-a-count, DPC, Los Angeles,
232 USA), as validated previously (Garbarino *et al.* 2004). Plasma E2 concentrations were
233 assayed using a commercial RIA kit (Double Antibody Estradiol, DPC, Los Angeles,
234 USA) as reported previously (Siddiqui *et al.* 2009).

235

236 *Ultrasound examinations*

237 Ultrasound examinations to assess growth of the dominant follicle, ovulation and
238 CL development were carried out on D-10, daily from D-2 to D0 and from D3 to D7, and
239 daily (Experiment 1) or every 12 h (Experiments 2 and 3) from D1 to D2.
240 Ultrasonography was performed with the aid of a duplex B-mode (gray-scale) and
241 pulsed-wave color Doppler ultrasound instrument (MyLab30 Vet Gold; Esaote
242 Healthcare, São Paulo, SP, Brazil) equipped with a multi-frequency linear transducer.
243 Retrospective interpretation of changes in follicular diameters over time allowed the
244 identification of the dominant follicle of the estradiol benzoate-induced wave, the
245 determination of the dominant follicle pre-ovulatory diameter and the day of ovulation.
246 Ovulation was defined as the disappearance of POF identified previously followed by the
247 observation of a corpus luteum on the same approximate topographical location on the
248 ovary. The diameter of follicles and CLs were calculated as the average between
249 measurements of two perpendicular axes of each structure.

250

251 *Tissue processing*

252 On D7, cows were stunned by captive bolt and killed by jugular exsanguination.
253 Reproductive tracts were transported on ice and dissected within 15 minutes of

254 slaughter. Ovaries were excised and the newly formed CL was dissected from the
255 ovarian stroma, decapsulated, measured with a caliper and weighed. Slices of luteal
256 tissue were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Inter-caruncular
257 endometrial tissue was dissected from the anterior, medial and posterior regions of the
258 uterine horn ipsilateral to the ovary containing the CL and pooled. Pooled tissue was
259 snap-frozen and stored at -80°C for later processing.

260

261 *RNA isolation and cDNA synthesis*

262 Due to potential effects of asynchrony in the ovulation moment between groups
263 on CL and endometrial functional capacity, gene expression analyses were performed
264 considering animals from the three experiments that ovulated between 24 and 48 hours
265 post-GnRH only. Approximately 30 mg of luteal or endometrial tissue was ground in
266 liquid nitrogen using a stainless steel apparatus and immediately mixed with buffer RLT
267 from the RNeasy Mini columns kit (Qiagen, São Paulo, SP, Brazil), as per manufacturers
268 instructions. To maximize lysis, tissue suspension was passed at least ten times through
269 a 21 G needle, and centrifuged at $13,000 \times g$ for 3 minutes for removal of debris, prior to
270 supernatant loading and processing in RNeasy columns. Columns were eluted with $40 \mu\text{l}$
271 of RNase free water, and elution was repeated using the same $40 \mu\text{l}$ initially used to
272 increase RNA concentration. Concentration of total RNA on extracts was measured by a
273 spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Prior to reverse-
274 transcription, $1 \mu\text{g}$ of total RNA was treated with DNase I (Life Technologies, São Paulo,
275 SP, Brazil) for 15 minutes at room temperature in a $10 \mu\text{l}$ reaction, followed by addition of
276 $1 \mu\text{l}$ of EDTA (25mM) and heating at 65°C for 10 minutes to inactivate DNase I. DNase I
277 treatment was immediately followed by reverse-transcription (High Capacity cDNA
278 Reverse Transcription Kit, Life Technologies) according to manufacturer's instructions.
279 Briefly, $9 \mu\text{l}$ of master mix containing RT buffer, dNTP mix, random primers, RNase
280 inhibitor and reverse transcriptase was added to the $11 \mu\text{l}$ of DNase I treatment reaction.
281 Immediately, samples were incubated at 25°C for 10 minutes, followed by incubation at
282 37°C for 2 hours and reverse-transcriptase inactivation at 85°C for 5 minutes and
283 storage at -20°C .

284

285 *Quantitative PCR*

286

287 It was hypothesized that greater P4 production by corpora lutea of animals in the
288 LF-LCL group was associated with both a greater mass of luteal tissue and with a
289 greater efficiency of P4 secretion per mass of tissue, compared to the SF-SCL group.

290 Greater efficiency could be indicated by increased expression of genes associated with
291 vascularization and P4 synthesis in the CL of LF-LCL animals. Angiogenic factors and
292 steroidogenic enzymes of the corpus luteum were analyzed using Taqman chemistry
293 (Life Technologies). Quantitative PCR analyses were performed using an ABI 7500
294 Sequence Detection System (Life Technologies). Concentrations of VEGFA, FLT1, KDR,
295 STAR, CYP11A1, HSD3B7 and TUBB2B (endogenous control gene) were measured.
296 Primers and probes were designed using the Assays-by-Design service from Life
297 Technologies. Details of primers and probes are provided on Table 2. Reactions for
298 target genes were conducted in duplicates for each sample and the expression was
299 determined with relative quantification by linear regression of fluorescence data. Cycle
300 quantification (Cq) values obtained from the LinReg PCR software. The log-linear portion
301 of the amplification curve used for analysis contained from four to six points with the
302 highest R² value.

303 Main purpose of the reproductive management strategies used in this study were
304 to produce periovulatory endocrine milieus that would be able to differentially affect
305 uterine function and to produce groups of animals with phenotypes associated with
306 higher or lower fertility (LF-LCL and SF-SCL, respectively). Changes in uterine function
307 were evaluated by the expression of sex steroid-responsive endometrial genes. Genes
308 expected to be regulated by sex-steroids during early diestrus, therefore differentially
309 expressed between groups, were the sex-steroid receptors (PGR, ESR1 and ESR2),
310 oxytocin receptor (OXTR), connective tissue growth factor (CTGF), lipoprotein lipase
311 (LPL), asialoglycoprotein receptor 2 (ASGR2) and alanyl (membrane) aminopeptidase
312 (ANPEP) (Robinson *et al.* 2001; Forde *et al.* 2010b; Forde *et al.* 2011b). Additionally,
313 genes found to be expressed differentially in our microarray experiments were also
314 tested (unpublished data), specifically, the peptidase inhibitor 3 (PI3), nuclear protein
315 transcriptional regulator 1 (NUPR1), signal transducing adaptor family member 2
316 (STAP2) and aldo-keto reductase family 1, member C4 (AKR1C4). Expression of sex-
317 steroid responsive genes was analyzed by SYBR Green chemistry (Life Technologies).
318 Real-time PCR reactions were carried out on a Step One Plus apparatus (Life
319 Technologies). Primer sequences for Cyclophilin-A (endogenous control gene), OXTR,
320 ESR1, ESR2, CTGF, LPL, ANPEP and ASGR2 were obtained from the literature
321 (Bettegowda *et al.* 2006; Shibaya *et al.* 2007; Krishnaswamy *et al.* 2009; Forde *et al.*
322 2010a; Forde *et al.* 2011a). Primer sequences for PGR, PI3, NUPR1, STAP2 and
323 AKRC4 genes were designed based on GenBank RefSeq mRNA sequences of the
324 target genes using the NCBI tool, Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Primer details are provided on Table 2. Reactions were run on a 96-well

326 plate, sealed with MicroAmp optical adhesive cover (Life Tech), in triplicates. Raw
327 fluorescence data was extracted from the Step One Plus apparatus with no baseline
328 correction and submitted to LinRegPCR software for baseline correction, determination
329 of PCR efficiency and Cq values per sample. Cycle quantification (Cq) values were
330 obtained from the LinReg PCR software. The log-linear portion of the amplification curve
331 used for analysis on LinReg PCR software contained from four to six points with the
332 highest R² value.

333 Relative quantification and statistical analyses of qPCR data for all tested genes
334 (luteal and endometrial gene expression) was performed by the Relative Expression
335 Software Tool (REST; (Pfaffl *et al.* 2002), and results are expressed as a ratio of LF-LCL
336 group:SF-SCL group.

337

338 *Statistical analyses*

339 Prior to the statistical analyses animals were evaluated according to criteria
340 established to determine whether minimal premises were matched. Animals were not
341 considered for the experiment if: P4 concentration on D-10 was lower than 1 ng/mL, P4
342 concentration on D-2 was higher than 3 ng/mL in the LF-LCL group, P4 concentration on
343 D-2 was lower than 2 ng/mL in the SF-SCL group), dominant follicle diameter on D0 was
344 smaller than 8 mm, ovulation was detected at the D0 ultrasound examination or before
345 (i.e. early ovulation), ovulation was detected at the D3 ultrasound examination (i.e., late
346 ovulation), ovulation was not detected, follicular or luteal cysts were detected at any
347 moment during the experiment (Table 1).

348 Multivariate analysis was performed to classify animals according to their
349 response profile to the hormonal protocols employed. The following relevant variables
350 were selected: follicle diameter from D-2 to D0, maximum diameter of the POF, CL
351 volume from D3 to D7, CL weight and P4 concentrations from D3 to D7. Analysis by
352 orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) was carried
353 out using SIMCA-P+ version 12.0 (Umetrics, Umea, Sweden). Data from forty-seven
354 cows that ovulated within 48 hours of GnRH injection were submitted to the multivariate
355 analyses using variables described above. Two of the 49 cows that matched the
356 premises were not included in the multivariate analysis because P4 concentrations from
357 D1 to D7 were not measured.

358 For univariate analysis, for each dependent variable, data that were not normally
359 distributed by the Shapiro-Wilk test were transformed to natural logarithms or ranks. The
360 dominant follicle diameter, P4 concentrations, and CL volume were analyzed by spli-plot
361 ANOVA considering the effects of group, day, experiment and interactions. Only animals

362 that had data available for all tested variables were included in the univariate statistical
363 analyses. The SAS PROC MIXED procedure (Version 9.2; SAS) was used with a
364 REPEATED statement to account for autocorrelation between sequential measurements.
365 The Least Significant Difference test was used when comparisons between days were
366 made within a group or between more than two means. Because there was no
367 experiment by group by day interaction for any of the dependent variables, data from all
368 experiments were grouped. Discrete dependent variables (diameter of dominant follicle
369 on D-2 and D0 and diameter of POF, E2 concentrations on D-2, D-1 and D0, CL volume
370 and weight measured post-mortem and P4 concentrations on D6 and D7, sum of P4
371 concentrations from D3 to D7, difference between P4 concentrations from D7 to D3 and
372 interval between D0 until progressive increase in P4 and between D0 until P4 > 1ng/mL)
373 were analyzed by one-way ANOVA for the effect of group, treatment and their interaction
374 using the PROC GLM procedure (Version 9.2; SAS). Fisher's exact test and chi-square
375 distribution were used for comparing proportion of cows ovulating in different time
376 windows. A probability of $P \leq 0.05$ indicated that a difference was significant, and a
377 probability of $P > 0.05$ to $P \leq 0.1$ indicated that significance was approached. Data were
378 presented as the mean \pm SEM, unless otherwise indicated.

379 Correlations between discrete dependent variables were modeled by means of
380 regression analyses, irrespective of groups, using the software Minitab (Minitab 16
381 Statistical Software (2010). State College, PA: Minitab, Inc.; www.minitab.com). Linear,
382 quadratic and cubic associations were tested.

383

384 Results

385

386 *Pre-ovulatory and ovulatory responses to the hormonal manipulation*

387 Table 1 shows premises selected as criteria to determine whether or not animals
388 responded to each critical step during the presynch and synchronization of ovulation
389 protocols. Number of animals excluded per criterion is also indicated. Overall, 59% of
390 animals starting the protocol attended all the premises for a successful response,
391 including ovulation within 48h post-GnRH. Success rate per experiment ranged from
392 52.2 to 62.2% and was not different among experiments (Table 3). In regards to the
393 effect of estradiol benzoate injection on regression of the dominant follicle and
394 recruitment of a new follicular wave, a subset of animals was examined by
395 ultrasonography on D-6, D-4 and D-2 (n=20; Exp3). Results indicate that large follicles
396 observed on D-6 progressively decreased in diameter towards D-2 in every scanned

397 animal; meanwhile, at least one smaller follicle observed on D-6 started its progressive
398 growth until ovulation in every scanned animal.

399 Stratification of the moment of ovulation showed that the frequency of cows that
400 ovulated the POF between 24 and 48 h after GnRH treatment was lower ($P < 0.05$) in LF-
401 LCL group than in SF-SCL group in Experiment 1 and 2, but did not differ ($P > 0.1$) in
402 Experiment 3. Additionally, the total percentage of cows ovulating between 24 and 48 h
403 was higher ($P < 0.05$) in Experiments 1 and 3 than in Experiment 2, with a numerical
404 advantage for Experiment 3 (Table 3).

405 After removal of animals that did not match the premises regarding P4
406 concentrations before ovulation, P4 concentrations on D-10 between were not different
407 between LF-LCL group (4.87 ± 0.39) and LF-LCL group (4.16 ± 0.33 ng/mL), but were
408 greater ($P < 0.0001$) on D-6 and D-2 in the SLF-SCL group (6.19 ± 0.4 and 4.91 ± 0.16
409 ng/mL, respectively) than in the LF-LCL group (2.68 ± 0.2 and 1.15 ± 0.14 ng/mL,
410 respectively).

411

412 *Multivariate analysis*

413 Aiming to compare animal responses per group using a holistic approach,
414 multivariate analysis was performed. Visualization of orthogonal projection to latent
415 structures (OPLS) plots showed a clear segregation between animals from the 2 groups
416 (SF-SCL and LF-LCL) that was mostly explained by the horizontal axis (Fig. 1). Results
417 from the OPLS model also indicated that one cow had a phenotype that resembled the
418 opposite group (i.e., animal from LF-LCL group showed a profile similar to animals from
419 the SF-SCL group), and a second cow was considered an outlier. Both cows were
420 removed from the analysis (Fig. 1). The model obtained after removal of both animals
421 explained around 75% of variability of the dataset.

422

423 *Overall effect of hormonal manipulation on follicle diameter, CL volume and P4* 424 *concentrations*

425 For the diameter of the dominant follicle measured overtime from D-2 to D0, group
426 and day effects were detected, indicating that follicles from both groups grew overtime
427 and that the average follicle diameter was greater in LF-LCL (12.2 ± 0.21 mm) than in
428 the SF-SCL group (9.48 ± 0.25 mm). Follicles around P4-releasing device withdrawal (D-
429 2), at GnRH injection (D0) and at their last measurement (POF) were always larger in the
430 LF-LCL group than in SF-SCL group (Table 4). In agreement with these findings, E2
431 plasma concentrations were also greater in LF-LCL than in SF-SCL cows on D-2, D-1
432 and D0 (Table 4).

433 As for corpora lutea measurements, in the comparison of CL volume from D3 to
434 D7, effects of group, day, experiment and group by day interaction were detected (Fig.
435 3A). Interpretation of the group by day interaction suggests that CL volume progressive
436 increase from D3 to D7 was more pronounced for LF-LCL than SF-SCL. Additionally, CL
437 weight on D7 was greater in the LF-LCL than in SF-SCL. Consistently, CL volume on D7
438 tended to be greater in LF-LCL group in comparison to the SF-SCL group (Table 4).

439 Significant effects of group, day, experiment and interactions of group by day and
440 experiment by day were detected for P4 concentrations from D3 to D7 (Fig. 3B).
441 Interpretation of the group by day interaction suggests that, similar to the CL volume, P4
442 concentration progressive increase from D3 to D7 was more pronounced for LF-LCL
443 than SF-SCL. Further investigation of variables associated with P4 production showed
444 that the interval from D0 (GnRH application) to beginning of a progressive increase in P4
445 concentrations (i.e., continuous increase from a daily sampling until D7) and the interval
446 from D0 to the day in which P4 concentration was above 1 ng/mL, was shorter in LF-LCL
447 group than in SF-SCL group (Table 4). Accumulated P4 concentrations from D3 to D7
448 and the difference between concentrations on D7 and D3 were also greater in the LF-
449 LCL group in comparison to the SF-SCL group (Table 4).

450 Data dispersion regarding POF diameter, CL weight and P4 concentration on D6
451 was compared across all three experiments by means of individual value plots, as
452 presented on Fig. 3A, B and C, respectively. Overall, it is suggested that Experiment 1
453 had greater data dispersion and produced less distinction between LF-LCL and SF-SCL
454 groups. It can be observed that manipulation of follicle growth was successfully reached
455 throughout experiments (Fig. 3A). Furthermore, it was observed that unlike POF
456 diameters, CL weight dispersion pattern were not as distinct between groups (Fig. 4B
457 and C); However, assessment of P4 concentrations on D6 indicates clearly the
458 improvement across experiments, as evidenced by the separation between LF-LCL and
459 SF-SCL group means on Experiment 3 in comparison to the other two experiments.
460 Moreover, no animals from one group are observed within the range of values of the
461 other group.

462

463 *Luteal and endometrial gene expression*

464 Assessment of CL expression of steroidogenesis (STAR, CYP11A1 and HSD3B)
465 and angiogenesis-related genes (VEGF, KDR and FLT1) showed no differential
466 expression between groups LF-LCL and SF-SCL (Table 5). On the other hand,
467 endometrial gene expression was affected by group. Specifically, LF-LCL animals had
468 reduced expression of OXTR and PI3 genes, whereas ESR2, AKR1C4 and LPL gene

469 expression was increased (Table 5). Additionally, significant positive linear regressions
470 were observed between ESR2 (R^2 0.69; $p=0.01$) and LPL (R^2 0.31; $p=0.04$) endometrial
471 gene expression ratios on D7 and E2 concentrations on D0. A significant cubic
472 regression was observed between AKR1C4 endometrial gene expression on D7 (R^2
473 0.89; $p<0.001$) and E2 concentrations on D0. Similarly, ESR2 (R^2 0.19; $p=0.03$),
474 AKR1C4 (R^2 0.53; $p<0.001$) and LPL (R^2 0.5; $p<0.001$) endometrial gene expression on
475 D7 were positively correlated with P4 concentrations on D6.

476

477 Discussion

478 Tight regulation of the molecular, cellular and endocrine events of the
479 reproductive cycle in livestock is critical for a successful pregnancy outcome. Particular
480 attention is paid to the ovarian steroids, E2 and P4, whose functions involve positive and
481 negative feedback on the hypothalamus and pituitary as well as priming of the
482 reproductive tract towards its receptive state or to luteolysis. This manuscript presented
483 an experimental model of hormonal manipulations that successfully (1) modulated the
484 diameter of the POF, and consequently E2 concentrations, as well as CL development
485 and P4 concentrations during the periovulatory period. The proposed animal model was
486 capable of (2) generating two groups of animals with distinctly different periovulatory
487 endocrine milieus, which (3) were not associated with differential luteal gene expression,
488 but (4) sufficient to alter endometrial gene expression.

489 Strategic use of routinely employed pharmaceuticals and tight monitoring of
490 ovarian responses allowed the characterization of distinctly different groups of animals,
491 according to the variables investigated. The contrasting patterns of POF growth and CL
492 development obtained, and consequently E2 and P4 secretion, are similar to patterns
493 observed in physiologic conditions and may serve to model conditions of contrasting
494 fertility. Indeed, approaches similar to the ones described here resulted in changes in
495 pregnancy rates in *Bos indicus* beef cows (Meneghetti *et al.* 2009; Peres *et al.* 2009).
496 Our overarching working hypothesis is that fertility effects are due mostly to coordinated
497 actions of the ovarian steroids in the uterus. Thus, changes in the pattern of gene
498 expression in this organ were expected to ensue in response to the treatments used
499 here. This was shown by the change in expression of the OXTR, ESR2, LPL and PI3
500 genes reported in the present study and further confirmed by global changes in gene
501 expression detected by microarray and RNA-seq analyses in subsets of samples from
502 the same experiments (unpublished data). Authors consider the present experimental
503 model suitable to test hypotheses related to uterine function in response to modulation of
504 the periovulatory endocrine milieu.

505 As a central aspect of the experimental approach proposed in this manuscript, the
506 modulation of the dominant follicle growth by means of controlling the exposure of the
507 growing follicle to P4 was achieved successfully. Hormonal manipulation protocols had
508 an efficiency of 59%, as indicated on table 1, when considering ovulations occurring
509 within 48 hours post-GnRH. A more rigorous criterion to study uterine response that
510 restricts ovulation window to between 24 and 48 hours post-GnRH lead to an efficiency
511 of 37%, according to premises established to assess expected animal response to
512 hormonal treatment. The difference between the two groups in dominant follicle diameter
513 observed at 48 hours prior to induction of ovulation (D-2) was maintained until the last
514 measurement of the POF. On a similar approach, studies carried out in *Bos indicus* and
515 *Bos taurus* animals showed successful manipulation of the POF diameter by injecting or
516 not a PGF analog at P4-releasing device insertion (Carvalho *et al.* 2008; Pfeifer *et al.*
517 2009). A larger study, in which PGF injection was administered two days prior to P4-
518 releasing device removal, also demonstrated the negative relationship between P4
519 concentrations on the day of P4 device removal and follicle diameter at TAI (Peres *et al.*
520 2009). Additionally, a positive relationship was observed between follicle diameter at TAI
521 and P4 concentration on D7 post-AI, whereas probability of conception was influenced
522 positively by follicle diameter at TAI (Peres *et al.* 2009) and P4 concentration on D7 post-
523 AI (Meneghetti *et al.* 2009; Peres *et al.* 2009; Sa Filho *et al.* 2010; Sa Filho *et al.* 2011).
524 Higher pregnancy rates associated with anticipation of PGF, as reported by Peres *et al.*
525 (2009), may be in part explained by higher ovulation rates as well as a higher proportion
526 of animals showing estrus behavior as a consequence of having larger follicles at TAI
527 (Peres *et al.* 2009). The present work identified similar frequencies of ovulation detected
528 within 48 hours post-GnRH across the three experiments. However, when considering a
529 shorter window of ovulation, more likely resulting from a GnRH-induced response (i.e.,
530 between 24 and 48 hours post-GnRH), the overall frequency of ovulations in the
531 expected window was lower in Experiment 2 than in Experiments 1 and 3. It was
532 noticeable as well that in Experiments 1 and 2, in which a second-use P4-releasing
533 device was used, animals from the LF-LCL group had lower ovulation frequencies within
534 the expected window than those from the SF-SCL group. It is suggested that the overall
535 larger follicles in LF-LCL versus SF-SCL animals (Table 4), which were growing under
536 the influence of P4 released from a second-use P4-releasing device, may explain these
537 observations. On the other hand, in Experiment 3, all animals from the SF-SCL group
538 ovulated within the expected window, and the ovulation frequency of the SF-SCL group
539 was not different from that of the LF-LCL group, indicating a more synchronous control of
540 ovulation by the corresponding hormonal protocol. Improved synchronization was likely a

541 consequence of the use of new P4-releasing devices and shorter proestrus interval in
542 Experiment 3 cows versus cows from Experiments 1 and 2.

543 The present work showed that the manipulation of dominant follicle growth
544 resulted into two groups of cows with distinct proestrus/estrus E2 concentrations, CL
545 volume and weight as well as distinct post-ovulatory P4 concentrations. A positive
546 relationship between POF diameter and subsequent CL development and function was
547 observed in the present study, similarly to previous reports (Vasconcelos *et al.* 2001;
548 Peres *et al.* 2009). Most importantly, in the present study, ovarian variables distinctly
549 different between the LF-LCL and SF-SCL groups have been associated positively with
550 conceptus development and probability of conception (Vasconcelos *et al.* 2001; Carter *et*
551 *al.* 2008; Beltman *et al.* 2009; Meneghetti *et al.* 2009; Peres *et al.* 2009). Based on the
552 profile of post-ovulatory P4 concentrations, it is suggested that LF-LCL group cows
553 experienced an anticipated P4 rise above basal concentrations compared to cows on the
554 SF-SCL group. Others have shown that exogenous supplementation of P4 leading to an
555 early, sudden and marked increase in P4 concentrations during early diestrus induces
556 the early expression of P4-responsive genes (Forde *et al.* 2009b). Such approach was
557 associated also with advanced conceptus development. One may speculate that
558 anticipating the organization of a receptive uterus may be advantageous for the
559 developing embryo, which would be received by a potentially more appropriate uterine
560 environment in terms of paracrine, endocrine, nutritional and redox milieu.

561 As a common proposition of numerous research groups interested in the biology
562 of the pre-implantation receptive uterus, including ours, the probability of conception and
563 maintenance of pregnancy depends on the combination of multiple factors that are either
564 expressed by the uterus or transported into its lumen (Hugentobler *et al.* 2007a;
565 Hugentobler *et al.* 2007b; Carter *et al.* 2008; Gao *et al.* 2009; Satterfield *et al.* 2009b;
566 Carter *et al.* 2010; Satterfield *et al.* 2010; Groebner *et al.* 2011). In an attempt to
567 simultaneously study a group of variables that are expected to affect the uterine function
568 individually, multivariate analysis was performed in the present study. The major aim of
569 this approach was to characterize two experimental groups, LF-LCL and SF-SCL, that
570 should be internally homogeneous, yet distinct from each other, when considering the
571 major physiological events comprehended between the growth of the dominant follicle
572 and E2 secretion profile, ovulation, CL development and early post-ovulatory P4
573 secretion. Overall, multivariate analysis confirmed that our animal model was sufficient to
574 generate two distinct groups of animals with overall profiles based on POF and CL size
575 and P4 concentrations during the periovulatory period that were readily distinguishable
576 from each other. Furthermore, this holistic approach indicated that the minor adjustments

577 implemented throughout the three experiments were not majorly distinct as evidenced by
578 the lack of identification of animal clusters by experiment (data not shown). Additionally,
579 multivariate analysis supported the identification and exclusion of misclassified
580 individuals as well as the selection of individuals with the most contrasting responses.
581 This information can be used to select representative samples within each group to be
582 used in subsequent analyses. Although multivariate analysis did not identify the
583 formation of clusters of animals potentially influenced by moment of ovulation (i.e., 0-24h
584 vs. 24-48h; data not shown), this study was cautious to avoid the comparison of uterine
585 responses between animals that were not on the same day post-ovulation; therefore,
586 only animals ovulating within the expected range of response to the GnRH stimulus were
587 considered for gene expression analyses.

588 Based on the expected and confirmed differential CL growth and P4 secretion
589 profile between groups, it was anticipated that luteal gene expression profile would
590 indicate a distinct steroidogenic and angiogenic capacity between LF-LCL and SF-SCL
591 animals. Specifically, pro-steroidogenic and pro-angiogenic profiles were expected in
592 cows with larger CL volumes and greater P4 concentrations on D7. Considering only
593 animals that ovulated between 24 and 48h post-GnRH, although CL volume and P4
594 concentrations on D7 were different between groups, luteal gene expression profiles
595 were similar. These results suggest that higher P4 concentrations may have been
596 achieved by the greater luteal tissue mass as indicated by differences in CL weight and
597 volume rather than a greater steroidogenic capacity per unit of CL mass. Furthermore, it
598 is suggested that larger follicles originate CLs that will be larger and will start copious P4
599 synthesis and secretion earlier than those originated from smaller follicles, thus
600 potentially anticipating the preparation of uterine receptivity. Considering the P4
601 secretion profile of both experimental groups in the present study, it was observed that
602 LF-LCL animals experience an early rise in P4 concentrations; therefore, differential
603 luteal gene expression of steroidogenic and angiogenic enzymes might be observed if
604 comparing CLs at an earlier stage of development, possibly around D3 and D4 post-
605 GnRH.

606 During pre-implantation, the major ovarian-dependent endocrine events that
607 encompass the preparation of the dominant follicle, ovulation, gamete transport,
608 fertilization and early embryo development are influenced by concentrations of P4 during
609 the follicle growth, concentrations of preovulatory E2 and concentrations of P4 post-
610 ovulation. One may speculate that the difference between fertile and infertile cycles of
611 animals exposed to similar levels of nutritional, environmental and sanitary conditions
612 could ultimately result from the response of the uterus to the individual endocrine

613 environment expressed around ovulation. The present study accomplished the objective
614 of generating two groups of animals with distinct POF diameters, preovulatory E2 and
615 postovulatory P4 concentrations and, therefore, was successful in creating contrasting
616 periovulatory endocrine milieus. Postovulatory P4 concentrations effects on conceptus
617 growth have been reported previously (Carter *et al.* 2008). However, it should also be
618 considered that both the diameter of the POF and preovulatory E2 concentrations, which
619 are positively correlated, have been associated with pregnancy success as well.
620 Numerous cell types and processes directly associated with fertility, such as follicular
621 cells, oocytes and gamete transport that have been described as targets of E2 activity
622 are reviewed by Pohler *et al.* (2012) (Pohler *et al.* 2012). As for the scope of the present
623 study, it is particularly relevant to refer to studies by Miller and Moore (1976) who
624 demonstrated in ewes the necessity of the exposure to the cyclic oscillations of the
625 ovarian steroids for the expression of the full receptive potential of the uterus (Miller and
626 Moore 1976). Moreover, in an ovariectomized ewe model to mimic cyclic fluctuations of
627 ovarian steroids (i.e., P4-E2-P4), lack of E2 supplementation compromised uterine
628 protein synthesis, protein content in the uterine lumen and endometrial expression of E2
629 and P4 receptors. Authors proposed the activity of E2 as a priming agent for the
630 subsequent uterine response to post-ovulatory P4 (Miller *et al.* 1977). In accordance with
631 such observations the present study also reported the positive correlation between E2
632 concentrations on D0 and endometrial expression of LPL and ESR2 genes. More recent
633 studies by Bridges *et al.* (2012) in *Bos taurus* heifers using a model of short and long
634 proestrus interval, leading to low and high E2 concentrations, respectively, showed a
635 major negative effect of short proestrus/low E2 concentrations on pregnancy rates
636 (Bridges *et al.* 2012).

637 In addition to the successful manipulation of the size of the POF, preovulatory E2
638 concentrations and post-ovulatory P4 concentrations, the ability of the distinct
639 periovulatory endocrine milieus to differentially modulate endometrial response was
640 assessed. Steroid regulation of PGR, ESR1, ESR2 and OXTR has been reported by
641 numerous studies assessing their abundance in uterine compartments such as
642 myometrium, glandular and luminal epithelium (Soloff and Fields 1989; Jenner *et al.*
643 1991; Robinson *et al.* 2001; Martin *et al.* 2008); therefore these genes were selected as
644 markers of P4 responsiveness. Patterns of expression reported in the literature indicate
645 upregulation of PGR and OXTR genes during proestrus and estrus and downregulation
646 during the luteal phase. According to our findings, although PGR expression was not
647 different between groups, OXTR expression was reduced at the transcriptional level in
648 animals that ovulated larger follicles and presented greater P4 concentrations post-

649 estrus, indicating a differential uterine response triggered by the distinct periovulatory
650 endocrine milieus. Interestingly, upregulation of ESR2 endometrial gene expression in
651 LF-LCL cows supported by the high correlation with E2 concentrations on D0 suggests a
652 potential effect of the proestrus endocrine milieu on the uterine gene expression profile.
653 Others have reported the positive regulation of ESR2 gene by E2 and its negative
654 correlation with P4 (Spencer and Bazer 1995). Additionally, investigation of the
655 expression of genes reported previously (Forde *et al.* 2011a) as responsive to P4
656 supplementation or suppression showed that whereas LPL gene expression
657 corroborates previous reports, the expression of ANPEP, ASGR2 and CTGF was not
658 altered in the present study. These observations confirm that the morphologic and
659 endocrine changes of the ovary obtained in response to the manipulation of the estrous
660 cycle were sufficient to alter endometrial gene expression. However, marked differences
661 between animal models (i.e., physiological fluctuations of ovarian steroids in the present
662 paper versus sharp increase induced by exogenous P4 supplementation only, as
663 reported by Forde *et al.*, 2011 for example; (Forde *et al.* 2009a)) may account for such
664 discrepancies. It may be speculated that the altered gene expression patterns identified
665 in the present study may reflect more closely the uterine gene expression responses that
666 ensue during the cycle or early pregnancy. Based on the exposed, our reported model
667 represents an alternative approach for the study of uterine receptivity-related molecules
668 that would potentially be identified in response to an endocrine environment that closely
669 resembles the cyclic hormonal fluctuations occurring around ovulation.

670

671 **Conclusions**

672 In conclusion, data presented support the hypothesis that the manipulation of the
673 dominant follicle growth is a useful tool to modulate, within physiological limits, the
674 periovulatory endocrine milieu. We showed that animals hormonally manipulated to have
675 larger POFs also secreted more P4 during early diestrus, which is likely due to greater
676 mass of luteal tissue rather than increased expression of steroidogenic enzymes and
677 angiogenic factors. Molecular data support the hypothesis that distinct periovulatory
678 endocrine milieus act on the endometrium to alter gene expression of known P4-
679 responsive genes such as OXTR, ESR2, LPL, AKR1C4 and PI3. The developed model
680 and analytical approach employed in the present study may be used as the basis for the
681 investigation of endometrium-derived molecules potentially involved with conditions of
682 higher or lower fertility that are mostly dependent upon the periovulatory fluctuations of
683 E2 and P4 concentrations.

684

685 **Acknowledgements**

686 We would like to thank the University of São Paulo, Administration of the
 687 Pirassununga campus, Ourofino Saúde Animal and Deoxi Biotecnologia for providing the
 688 animals, the products for pharmacological manipulation of estrous cycle, and the
 689 StepOne Plus qPCR apparatus, respectively. We thank Dr. Fabio D'Alexandri for running
 690 multivariate analyses. This research was funded, in part, by São Paulo Research
 691 Foundation (FAPESP) and National Counsel of Technological and Scientific
 692 Development (CNPq). We also want to thank Everton Lopes, Estela Araujo, Heitor
 693 Amaral and Stephanie Galindo for technical support.

694
695 **References**

- 696
 697 Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Gross, K., Schmidt, S.E., Meyer, H.H., Einspanier, R.,
 698 Wenigerkind, H., Vermehren, M., Blum, H., Sinowatz, F., and Wolf, E. (2005) Gene
 699 expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of
 700 molecular pathways involved in functional changes. *J Mol Endocrinol* **34**(3), 889-908
 701
 702 Beltman, M.E., Roche, J.F., Lonergan, P., Forde, N., and Crowe, M.A. (2009) Evaluation
 703 of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle.
 704 *Theriogenology* **72**(7), 986-92
 705
 706 Bettgowda, A., Patel, O.V., Ireland, J.J., and Smith, G.W. (2006) Quantitative analysis
 707 of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A,
 708 phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate
 709 dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early
 710 embryogenesis in vitro. *Mol Reprod Dev* **73**(3), 267-78
 711
 712 Binelli, M., Hampton, J., Buhi, W.C., and Thatcher, W.W. (1999) Persistent dominant
 713 follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. *Biol Reprod*
 714 **61**(1), 127-34
 715
 716 Bridges, G.A., Mussard, M.L., Pate, J.L., Ott, T.L., Hansen, T.R., and Day, M.L. (2012)
 717 Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine
 718 gene expression. *Anim Reprod Sci* **133**(1-2), 16-26
 719
 720 Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C., Kenny,
 721 D.A., Roche, J.F., and Lonergan, P. (2008) Effect of increasing progesterone
 722 concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development
 723 in beef heifers. *Reprod Fertil Dev* **20**(3), 368-75
 724
 725 Carter, F., Rings, F., Mamo, S., Holker, M., Kuzmany, A., Besenfelder, U., Havlicek, V.,
 726 Mehta, J.P., Tesfaye, D., Schellander, K., and Lonergan, P. (2010) Effect of elevated
 727 circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global
 728 transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine
 729 oviduct. *Biol Reprod* **83**(5), 707-19
 730
 731 Carvalho, J.B., Carvalho, N.A., Reis, E.L., Nichi, M., Souza, A.H., and Baruselli, P.S.
 732 (2008) Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*,
 733 *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* **69**(2), 167-75

- 734
735 Demetrio, D.G., Santos, R.M., Demetrio, C.G., and Vasconcelos, J.L. (2007) Factors
736 affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating
737 Holstein cows. *J Dairy Sci* **90**(11), 5073-82
738
- 739 Forde, N., Beltman, M.E., Duffy, G.B., Duffy, P., Mehta, J.P., O'Gaora, P., Roche, J.F.,
740 Lonergan, P., and Crowe, M.A. (2011a) Changes in the endometrial transcriptome during
741 the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for
742 conceptus elongation. *Biol Reprod* **84**(2), 266-78
743
- 744 Forde, N., Beltman, M.E., Duffy, G.B., Duffy, P., Mehta, J.P., O'Gaora, P., Roche, J.F.,
745 Lonergan, P., and Crowe, M.A. (2011b) Changes in the endometrial transcriptome during
746 the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for
747 conceptus elongation. *Biol Reprod* **84**(2), 266-78
748
- 749 Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C., Spencer, T.E., Bazer, F.W.,
750 McBride, R., Boland, M.P., O'Gaora, P., Lonergan, P., and Roche, J.F. (2009a)
751 Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced
752 conceptus development in cattle. *Biol Reprod* **81**(4), 784-94
753
- 754 Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C., Spencer, T.E., Bazer, F.W.,
755 McBride, R., Boland, M.P., O'Gaora, P., Lonergan, P., and Roche, J.F. (2009b)
756 Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced
757 conceptus development in cattle. *Biol Reprod* **81**(4), 784-94
758
- 759 Forde, N., Spencer, T.E., Bazer, F.W., Song, G., Roche, J.F., and Lonergan, P. (2010a)
760 Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding
761 for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. *Physiol Genomics*
762 **41**(1), 53-62
763
- 764 Forde, N., Spencer, T.E., Bazer, F.W., Song, G., Roche, J.F., and Lonergan, P. (2010b)
765 Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding
766 for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. *Physiol Genomics*
767 **41**(1), 53-62
768
- 769 Gandolfi, F., Brevini, T.A., and Moor, R.M. (1989a) Effect of oviduct environment on
770 embryonic development. *J Reprod Fertil Suppl* **38**, 107-15
771
- 772 Gandolfi, F., Brevini, T.A., Richardson, L., Brown, C.R., and Moor, R.M. (1989b)
773 Characterization of proteins secreted by sheep oviduct epithelial cells and their function
774 in embryonic development. *Development* **106**(2), 303-12
775
- 776 Gao, H., Wu, G., Spencer, T.E., Johnson, G.A., Li, X., and Bazer, F.W. (2009) Select
777 nutrients in the ovine uterine lumen. I. Amino acids, glucose, and ions in uterine luminal
778 flushings of cyclic and pregnant ewes. *Biol Reprod* **80**(1), 86-93
779
- 780 Garbarino, E.J., Hernandez, J.A., Shearer, J.K., Risco, C.A., and Thatcher, W.W. (2004)
781 Effect of lameness on ovarian activity in postpartum holstein cows. *J Dairy Sci* **87**(12),
782 4123-31
783
- 784 Groebner, A.E., Rubio-Aliaga, I., Schulke, K., Reichenbach, H.D., Daniel, H., Wolf, E.,
785 Meyer, H.H., and Ulbrich, S.E. (2011) Increase of essential amino acids in the bovine
786 uterine lumen during preimplantation development. *Reproduction* **141**(5), 685-95
787

- 788 Hugentobler, S.A., Diskin, M.G., Leese, H.J., Humpherson, P.G., Watson, T., Sreenan,
789 J.M., and Morris, D.G. (2007a) Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma
790 during the estrous cycle in the bovine. *Mol Reprod Dev* **74**(4), 445-54
791
- 792 Hugentobler, S.A., Morris, D.G., Sreenan, J.M., and Diskin, M.G. (2007b) Ion
793 concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in
794 the bovine. *Theriogenology* **68**(4), 538-48
795
- 796 Jenner, L.J., Parkinson, T.J., and Lamming, G.E. (1991) Uterine oxytocin receptors in
797 cyclic and pregnant cows. *J Reprod Fertil* **91**(1), 49-58
798
- 799 Krishnaswamy, N., Danyod, G., Chapdelaine, P., and Fortier, M.A. (2009) Oxytocin
800 receptor down-regulation is not necessary for reducing oxytocin-induced prostaglandin
801 F(2alpha) accumulation by interferon-tau in a bovine endometrial epithelial cell line.
802 *Endocrinology* **150**(2), 897-905
803
- 804 Martin, I., Torres Neto, R., Oba, E., Buratini, J., Jr., Binelli, M., Laufer-Amorim, R., and
805 Ferreira, J.C. (2008) Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and
806 progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos*
807 *taurus indicus*) cows. *Reprod Domest Anim* **43**(4), 415-21
808
- 809 Meneghetti, M., Sa Filho, O.G., Peres, R.F., Lamb, G.C., and Vasconcelos, J.L. (2009)
810 Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I:
811 basis for development of protocols. *Theriogenology* **72**(2), 179-89
812
- 813 Miller, B.G., and Moore, N.W. (1976) Effects of progesterone and oestradiol on RNA and
814 protein metabolism in the genital tract and on survival of embryos in the ovariectomized
815 ewe. *Aust J Biol Sci* **29**(5-6), 565-73
816
- 817 Miller, B.G., Moore, N.W., Murphy, L., and Stone, G.M. (1977) Early pregnancy in the
818 ewe: effects of oestradiol and progesterone on uterine metabolism and on embryo
819 survival. *Aust J Biol Sci* **30**(4), 279-88
820
- 821 Murray, M.K. (1993) An estrogen-dependent glycoprotein is synthesized and released
822 from the oviduct in a temporal- and region-specific manner during early pregnancy in the
823 ewe. *Biol Reprod* **48**(3), 446-53
824
- 825 Peres, R.F., Claro, I., Jr., Sa Filho, O.G., Nogueira, G.P., and Vasconcelos, J.L. (2009)
826 Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows
827 submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* **72**(5), 681-9
828
- 829 Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool
830 (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results
831 in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**(9), e36
832
- 833 Pfeifer, L.F., Mapletoft, R.J., Kastelic, J.P., Small, J.A., Adams, G.P., Dionello, N.J., and
834 Singh, J. (2009) Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations
835 on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology* **72**(9), 1237-
836 50
837
- 838 Pohler, K.G., Geary, T.W., Atkins, J.A., Perry, G.A., Jinks, E.M., and Smith, M.F. (2012)
839 Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell Tissue Res*
840 **349**(3), 649-64
841

- 842 Robinson, R.S., Mann, G.E., Lamming, G.E., and Wathes, D.C. (2001) Expression of
843 oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout
844 the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* **122**(6), 965-79
845
- 846 Sa Filho, M.F., Crespilho, A.M., Santos, J.E., Perry, G.A., and Baruselli, P.S. (2010)
847 Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood
848 of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-
849 based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci* **120**(1-4), 23-30
850
- 851 Sa Filho, M.F., Santos, J.E., Ferreira, R.M., Sales, J.N., and Baruselli, P.S. (2011)
852 Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows
853 submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*
854 **76**(3), 455-63
855
- 856 Satterfield, M.C., Bazer, F.W., and Spencer, T.E. (2006) Progesterone regulation of
857 preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol*
858 *Reprod* **75**(2), 289-96
859
- 860 Satterfield, M.C., Gao, H., Li, X., Wu, G., Johnson, G.A., Spencer, T.E., and Bazer, F.W.
861 (2010) Select nutrients and their associated transporters are increased in the ovine
862 uterus following early progesterone administration. *Biol Reprod* **82**(1), 224-31
863
- 864 Satterfield, M.C., Song, G., Kochan, K.J., Riggs, P.K., Simmons, R.M., Elsik, C.G.,
865 Adelson, D.L., Bazer, F.W., Zhou, H., and Spencer, T.E. (2009a) Discovery of candidate
866 genes and pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and
867 conceptus elongation. *Physiol Genomics* **39**(2), 85-99
868
- 869 Satterfield, M.C., Song, G., Kochan, K.J., Riggs, P.K., Simmons, R.M., Elsik, C.G.,
870 Adelson, D.L., Bazer, F.W., Zhou, H., and Spencer, T.E. (2009b) Discovery of candidate
871 genes and pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and
872 conceptus elongation. *Physiol Genomics* **39**(2), 85-99
873
- 874 Shibaya, M., Matsuda, A., Hojo, T., Acosta, T.J., and Okuda, K. (2007) Expressions of
875 estrogen receptors in the bovine corpus luteum: cyclic changes and effects of
876 prostaglandin F₂α and cytokines. *J Reprod Dev* **53**(5), 1059-68
877
- 878 Siddiqui, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Almamun, M., Beg, M.A., and Ginther, O.J.
879 (2009) Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to in vitro
880 fertilisation and embryo development in heifers. *Reproduction* **137**(4), 689-97
881
- 882 Soloff, M.S., and Fields, M.J. (1989) Changes in uterine oxytocin receptor concentrations
883 throughout the estrous cycle of the cow. *Biol Reprod* **40**(2), 283-7
884
- 885 Spencer, T.E., and Bazer, F.W. (1995) Temporal and spatial alterations in uterine
886 estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle
887 and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod* **53**(6), 1527-43
888
- 889 Vasconcelos, J.L., Sartori, R., Oliveira, H.N., Guenther, J.G., and Wiltbank, M.C. (2001)
890 Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy
891 rate. *Theriogenology* **56**(2), 307-14
892
893
894
895

896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908

For Review Only

909 **Figures and Tables**

910

911 Table 1. Exclusion criteria for assessment of accomplishment of premises. Number of cows that started synchronization, number of
 912 cows that matched premises, number of cows excluded per criteria and number of cows that were discarded. Values are shown per
 913 experiment and as a sum of all experiments.

Exp.	Started Synch	Matched Premises	Double OV	P4 on D-10 <1.0ng/mL	P4 on D-2 >3.0ng/mL	P4 on D-2 <2.0ng/mL	DF <8.0mm on D0	Early OV	Late OV	No OV	Fol./Lut Cyst	Total Discarded
1	23	14	0	1	0	0	4	1	0	2	1	9
2	37	23	1	4	2	3	1	1	0	2	0	14
3	23	12	1	4	1	1	0	0	1	2	1	11
Total	83	49	2	9	3	4	5	2	1	6	2	34

914 Table 2. Primer sequences of target and reference genes analyzed by qPCR.

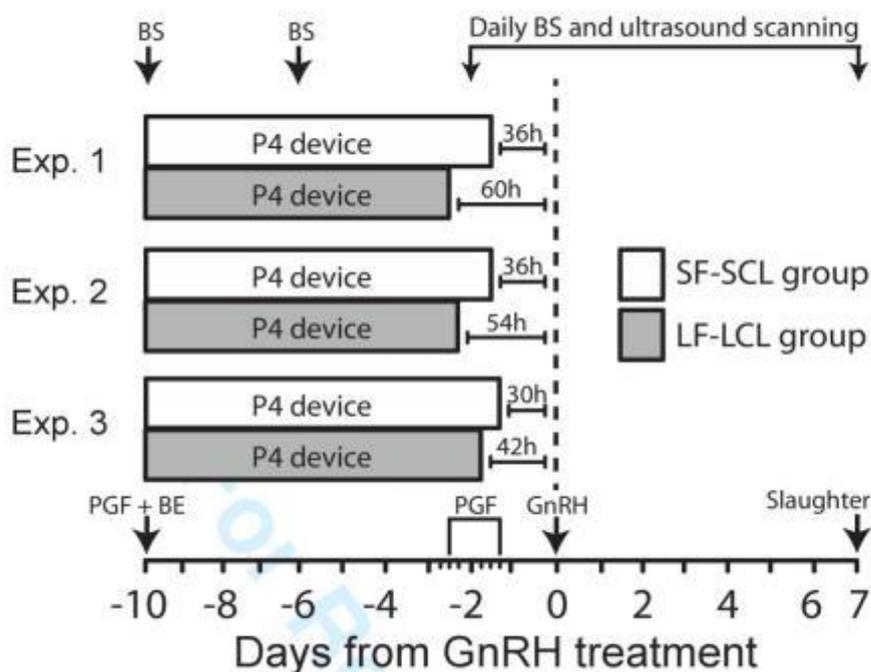
Target Gene	GenBank Number	Primers (Forward and Reverse) and Probes (for Taqman Assays)	Amplicon size
FLT-1	X94263	F GCCTGAAATCTACCAGATCATGTTG R TTCCACAAGCTCCACGAATCTT P ACAAAGACCCAAAAGAAA	58
KDR	X94298	F ACTGCAGTGATGGCGTCTT R CTTGTAGGCTCCAGTATCATTCCA P CTGTAAGATGCTCACAATTT	64
HSD3B7	NM_001034696	F GCTAGACAAAGTCTTCAGACCAGAA R CAGCAGGGTCAGCTTGATCTT P CTGGAGCTTAGAAAATT	66
CYP11A1	NC_007319	F CCCTTTCCACCAATCCAGCTA R GGACTGAGCGAGCAATGGA P ATGGCCCCACCCCTC	79
STAR	NM_174189.2	Assay Bt03213114	89
TUBB2B	NM_001046549.1	F TGTTCGCTCAGGTCCTTTTGG R CCCTTGCCCAAGTTGTTG P CCCGGACTGACCAAAA	79
OXTR	NM_174134.2	F AAGATGACCTTCATCGTCGTG R CGTGAAGAGCATGTAGATCCAG	177
PGR	NM_001205356.1	F GCCGCAGGTCTACCAGCCCTA R GTTATGCTGTCCTTCCATTGCCCTT	199
AKR1C4	NM_181027.2	F TGAGCTATTACTGGGTGTTGGTCACCC R ACAGCCCTAGAAGCAAGATGTTCTGGT	106
ANPEP	NM_001075144	F ATCCGGATGCTCTCGAATTC R TCTGATAGGCAAAGGTCTGCAA	82
ASGR2	NM_001075952	F GACTTCTGGAAGCCAAGCTG R ATGGGGAAGTGCTTCAGATG	88
CTGF	NM_174030	F CGTGTGCACCGCTAAAGATG R TCCGCTCTGGTACACAGTTCTT	61
LPL	NM_001075120	F CAGGTCGAAGTATCGGAATCCA R GAAAGTGCCTCCGTTAGGGTAAA	68
PI3	NM_001080353.1	F GGCAGCTATCGTAAGAGGTGCTCC R ACAGGATGTTGACCATTGATTGGGCT	96
NUPR1	NM_001114515.1	F GCAGCAAGAGAGAAGCCGCCAT R GGCCTCATCTCCAGTCTGTCTCA	68
ESR1	XM_002690343.1	F CAGGCACATGAGCAACAAAG R TCCAGCAGCAGGTCGTAGAG	82
ESR2	NM_174051.3	F TCACGTCAGGCACGCCAGTAAC R CACCAGGTTGCGCTCAGACCC	155
STAP2	NM_001034246.1	F TGTGCTCGAGATGCCGTCGT R ATCGGCGTCCCATTGAGCGT	162
PPIA	BF230516.1	F GCCATGGAGCGCTTTGG R CCACAGTCAGCAATGGTGATCT	65

915

916

917

918



919

920 Fig. 1. Schematic of the hormonal manipulation protocols used in Experiments 1, 2 and 3
 921 (Exp. 1, Exp. 2 and Exp. 3, respectively). BS = blood sampling; P4 device = P4-releasing
 922 device containing 1g of progesterone (Sincrogest; Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil); PGF
 923 = injection of 0.5 mg of sodium cloprostenol (Sincrocio; Ourofino); BE = injection of 2 mg
 924 of estradiol benzoate (Sincrodiol; Ourofino); GnRH = injection of 1 μ g of buserelin
 925 acetate (Sincroforte; Ourofino); Slaughter = endpoint for endometrial and CL tissue
 926 collection.

927

928

929

930

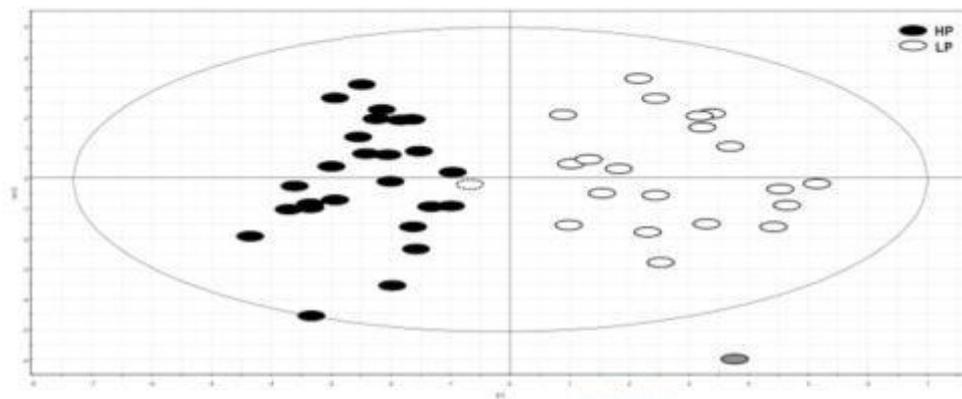
931

932

933

934

935
936

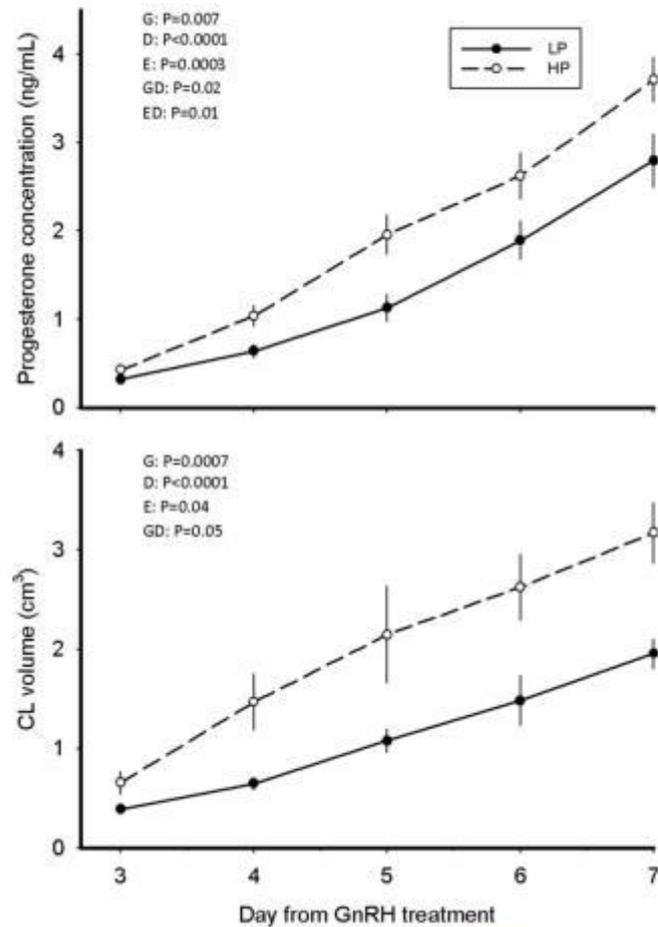


937

938 Fig. 2. Multivariate model by orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) of animal distribution
939 according to ovarian and endocrine measurements – Classification per group. Forty-seven cows identified by LF-LCL group (black
940 ellipses) and SF-SCL group (open ellipses). One cow manipulated to present an SF-SCL group profile that showed an LF-LCL group
941 profile is identified with a dashed line ellipse. Another SF-SCL group cow was detected as an outlier and is identified by a gray ellipse.

942
943
944
945
946
947
948
949
950

Reproduction, Fertility and Development



951
 952

953 Fig. 3. Over time measurements of (upper graph) CL volume and (lower graph) P4
 954 concentrations of cows ovulating within the first 48 hours post-GnRH for cows in the low
 955 post-ovulatory P4 group (SF-SCL) and in the high post-ovulatory P4 group (LF-LCL). Effects
 956 of group (G), day (D), experiment (E), group by day (GD) and experiment by day (ED),
 957 group by experiment (GE) and group by day by experiment interactions were estimated.
 958

959

960

961

962 Table 3. Proportion of cows that ovulated the dominant follicle between 0 and 48 h (OV 0-
 963 48h), and between 24 and 48 h (OV 24-48h) after the GnRH injection in cows manipulated
 964 to ovulate large (LF-LCL group) or small (SF-SCL group) follicles in Experiments 1, 2, 3.

	OV 0-48h (synchronized cows)	OV 24-48h/synchronized cows
Experiment 1		
SF-SCL group	53.8% (7/13)	100% (7/7) ^a
LF-LCL group	70.0% (7/10)	42.9% (3/7) ^b
Total	60.9% (14/23)	71.4% (10/14) ^B
Experiment 2		
SF-SCL group	58.8% (10/17)	77.0% (7/10) ^a
LF-LCL group	65% (13/20)	23.1% (3/13) ^b
Total	62.2% (23/37)	43.5% (10/23) ^A
Experiment 3		
SF-SCL group	54.5% (6/11)	100% (6/6)
LF-LCL group	50% (6/12)	83.3% (5/6)
Total	52.2% (12/23)	91.7% (11/12) ^B

965 ^{a,b} Means within a column and in each Experiment with different superscripts are different
 966 between groups (P < 0.05).

967 ^{A,B} Means within a column with different superscripts are different between experiments (P <
 968 0.05).

969
 970
 971
 972
 973
 974
 975
 976
 977
 978
 979
 980
 981
 982
 983
 984
 985
 986
 987
 988
 989
 990
 991
 992
 993
 994
 995
 996

997 Table 4. Follicle, CL and P4 measurements of cows ovulating within the first 48 hours post-
 998 GnRH. Values are expressed as means \pm standard error of the means.

End point	Group		P < F
	SF-SCL	LF-LCL	
Follicle diameter (mm):			
D-2	8.4 \pm 0.33	11.02 \pm 0.32	<0.0001
D0	10.92 \pm 0.39	13.36 \pm 0.30	<0.0001
Pre-ovulatory follicle	11.11 \pm 0.33	13.36 \pm 0.29	<0.0001
Plasma Estradiol concentrations (pg/mL): ^a			
D-2	0.30 \pm 0.13	1.49 \pm 0.39	0.03
D-1	0.50 \pm 0.13	2.34 \pm 0.47	0.003
D0	1.27 \pm 0.20	2.94 \pm 0.28	0.0007
CL: ^b			
Weight (g)	2.08 \pm 0.15	3.10 \pm 0.37	0.008
Volume (cm ³)	1.89 \pm 0.16	2.72 \pm 0.32	0.03
Plasma progesterone concentrations (ng/mL):			
D7	2.62 \pm 0.26	3.71 \pm 0.25	0.01
D3 to D7 ^c	6.16 \pm 0.71	8.73 \pm 0.62	0.02
Difference between D7 and D3 ^d	2.53 \pm 0.28	3.33 \pm 0.23	0.05
Intervals (days):			
D0 to beginning of progressive P4 increase	3.47 \pm 0.18	2.63 \pm 0.22	0.002
D0 to day of P4 >1ng/mL	5.26 \pm 0.32	4.38 \pm 0.24	0.04

999 D0 is the day of GnRH treatment to induce ovulation

1000 ^a Estradiol concentrations were assayed in a subset of animals (n=7/group)

1001 ^b Measured post-mortem on D7

1002 ^c Sum of P4 concentration of D3+D4+D5+D6+D7

1003 ^d Subtraction of P4 concentration on D3 from P4 concentration on D7

1004

1005

1006

1007

1008

1009

1010

1011

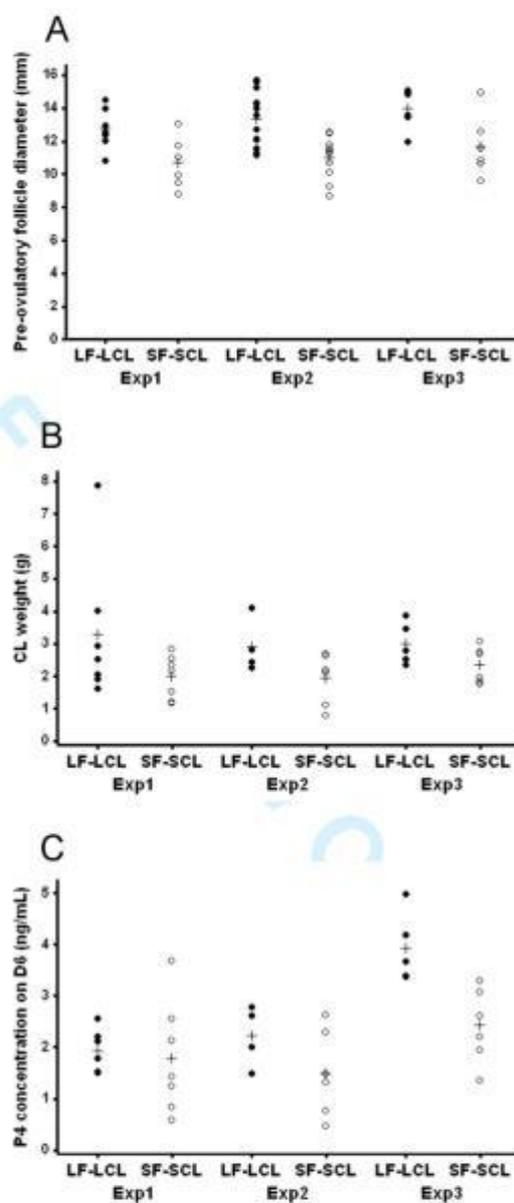
1012

1013

1014

1015

1016



1017
 1018 Fig. 4. Comparison of data dispersion across experiments by individual value plots. Values
 1019 of POF diameter (A), CL weight (B) and P4 concentrations on D6 (C) of each individual
 1020 are plotted within group per experiment. Closed and open circles indicate LF-LCL and SF-SCL
 1021 cows, respectively, whereas a "+" sign indicates the group mean.

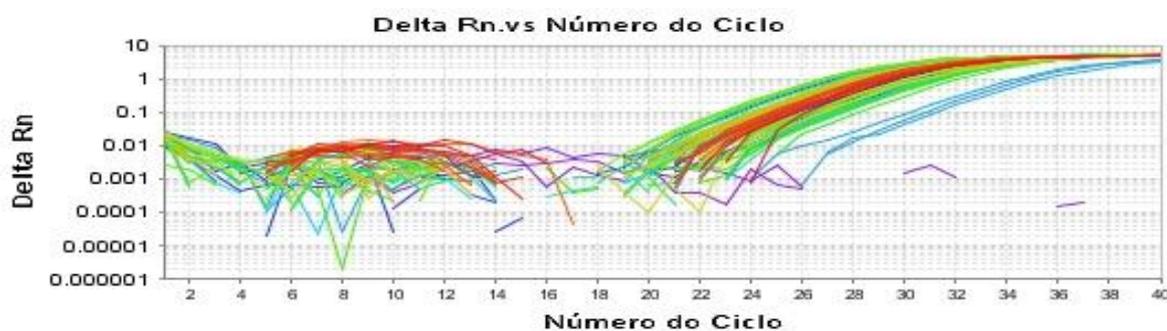
1022 Table 5. Luteal and endometrial relative gene expression. Mean \pm standard error of the
 1023 relative fold difference expression values of the CL for angiogenic factors VEGF, FLT1 and
 1024 KDR, and steroidogenic enzymes STAR, HSD3B1 and P450scc (CYP11A1), and selected
 1025 endometrial target genes; LF-LCL (N=9) and SF-SCL (N=11 for luteal and 12 for
 1026 endometrial tissue) groups; Statistical significance threshold = 0.05.
 1027
 1028

Tissue	Gene	Relative Fold Difference	P < F
Endometrium	AKR1C4	2.74	0.005
	ANPEP	1.41	0.36
	ASGR2	1.33	0.27
	CTGF	0.87	0.67
	ESR1	1.09	0.57
	ESR2	1.58	0.01
	LPL	1.78	0.04
	NUPR1	1.38	0.09
	OXTR	0.17	0.008
	PGR	0.83	0.37
	PI3	0.60	0.03
	STAP2	0.93	0.69
	Corpus Luteum	CYP11A1	0.93
FLT1		1.05	0.81
HSD3B1		0.71	0.49
KDR		1.01	0.97
STAR		0.95	0.76
VEGF		1.1	0.66

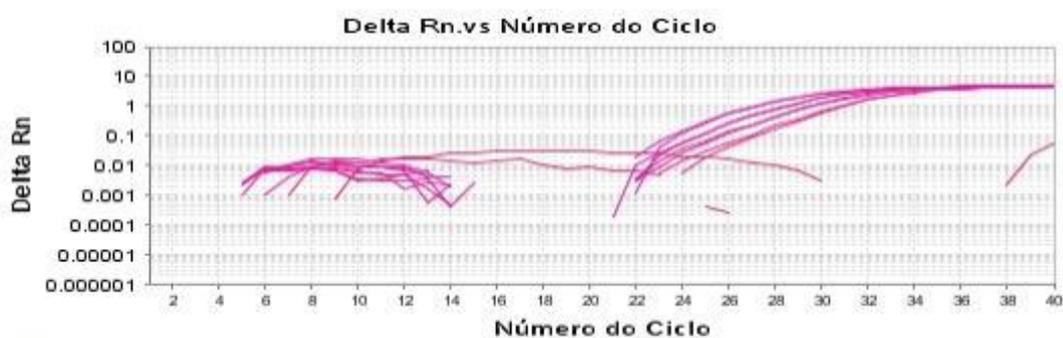
1029
 1030
 1031
 1032

APÊNDICE B

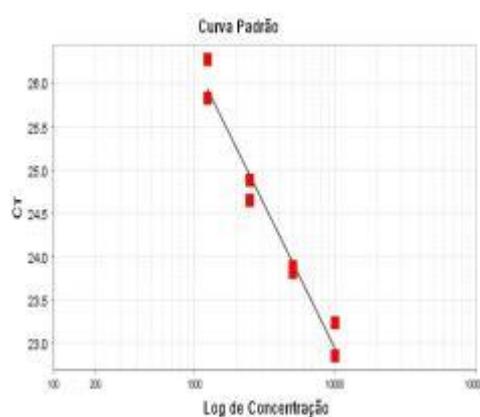
A)



B)



C)



D)

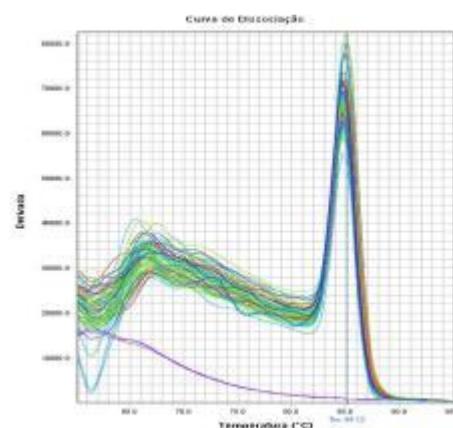
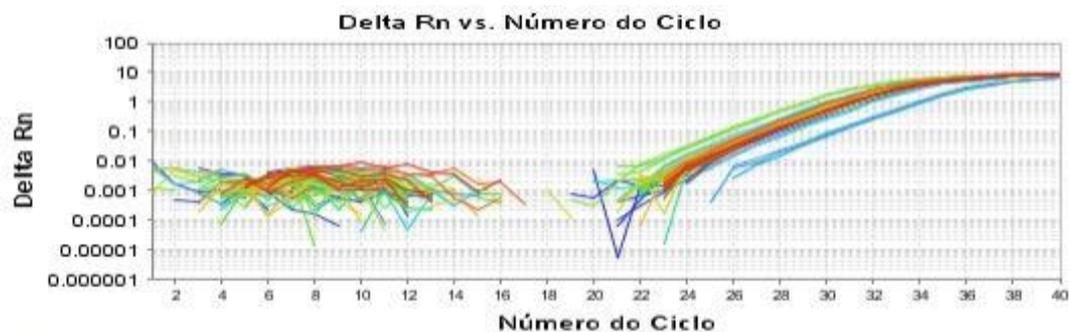
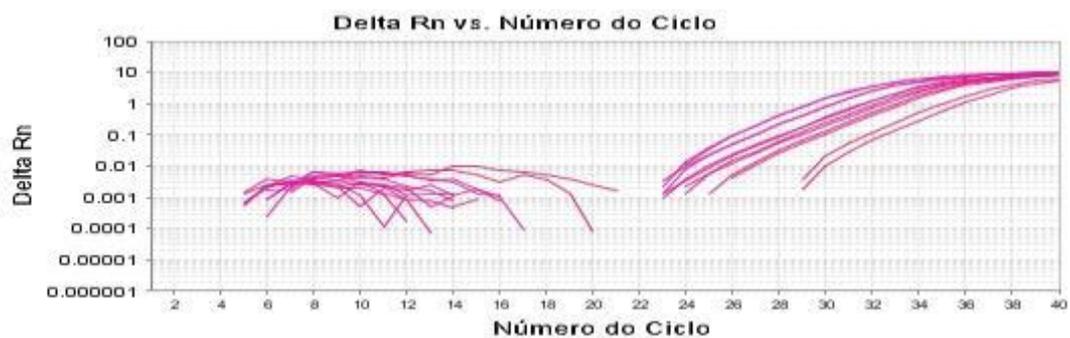


Figura 4 -Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PLA2G10 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão

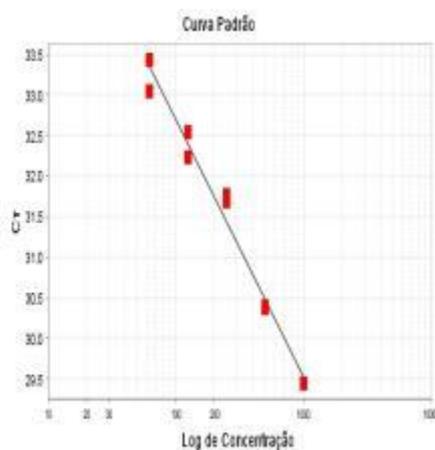
A)



B)



C)



D)

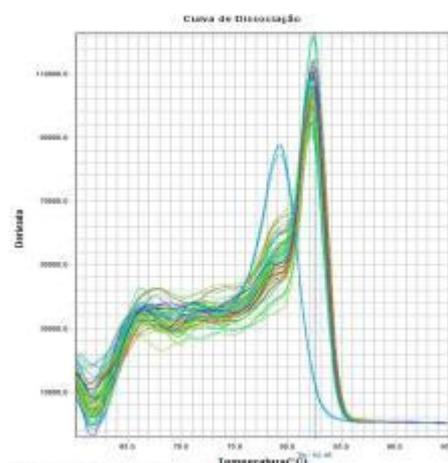
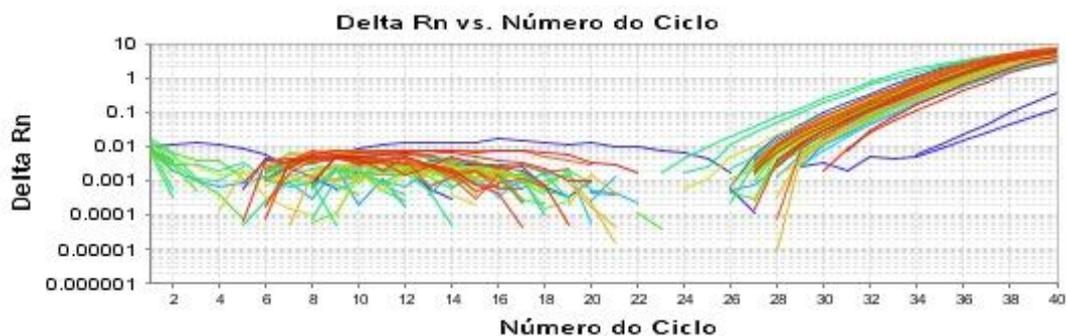
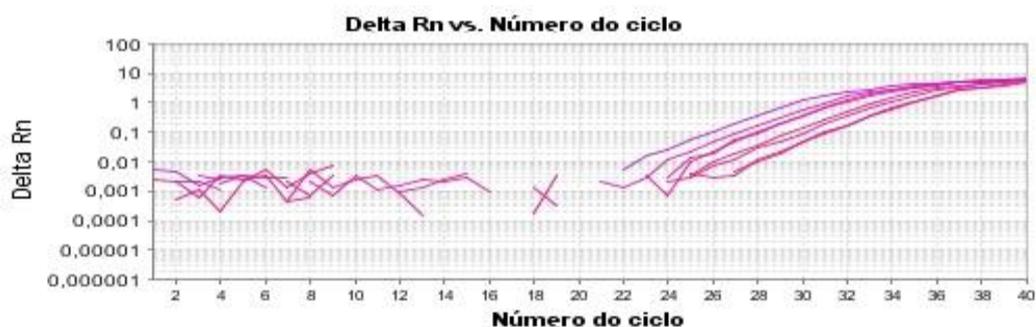


Figura 5 -Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica PTGS2 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão

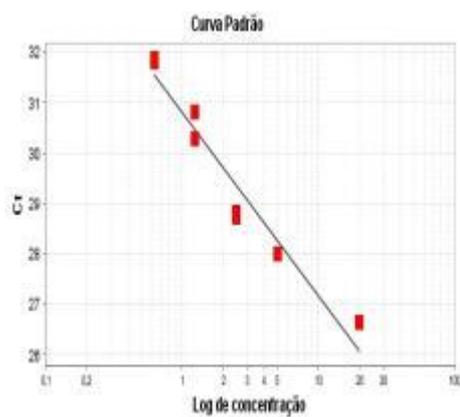
A)



B)



C)



D)

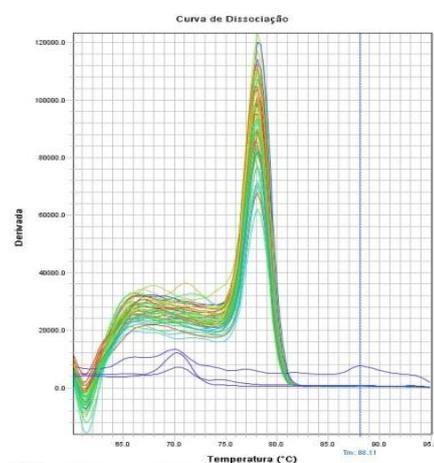
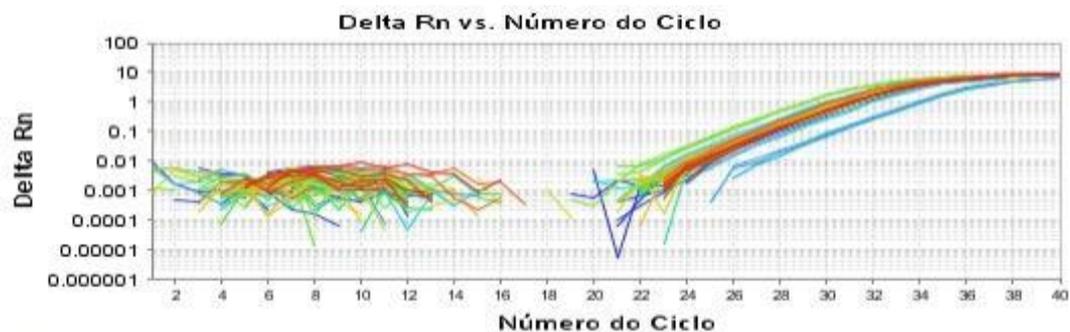
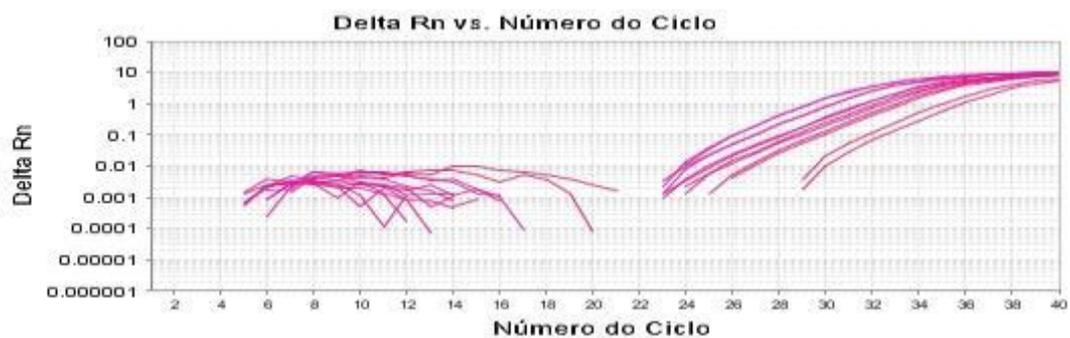


Figura 6 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica PTGS1 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão

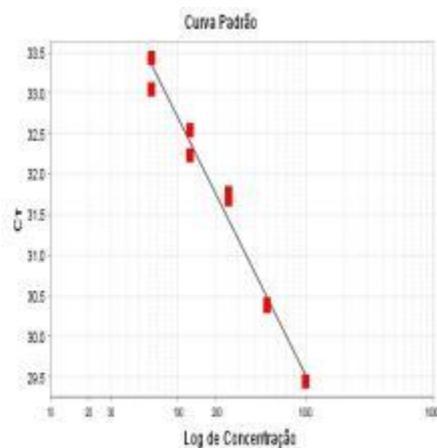
A)



B)



C)



D)

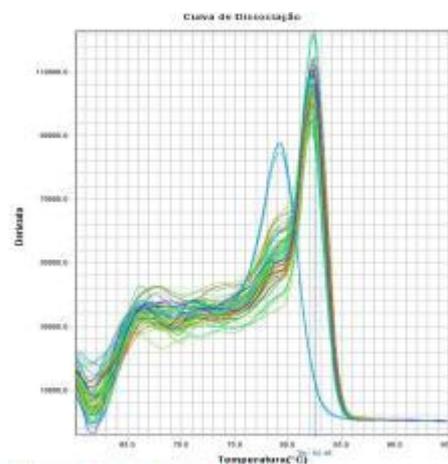
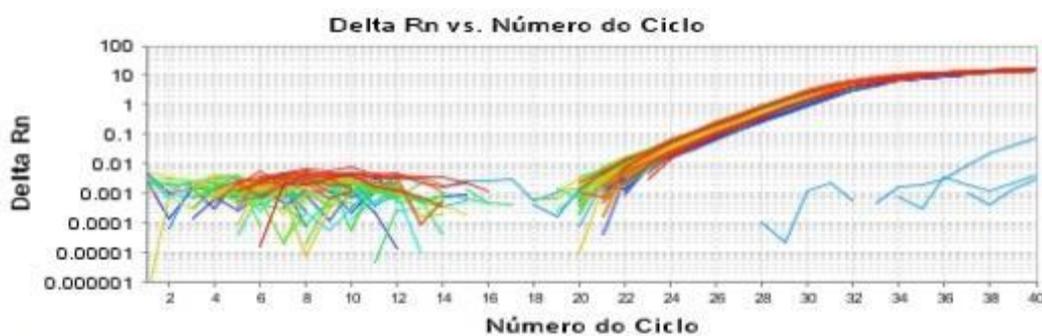
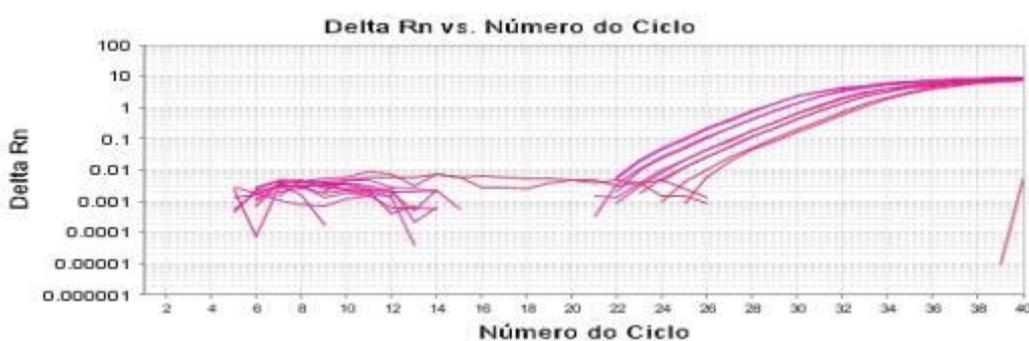


Figura 7 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PTGES1 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão

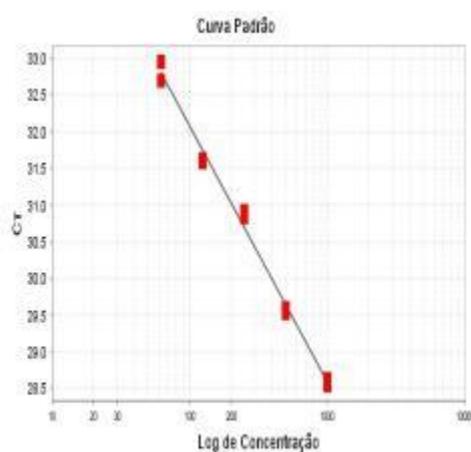
A)



B)



C)



D)

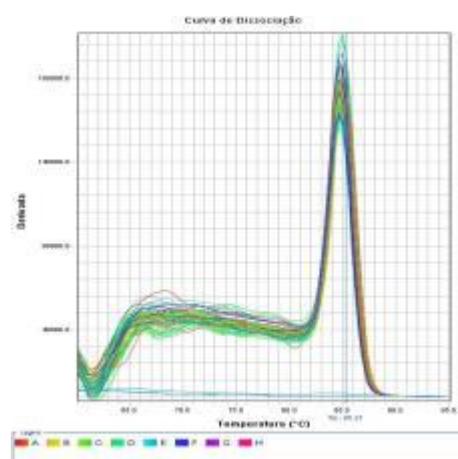
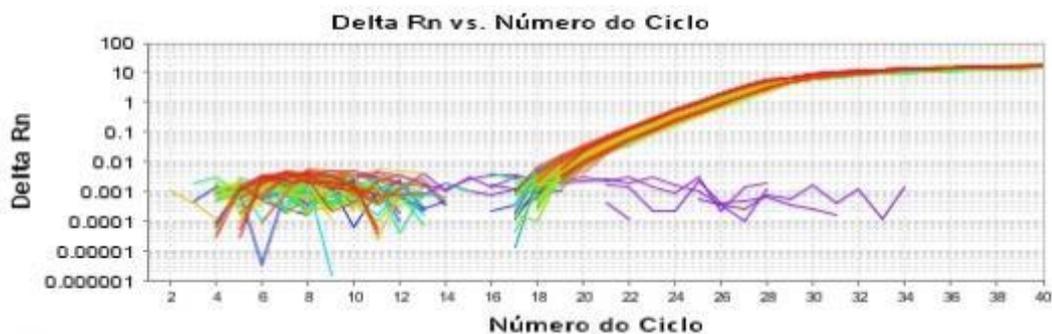
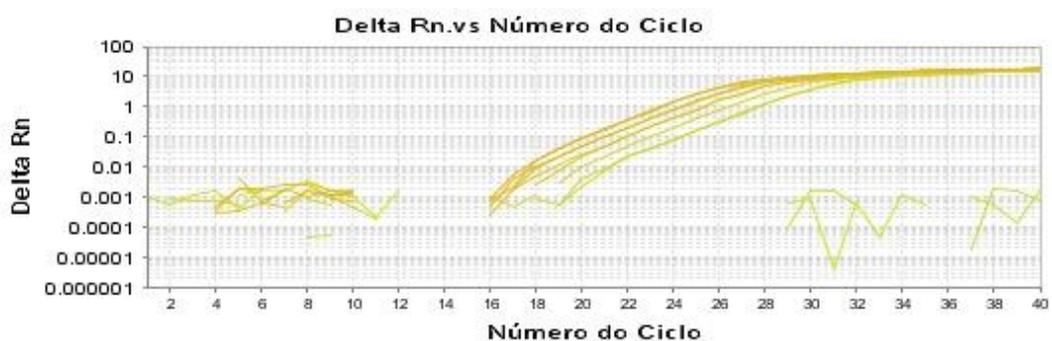


Figura 8 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PTGES2 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão

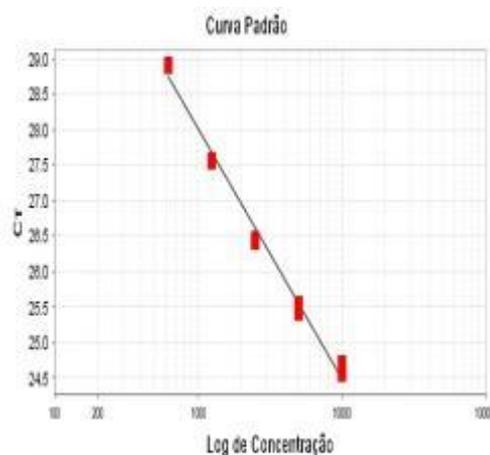
A)



B)



C)



D)

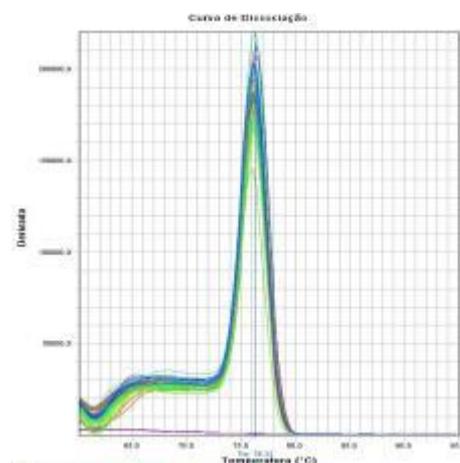
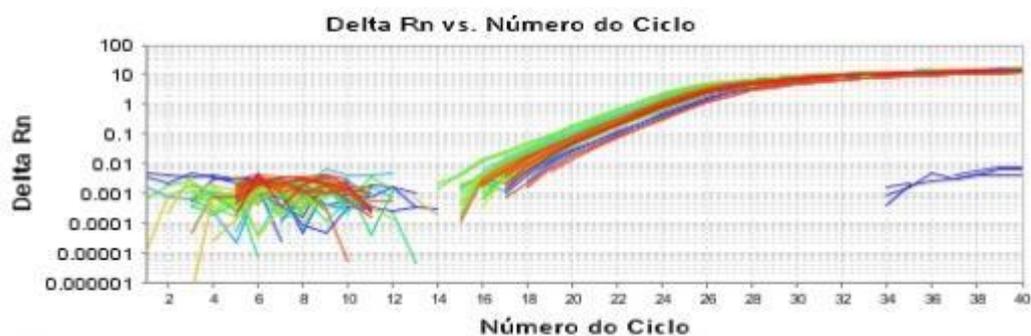
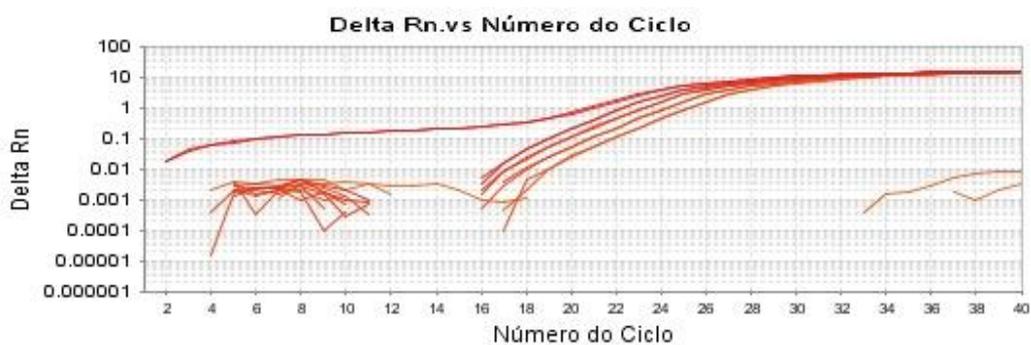


Figura 9 -Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PTGES3 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão

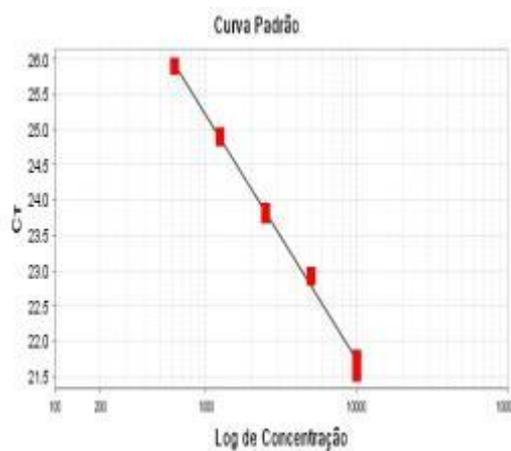
A)



B)



C)



D)

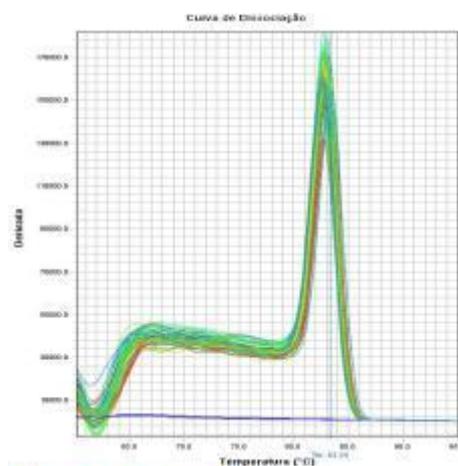
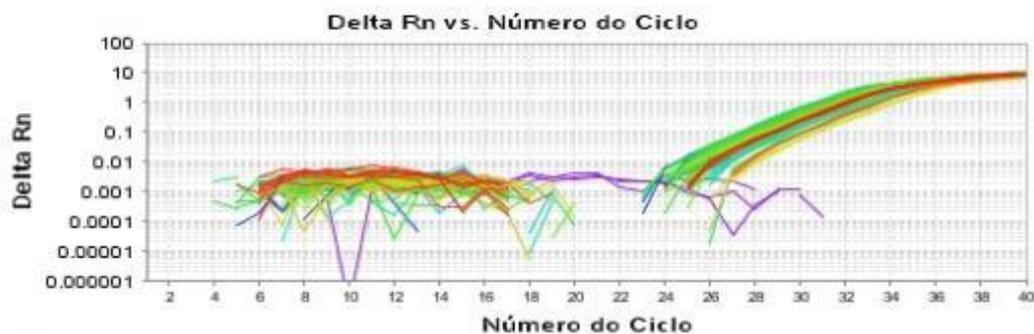
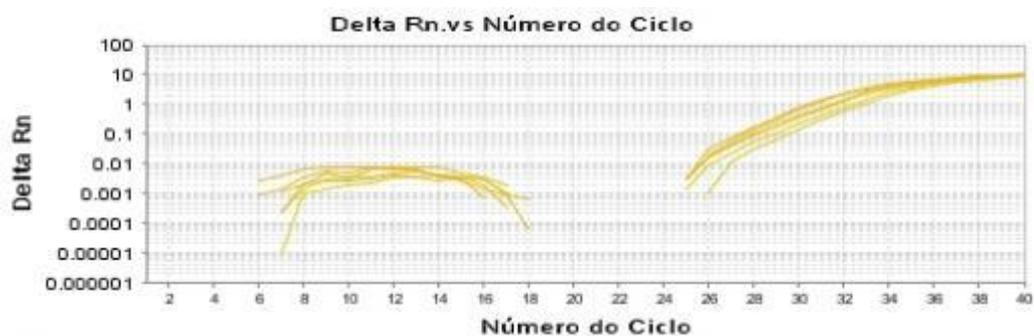


Figura 10 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a AKR1B1 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

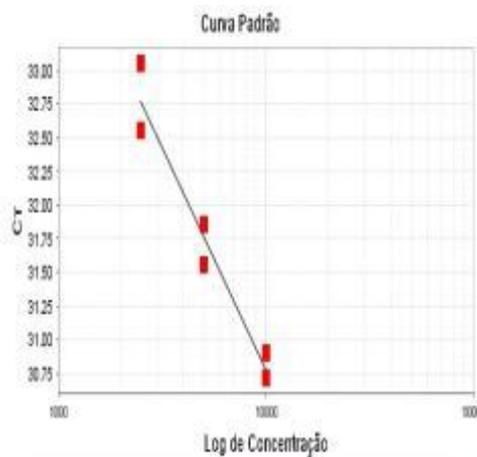
A)



B)



C)



D)

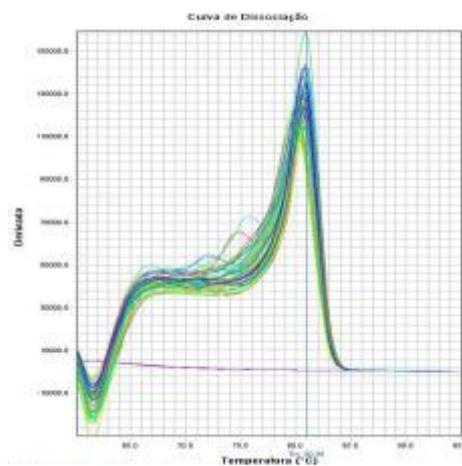
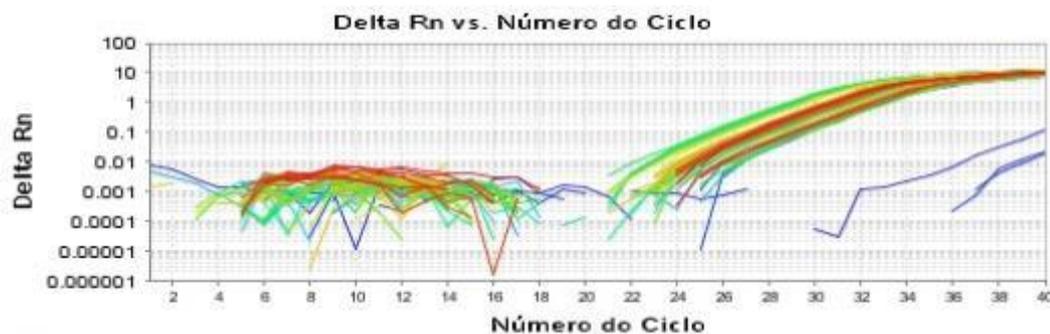
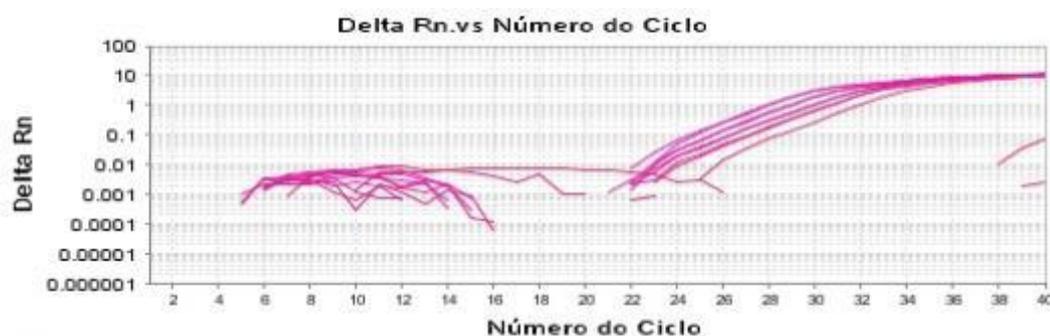


Figura 11 -Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a AKR1C3 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

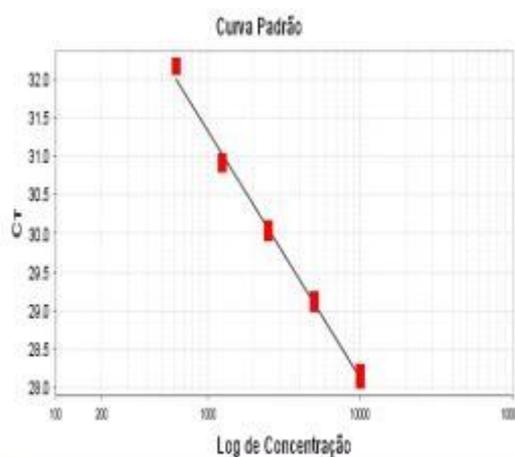
A)



B)



C)



D)

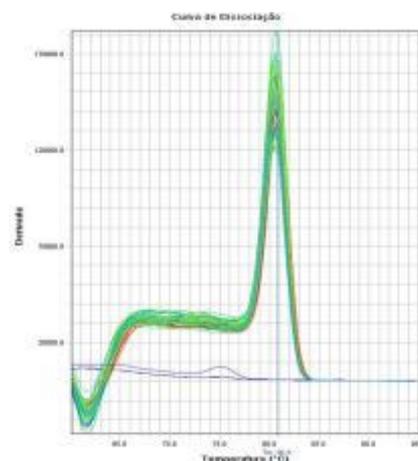
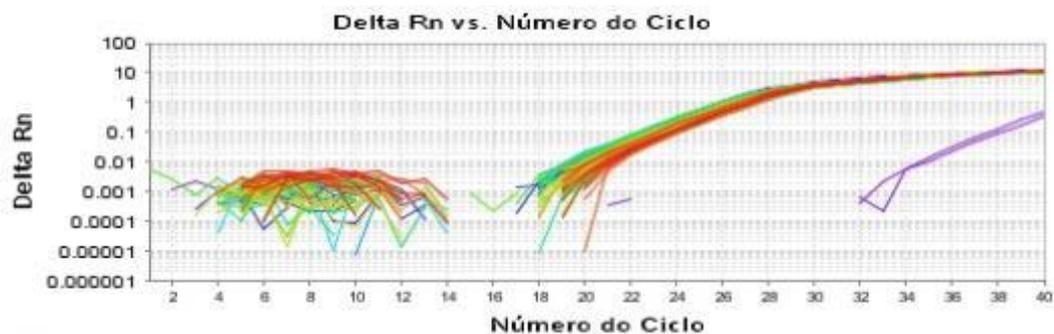
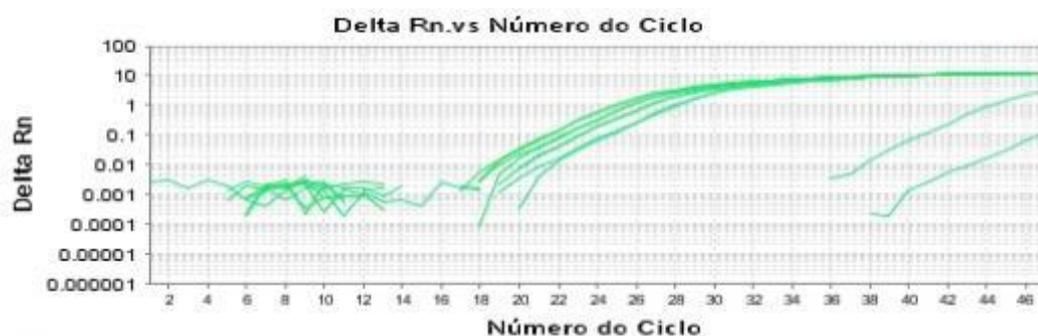


Figura 12 -Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a AKR1C4 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

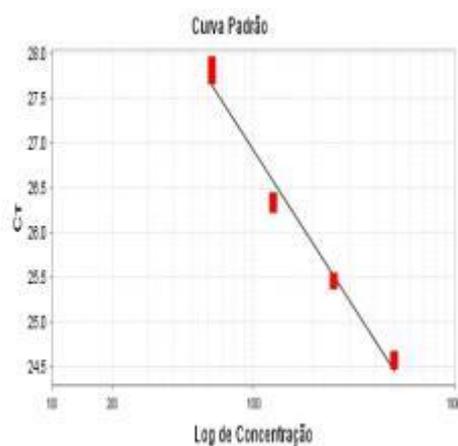
A)



B)



C)



D)

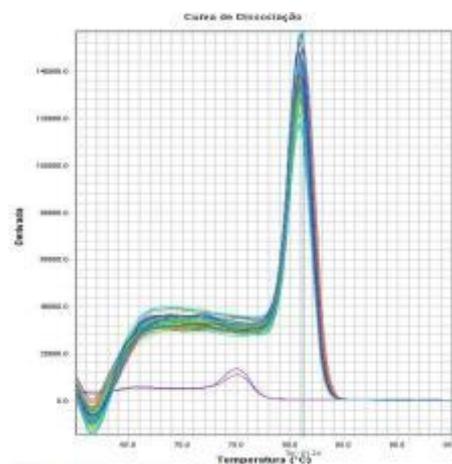
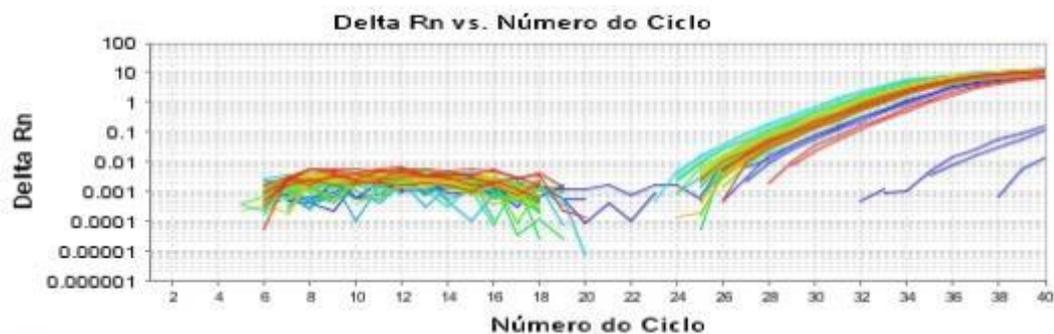
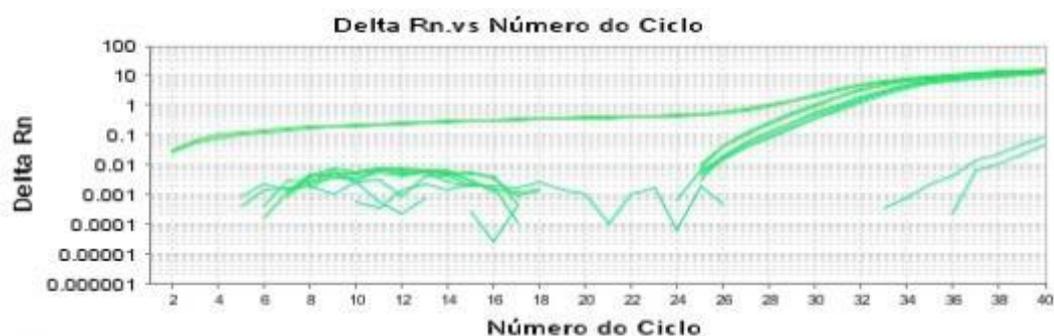


Figura 13 -Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a HPGD no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

A)



B)



C)

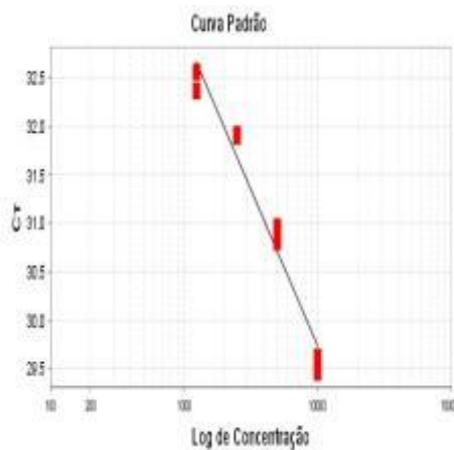
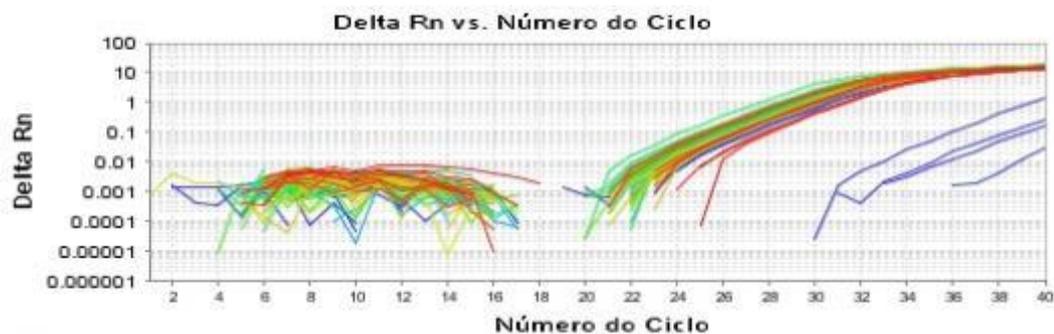
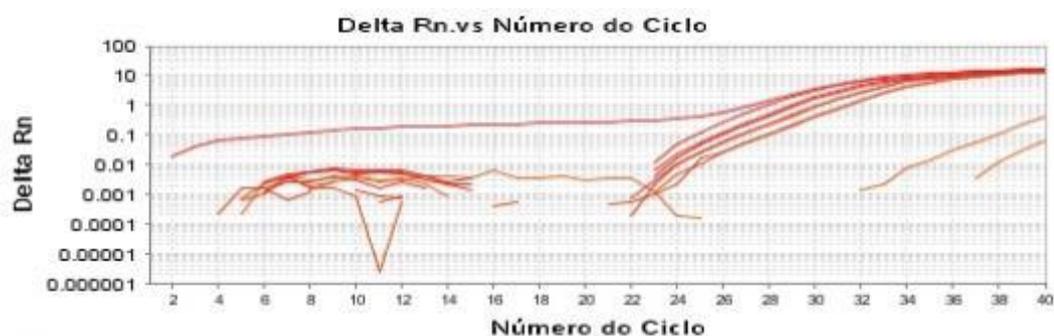


Figura 14 -Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PTGER2 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

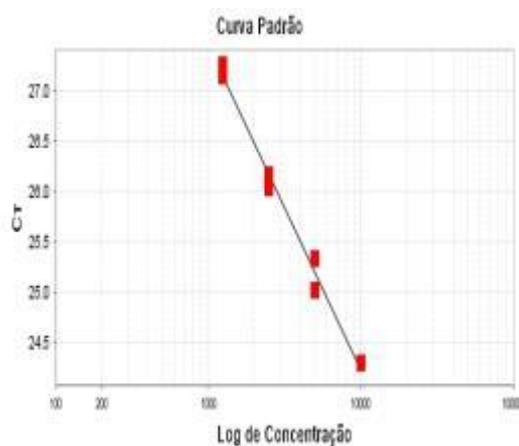
A)



B)



C)



D)

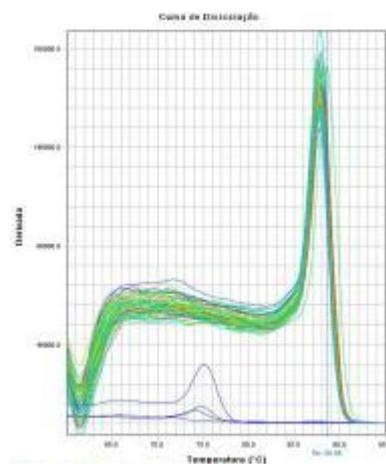
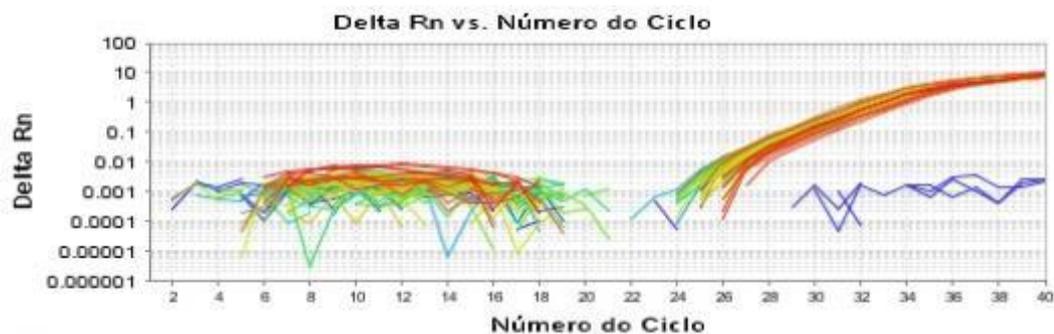
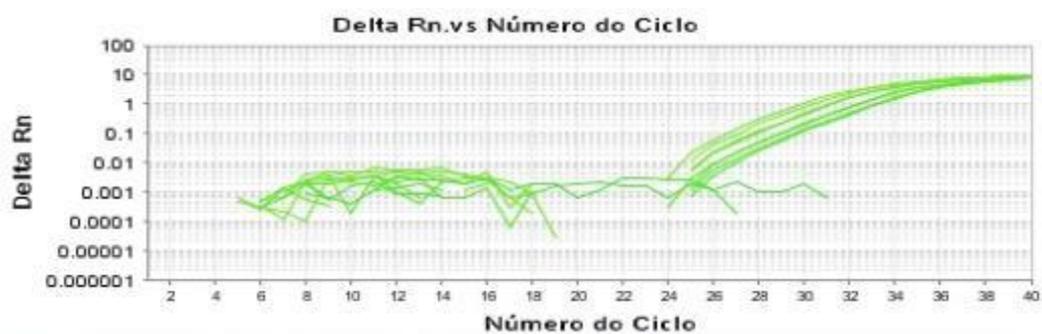


Figura 15 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PTGER4 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

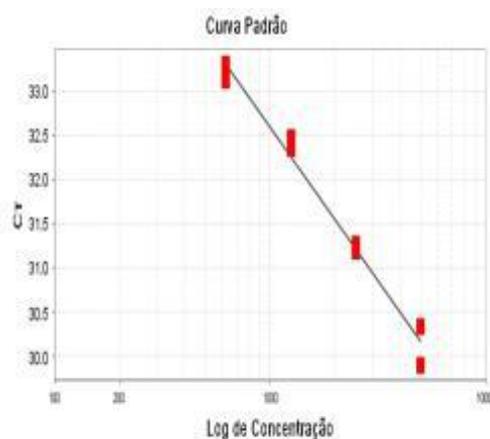
A)



B)



C)



D)

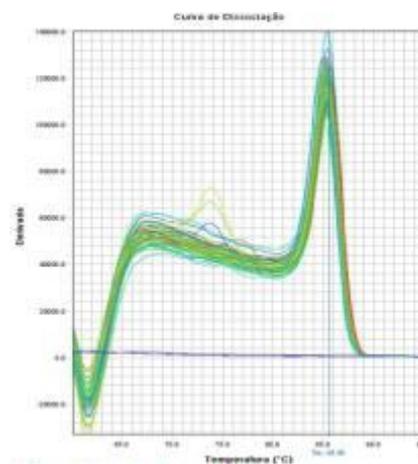
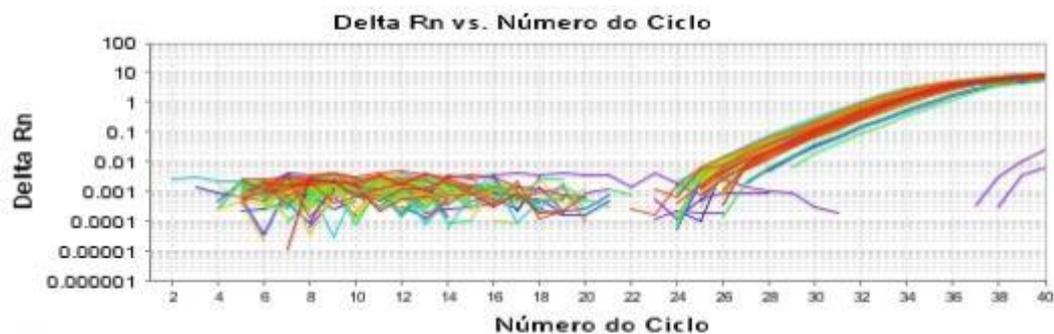
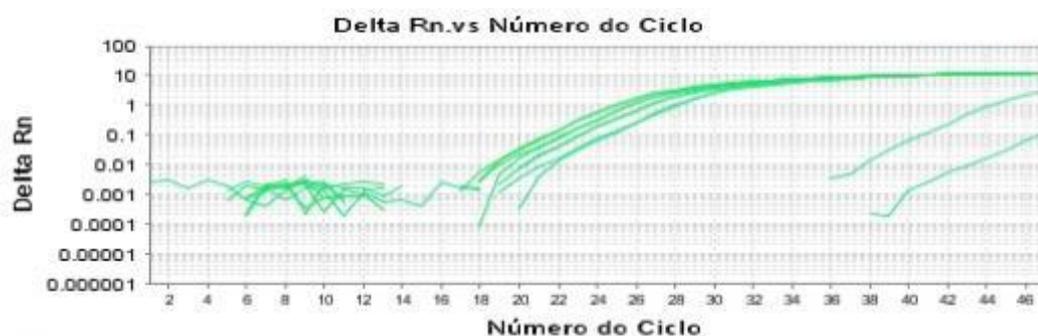


Figura 16 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a TBXAR2 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

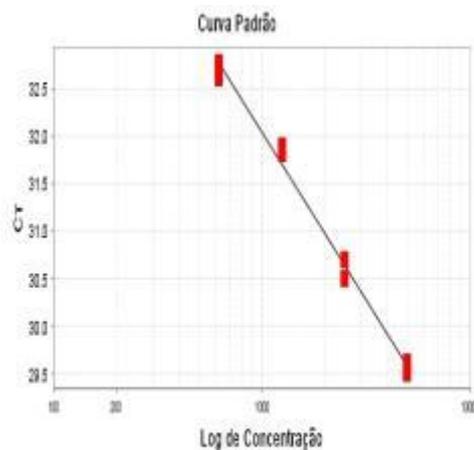
A)



B)



C)



D)

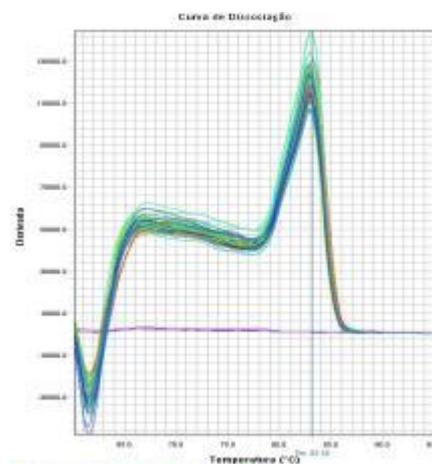
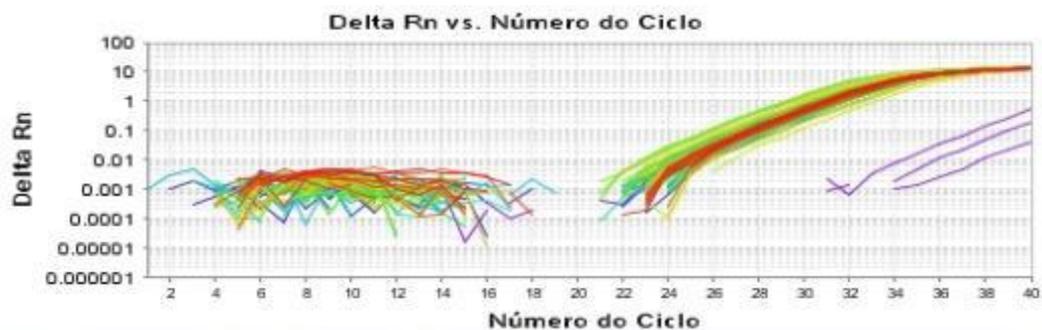
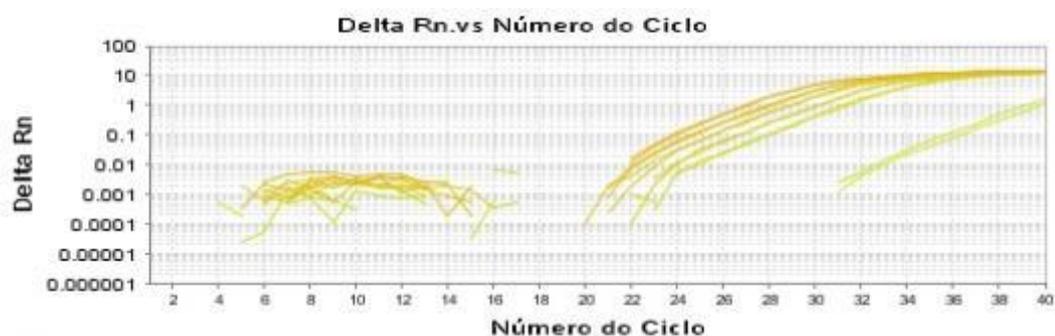


Figura 17 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a ALOX15B no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

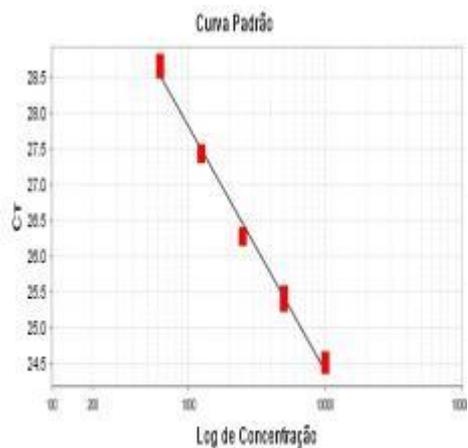
A)



B)



C)



D)

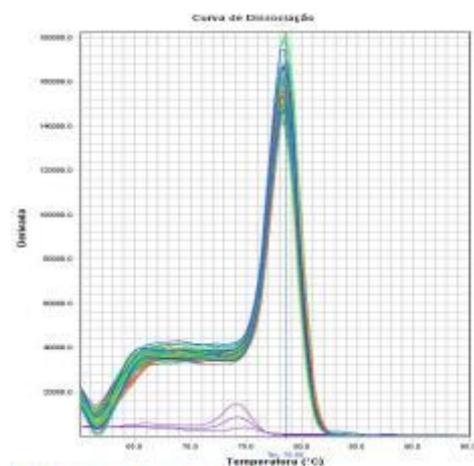
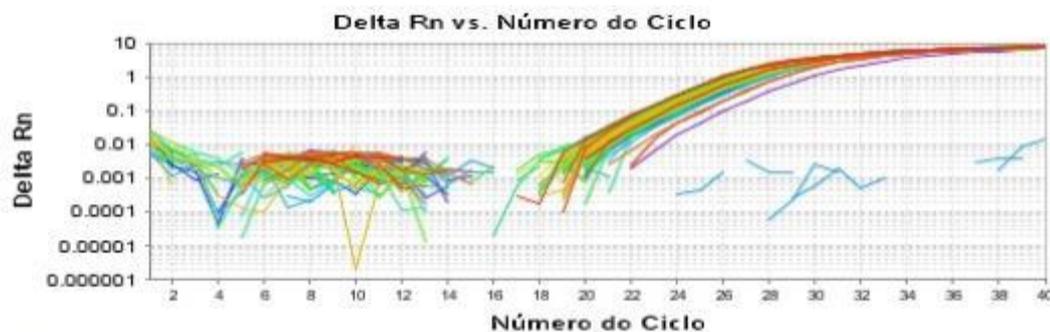
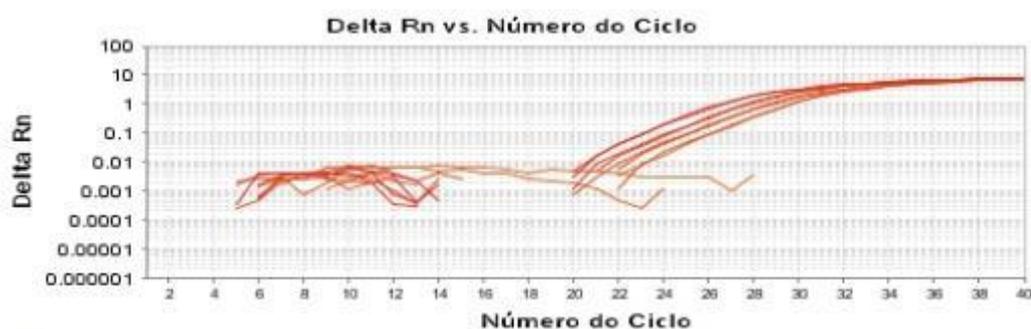


Figura 18 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a ALOX12 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

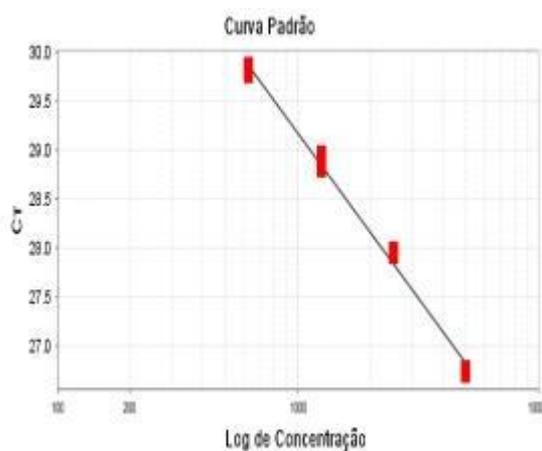
A)



B)



C)



D)

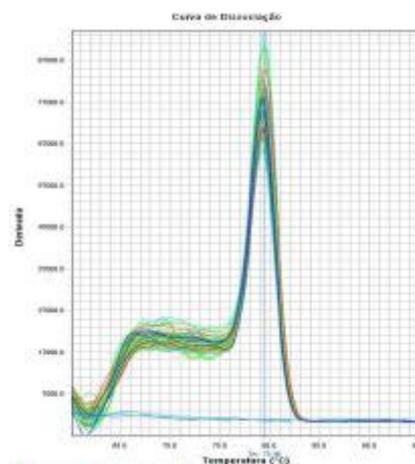
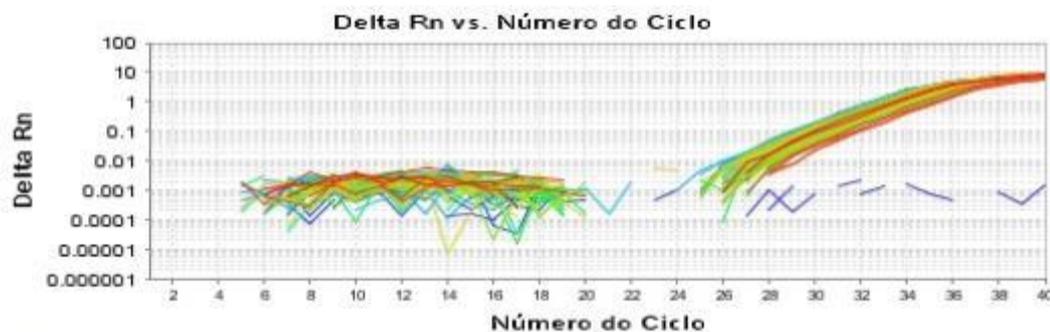
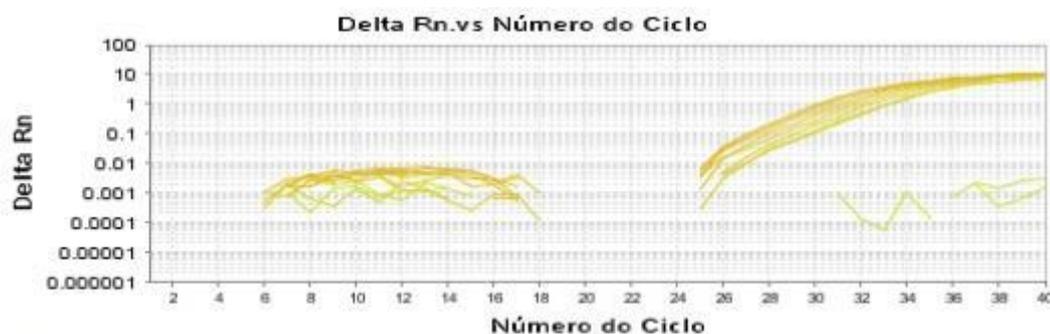


Figura 19 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PGDS no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

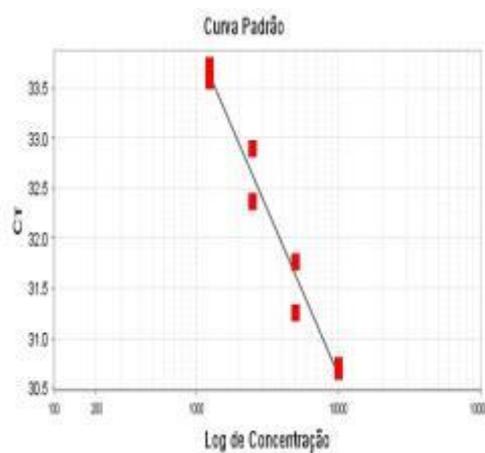
A)



B)



C)



D)

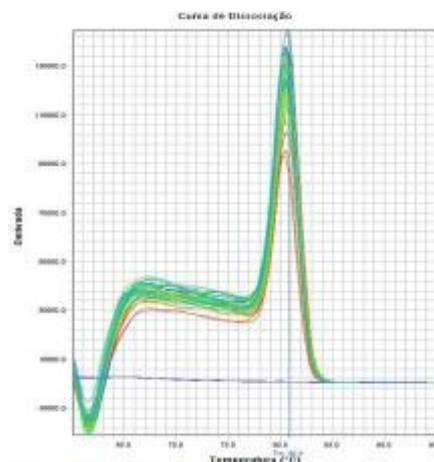
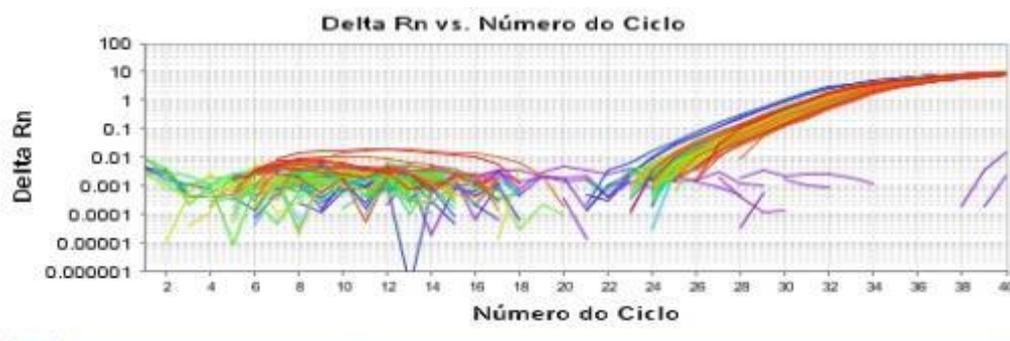
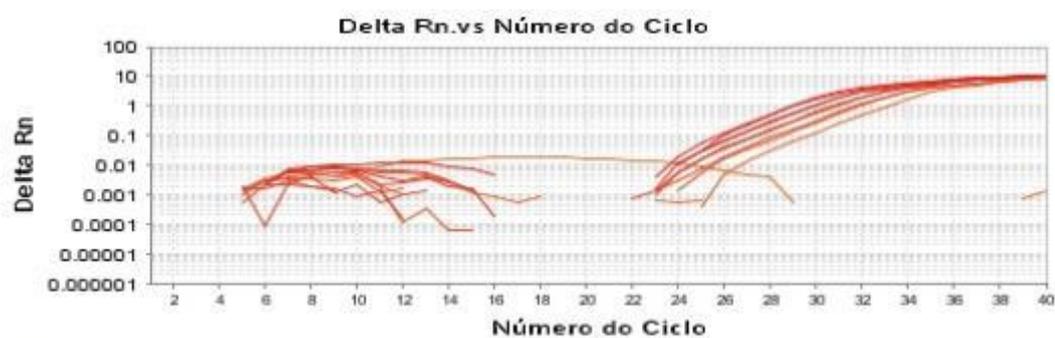


Figura 20 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PGDR no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

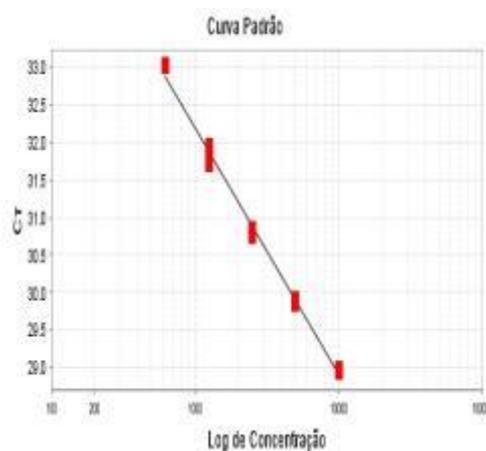
A)



B)



C)



D)

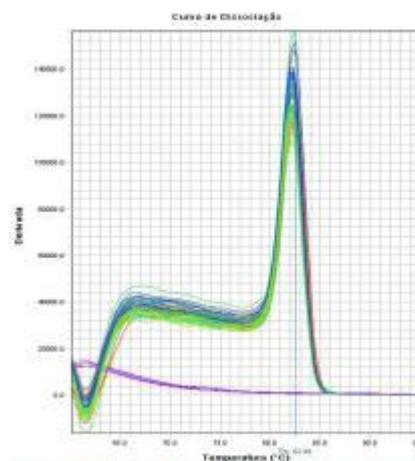
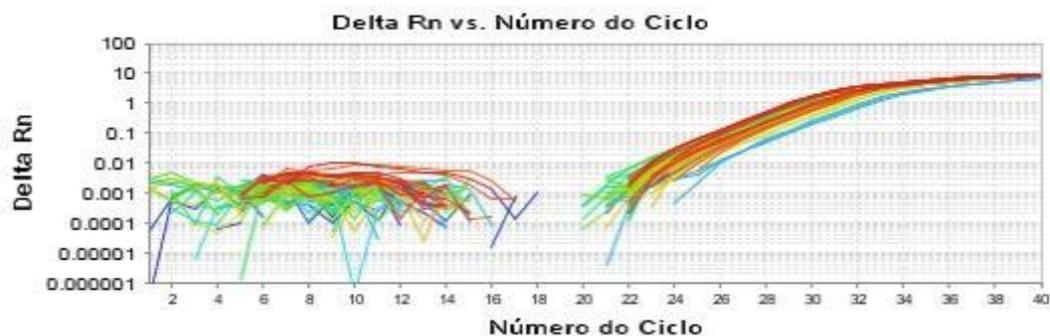
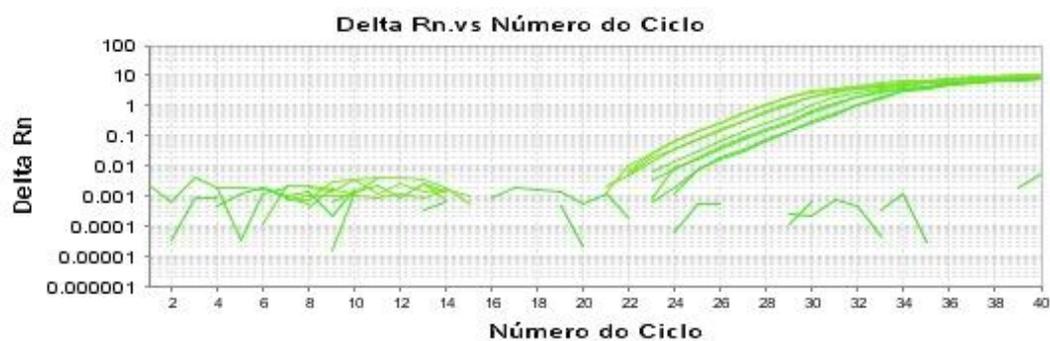


Figura 21 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a SLCO2A1 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

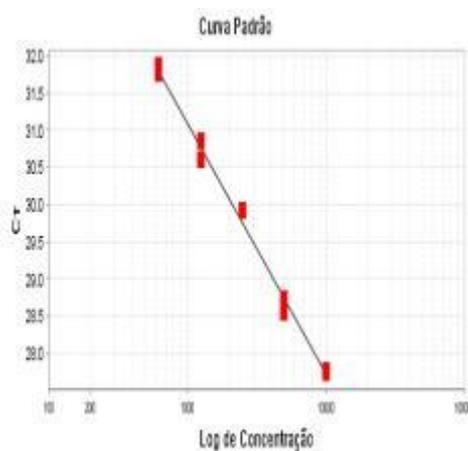
A)



B)



B)



C)

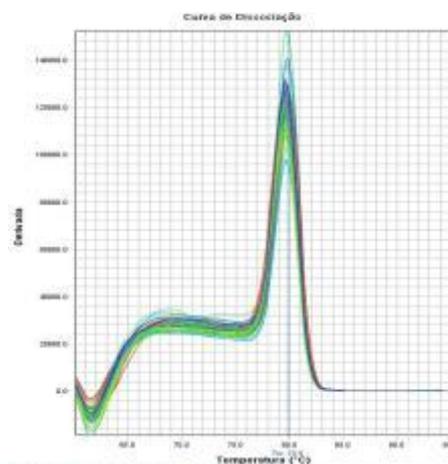
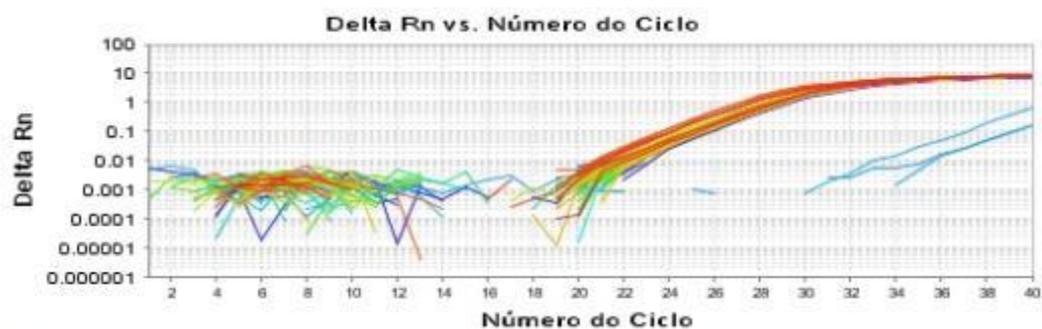
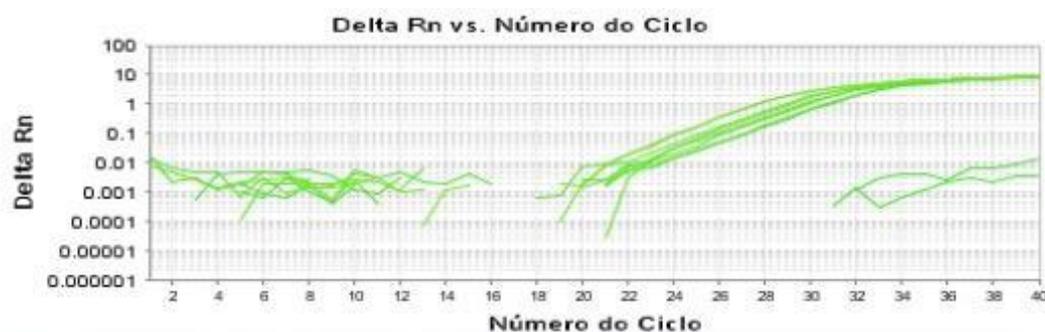


Figura 22 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a CBR1 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

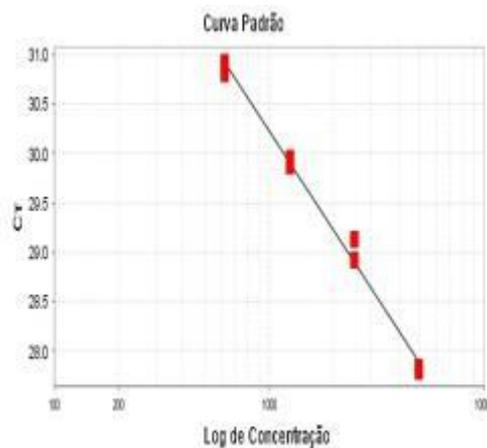
A)



B)



C)



D)

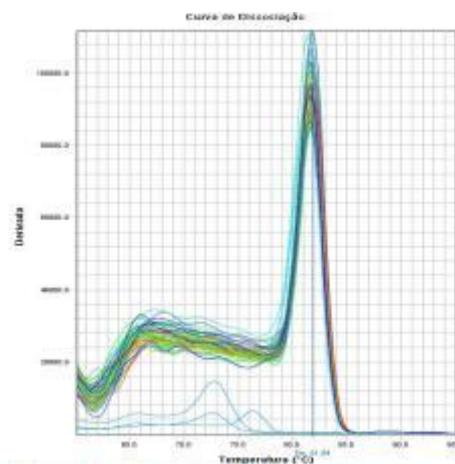
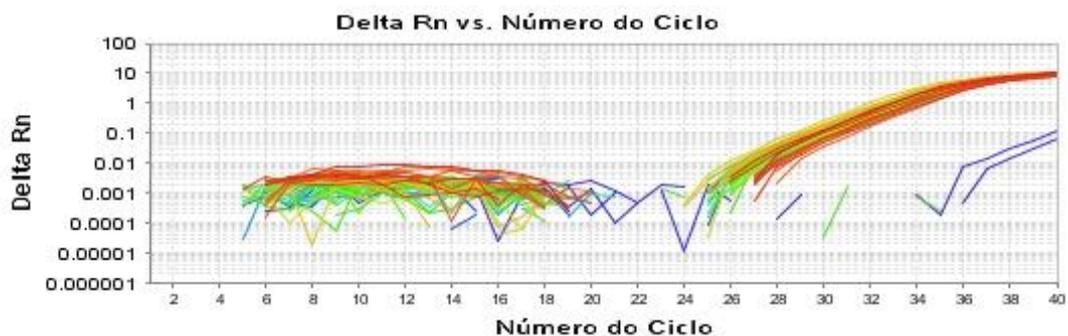
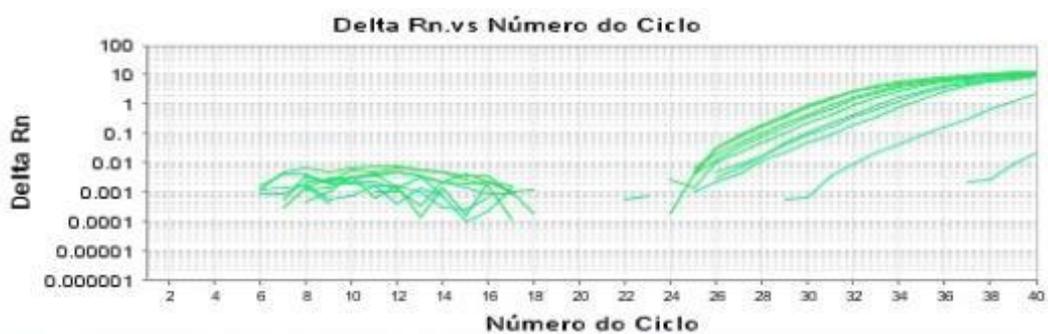


Figura 23 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a PTGIS no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

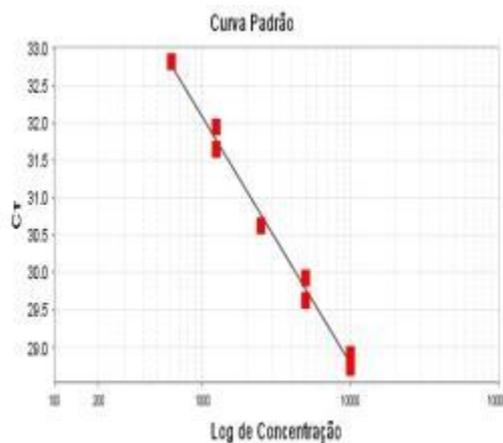
A)



B)



C)



D)

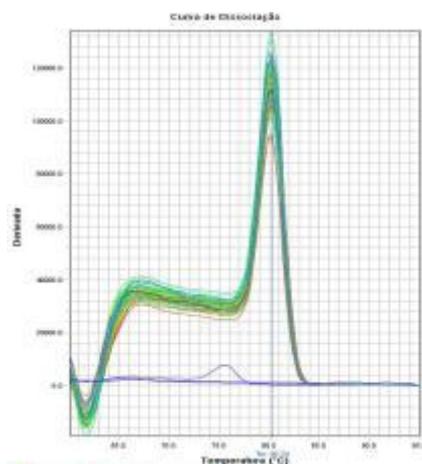
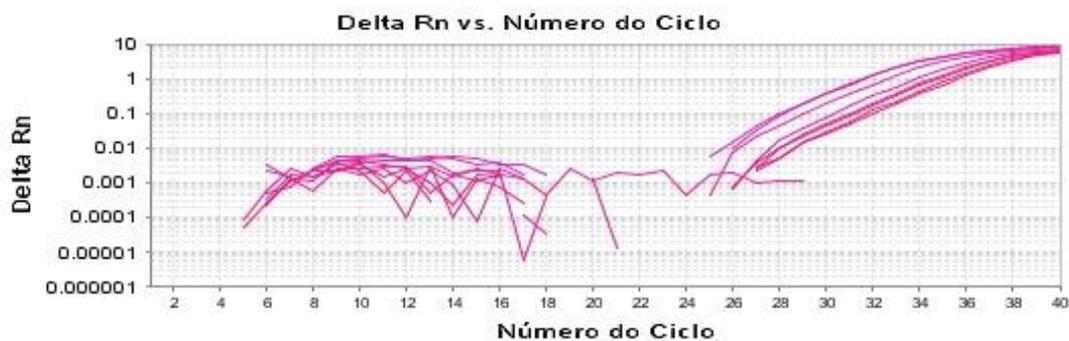
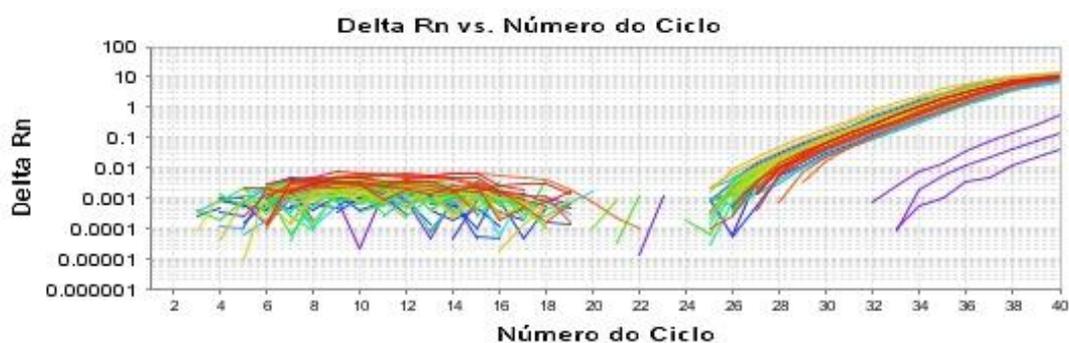


Figura 24 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a TBXAS1 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão;

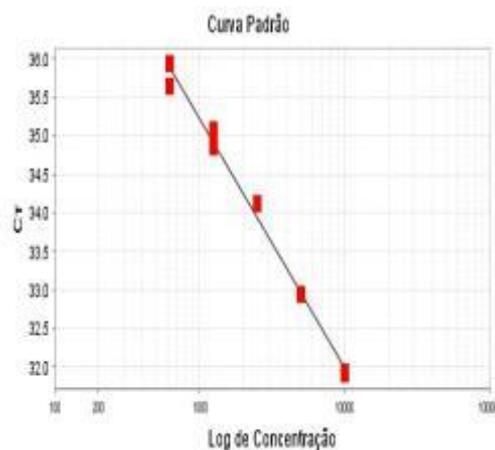
A)



B)



C)



D)

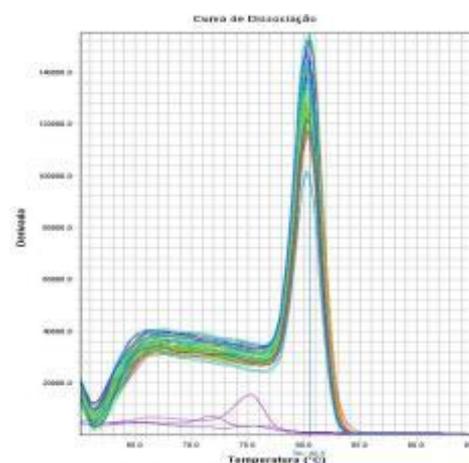


Figura 25 - Validação da técnica de PCR em Tempo Real para a mensuração da abundância de transcritos do gene que codifica a ALOX5 no endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas Padrão de Amplificação das amostras dos animais analisados; B) As curvas de amplificação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da Curva Padrão; D) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão