MOANA RODRIGUES FRANÇA

Perfis endócrinos peri-ovulatórios influenciam o transporte, metabolismo e disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de vacas de corte durante o diestro inicial

Pirassununga

2016

MOANA RODRIGUES FRANÇA

Perfis endócrinos peri-ovulatórios influenciam o transporte, metabolismo e disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de vacas de corte durante o diestro inicial

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Mario Binelli

Pirassununga

2016

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.3412
FMVZ

França, Moana Rodrigues

Perfis endócrinos peri-ovulatórios influenciam o transporte, metabolismo e disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de vacas de corte durante o diestro inicial / Moana Rodrigues França. -- 2016.

73 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mario Binelli.

1. Bovino. 2. Receptividade uterina. 3. Esteroides sexuais. 4. Proteínas carreadoras de soluto. 5. Aminoácidos. I. Título.

FICHA CATALOGRÁFICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

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

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

São Paulo, 22 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FRANÇA, Moana Rodrigues

Título: Perfis endócrinos peri-ovulatórios influenciam o transporte, metabolismo e disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de vacas de corte durante o diestro inicial

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“É esse o credo dos homens livres – a oportunidade de ensaiar, o privilégio de errar,
a coragem de tornar a experimentar.”

(Roger Bacon)

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Teresinha Maria Rodrigues França e Moacyr Albuquerque França**. Minha mãe, minha luz, meu oriente, minha força, minha inspiração, dedico esse trabalho ao seu sacrifício, por ter aberto mão de tantas coisas para estar ao meu lado quando eu precisei, por sempre ver o melhor em mim e me inspirar a ser melhor. Meu pai, meu exemplo de força e resistência, dedico esse trabalho à nossa luta e à sua vitória.

AGRADEÇO

Primeiramente agradeço a Deus, a força maior, a energia superior.

Aos meus pais, que têm minha eterna gratidão, por me darem a vida e me ajudarem a conquistar o melhor dela, por sempre "segurarem as pontas", por não medirem esforços para me ajudarem a tornar meus sonhos possíveis. Por ajudarem a diminuir a dor nos momentos mais frustrantes e por valorizarem minhas virtudes.

Ao meu orientador, Mario Binelli, meu grande mentor nesses seis anos. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pela compreensão, pelo grande exemplo como pesquisador, professor e ser humano.

À minha irmã Moara e ao meu cunhado Guilherme, pela compreensão, pelas conversas, conselhos, por confiarem sempre em mim, por estarem presentes sempre, apesar da distância.

À minha irmã Moema, pelas conversas, pela ajuda nos momentos difíceis, pela confiança.

Aos meus sobrinhos, Guilherme, Giovana e Elisa, pelos momentos mais felizes da minha vida, pelos abraços apertados, pelo carinho mais sincero, pela alegria que sempre trouxeram para a minha vida.

A família Rodrigues, queridos tios, tias, primos e primas e aos meus padrinhos, pela confiança, pelo carinho, pelos encontros mais preciosos.

Aos meus amigos de longa data Gisara, Karine, Robson, Ivan, Wagner, pelos momentos de descontração, pelas conversas.

Aos meus amigos e colegas do VRA, pela adorável convivência, pela ajuda em tantos momentos importantes.

Aos amigos e colegas do LFEM, por todo o conhecimento compartilhado, pela ajuda científica e pessoal, pela amizade e companheirismo.

À Maressa, pela ajuda indispensável para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Raj Duggavathi e ao Dr. Bruce Murphy e sua equipe, principalmente a Fanny, pela paciência e por toda a ajuda no período que fiquei no CRRA.

À Kalyne, por toda ajuda no CRRA e principalmente pela amizade, pelas conversas, pelos conselhos.

À Maite, por todas as noites de quinta, pela companhia nos momentos mais alegres e pela ajuda mais que fundamental nos momentos mais difíceis, por tantas vezes esquecer sua dor para ajudar a diminuir a minha.

Aos amigos do Cross, por ajudarem a tornar a vida mais leve mesmo depois de treinos pesados.

Às queridas Caipiretes, Mayara e Iasmin, pela parceria nos treinos e na vida. Por não medirem esforços para me ajudar nas mais diversas situações. Por despertarem o melhor de mim.

Harumi e Clayton, por toda a ajuda burocrática.

À Elza, pela prontidão na ajuda na formatação da tese.

Aos funcionários João, Marcio, José, Alexandra, por nos proporcionarem um ambiente melhor de trabalho.

Aos professores do VRA pela convivência agradável e pela colaboração.

Ao PPGR, pela oportunidade de fazer parte da equipe.

À FAPESP, pelo suporte financeiro para realização do projeto.

Ao CNPq, pela bolsa concedida durante o doutorado.

RESUMO

FRANÇA, M. F. **Perfis endócrinos peri-ovulatórios influenciam o transporte, metabolismo e disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de vacas de corte durante o diestro inicial.** [Pre-ovulatory endocrine profiles influence endometrial amino acids transport, metabolism and availability in the uterine lumen during early diestrus in beef cows]. 2016. 73f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Em vacas de corte, folículos pré-ovulatórios (FPO) maiores, maiores concentrações de estradiol (E2) no proestro/estro e progesterona (P4) no diestro favorecem o crescimento do conceito e a fertilidade. Porém, os mecanismos mediados pelos esteroides femininos que influenciam a receptividade uterina ao embrião precisam ser esclarecidos. Os aminoácidos (AA) são componentes das secreções uterinas que são cruciais para a sobrevivência do embrião antes da implantação. A hipótese deste trabalho é que o tamanho do FPO e as concentrações de E2 e P4 modulam a abundância de transcritos relacionados ao transporte e metabolismo de AA no endométrio e afetam a concentração luminal de AA. Para isso, o crescimento folicular de vacas Nelore foi manipulado com o objetivo de formar dois grupos: FPO grande e CL grande (FG-CLG) e FPO pequeno e CL pequeno (FP-CLP). No Dia 4 (D4; Exp 1) e Dia 7 (D7; Exp 2) após a injeção de GnRH para indução da ovulação, foram coletados tecido endometrial e lavado uterino *post-mortem*. A abundância de transcritos foi avaliada por qRT-PCR e as concentrações de AA nos lavados foram quantificadas por HPLC. No Exp 1, o tamanho do FPO, concentrações plasmáticas de E2 no D-1 e de P4 no D4 foram 15,70mm±0,43 vs. 11,31mm±0,23 ($p<0,01$), 2,44pg/ml±0,19 vs. 0,65pg/ml ($p<0,01$) e 1,40ng/ml±0,23 vs. 0,80ng/ml±0,10 ($p<0,01$) para os grupos FG-CLG vs. FP-CLP, respectivamente. No Exp 2, o tamanho do FPO, concentrações plasmáticas de E2 no D-1 e de P4 no D7 foram 13,18mm±0,44 vs. 10,63mm±0,30 ($p<0,01$), 2,30pg/ml±0,57 vs. 0,50pg/ml±0,13 ($p<0,01$) e 3,68ng/ml±0,38 vs. 2,49ng/ml±0,43 ($p=0,04$) para os grupos FG-CLG vs. FP-CLP, respectivamente. No D4 a abundância de *SLC1A4*, *SLC38A1*, *SLC6A6*, *SLC7A4* e *SLCY* e no D7, *SLC1A4*, *SLC6A1*, *SLC6A14*, *SLC7A4*, *SLC7A8*, *SLC38A1*, *SLC38A7*, *SLC43A2* e *DDO* foi maior no endométrio dos animais do grupo FG-CLG ($p<0,05$). No D4, maiores concentrações de taurina, alanina e ácido α -aminobutírico foram observadas no grupo FP-CLP ($p<0,05$). Em contraste,

menores concentrações de valina e cistationina foram encontradas nos lavados uterinos do D7 dos animais do grupo FP-CLP ($p < 0,05$). No D4, os animais do grupo FG-CLG, associado a maior fertilidade, apresentaram menor quantidade de AA nas secreções uterinas, porém, a abundância dos transportadores de AA foi compatível com maior transporte em comparação aos animais do grupo FP-CLP. Esses resultados sugerem que antes do embrião se mover do oviduto ao útero, o transporte e metabolismo dos AA prioriza a preparação das células endometriais para receber o embrião e não o acúmulo nas secreções uterinas. Porém, no D7, quando o embrião está em contato direto com as secreções uterinas, os genes relacionados ao transporte de AA no endométrio e a concentração de AA no histotrofo são estimulados nas vacas do grupo FG-CLG. Portanto o metabolismo e transporte de AA no sentido das células endometriais ou das secreções uterinas pode ser um mecanismo importante para a receptividade materna.

Palavras-chave: Bovino. Receptividade uterina. Esteroides sexuais. Proteínas carreadoras de soluto. Aminoácidos.

ABSTRACT

FRANÇA, M. F. **Pre-ovulatory endocrine profiles influence endometrial amino acids transport, metabolism and availability in the uterine lumen during early diestrus in beef cows.** [Perfis endócrinos peri-ovulatórios influenciam o transporte, metabolismo e disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de vacas de corte durante o diestro inicial]. 2016. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In beef cattle, a large size of the pre-ovulatory follicle (POF) and resulting elevated proestrus/estrus estradiol (E2) and diestrus progesterone (P4) concentrations positively affect conceptus growth and fertility. However, sex-steroid-mediated mechanisms that influence uterine receptivity to the embryo need to be elucidated. Amino acids are important components of maternally-derived secretions that are crucial for embryo survival before implantation. The hypothesis is that the size of the POF, E2 and P4 concentrations modulate endometrial abundance of solute carrier proteins (SLC) transcripts related to AA transport and metabolism and subsequently affect luminal amino acids concentrations. Therefore, follicle growth of Nelore cows was manipulated to produce two experimental groups: large POF and CL (LF-LCL group) and small POF and CL (SF-SCL group). On Day 4 (D4; Experiment 1) and Day 7 (D7; Experiment 2) post GnRH injection to induce ovulation, endometrial tissue and uterine washings were collected post-mortem. Transcript abundance was evaluated by qRT-PCR and amino acid concentrations were quantified in washings by HPLC. On Experiment 1, POF size, plasma E2 concentration on D-1, and plasma concentration of P4 on D4 were 15.70mm±0.43 vs. 11.31mm±0.23 ($p<0.01$), 2.44pg/ml±0.19 vs. 0.65pg/ml ($p<0.01$) and 1.40ng/ml±0.23 vs. 0.80ng/ml±0.10 ($p<0.01$) for the LF-LCL vs. SF-SCL groups, respectively. For Experiment 2, POF size, plasma E2 concentration on D-1 and plasma P4 concentration on D7 were 13.18mm±0.44 vs. 10.63mm±0.30 ($p<0.01$), 2.30pg/ml±0.57 vs. 0.50pg/ml±0.13 ($p<0.01$) and 3.68ng/ml±0.38 vs. 2.49ng/ml±0.43 ($p=0.04$) for the LF-LCL vs. SF-SCL groups, respectively. On D4, abundance of *SLC6A6*, *SLC7A4*, *SLC17A5*, *SLC38A1*, *SLC38A7* and *SLCY* and on D7, *SLC1A4*, *SLC6A1*, *SLC6A14*, *SLC7A4*, *SLC7A7*, *SLC7A8*, *SLC17A5*, *SLC38A1*, *SLC38A7*, *SLC43A2* and *DDO* was greater in the endometrium of cows from the LF-LCL group ($p<0.05$). On D4, higher concentrations of taurine, alanine and α -aminobutyric acid were observed in SF-SCL ($p<0.05$). In

contrast, lower concentrations of valine and cystathionine were quantified in D7 uterine washings from SF-SCL cows ($p < 0.05$). On D4, animals from LF-LCL group, associated with greater fertility, presented less amino acid content in uterine secretion but abundance of transporters was compatible to greater transport in comparison to animals from SF-SCL group. This suggests that before embryo moves from oviduct to uterus, amino acids transport and metabolism pathways prioritizes endometrium cells preparation for receiving the embryo but not accumulation in uterine secretions. However, on D7, when the embryo is in direct contact with uterine secretions, genes related to amino acids transport in endometrium and amino acids concentration in histotroph are up-regulated in LF-LCL cows. The latter insights indicate that amino acids metabolism and transport, towards endometrial cells or uterine secretions, might be mechanisms contributing to maternal receptivity.

Key words: Cattle. Uterine receptivity. Sex steroids. Solute Carrier Proteins. Amino acids.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Sistemas de transporte de aminoácidos	19
2.2	Requerimentos do Embrião Pré-Implantação	24
2.3	Presença de Aminoácidos no Ambiente Uterino e Regulação por Esteroides	25
3	EVIDÊNCIA DA MODULAÇÃO DO METABOLISMO E TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NO ENDOMÉTRIO PELOS PERFIS ENDÓCRINO PERI-OVULATÓRIOS LEVANDO A RECEPTIVIDADE UTERINA	28
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
	REFERÊNCIAS	32
	APÊNDICE	42

1 INTRODUÇÃO

Baixas taxas de fertilidade em bovinos podem estar associadas principalmente à mortalidade embrionária antes da implantação do embrião (DISKIN et al., 2006). Assim como em outras espécies, grande parte das perdas gestacionais pode ser causada por uma receptividade endometrial inadequada (MINTEN et al., 2013).

Logo após a fertilização, o embrião passa por divisões celulares. A partir do estágio 16 células quando o embrião passa a ser denominado mórula, por volta do dia 5 após a fertilização, ocorre a passagem do oviduto para o útero. No próximo estágio, quando o embrião passa de mórula a blastocisto, inicia-se a compactação, evento necessário para a formação da blastocela, uma cavidade repleta de fluido, que se forma entre os dias 6 e 7 (revisado por BETTERIDGE; FLÉCHON, 1988). O próximo evento é a expansão do blastocisto, um aumento no diâmetro da estrutura embrionária, que ocorre entre os dias 7 e 8 após a fertilização. Na sequência ocorre a eclosão do blastocisto e por volta do dia 12 após a fertilização inicia-se o processo de alongamento do embrião que vai até o dia 18 (revisado por PEIPPO et al., 2011). O embrião alongado inicia a implantação, processo dependente de progesterona, que em bovinos caracteriza-se por uma aderência do embrião ao epitélio luminal, de forma menos invasiva que observado em murinos e humanos. Nesta fase, ocorre a sinalização mais importante do reconhecimento materno em ruminantes, o embrião secreta interferon tau (IFNT) em quantidades suficientes para inibir a luteólise a partir da inibição da produção de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) pelo útero. Durante esta fase de desenvolvimento inicial o embrião atinge o comprimento do corno ipso-lateral ao lado da ovulação (ROBERTS et al., 1992; CHAVATTE-PALMER; GUILLOMOT, 2007).

A receptividade endometrial pode ser definida como a capacidade do endométrio de facilitar a implantação embrionária, processo que depende da qualidade tanto do embrião quanto do endométrio que é responsável pela secreção do histotrofo e das interações embriônico-maternais (CAVAGNA; MANTESE, 2003).

Durante as duas primeiras semanas de gestação o embrião encontra-se solto no lúmen uterino e depende exclusivamente das secreções endometriais para seu desenvolvimento (BAZER, 1975; ROBERTS; BAZER, 1988; KANE et al., 1997). Essas secreções, denominadas histotrofo, são compostas de aminoácidos, íons,

hormônios, proteínas, inibidores de proteases, fatores de crescimento entre outros componentes indispensáveis para o desenvolvimento embrionário (BAZER, 1975; ROBERTS; BAZER, 1988; KANE et al., 1997). O estudo da composição das secreções uterinas bem como dos eventos celulares que acontecem no endométrio durante o diestro inicial é indispensável para a compreensão dos mecanismos envolvidos na receptividade uterina.

Os aminoácidos presentes no histotrofo são indispensáveis para a manutenção do desenvolvimento embrionário, sobretudo nas primeiras semanas de gestação (HUGENTOBLE et al., 2007; GAO et al., 2009c; HUGENTOBLE et al., 2010; FORDE et al., 2014; MEIER et al., 2014). O transporte e controle da concentração dos aminoácidos da corrente sanguínea materna para o lúmen uterino dependem de membros específicos das famílias das Proteínas Carreadoras de Solutos (SLC; SMITH et al., 2003). Interessantemente, em ruminantes, tanto a disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino quanto a abundância de seus transportadores no endométrio são moduladas pela concentração periférica de progesterona (GAO et al., 2009a, b, c; GROEBNER et al., 2011; FORDE et al., 2014).

Existe uma associação positiva entre a concentração de progesterona no diestro inicial e as taxas de prenhez, tanto em gado de leite quanto de corte (DISKIN; MORRIS, 2008). De fato, taxas mais elevadas de prenhez em bovinos e ovinos estão associadas a altas concentrações de progesterona circulante no período pós-concepção imediato, visto que esse hormônio tem um papel-chave no estabelecimento e manutenção da gestação (ASHWORTH et al., 1989; STRONGE et al., 2005; MCNEILL et al., 2006). Diskin et al., em 2006, relataram uma associação linear das concentrações periféricas de progesterona nos dias 5, 6 e 7 após a inseminação de novilhas leiteiras e sobrevivência do embrião. Em outro estudo, provou-se ainda que a progesterona tem um efeito positivo na probabilidade de concepção para IA mas não para TE (DEMETRIO et al., 2007), o que ressalta a importância do papel da progesterona na primeira semana de gestação. Altas concentrações de progesterona na primeira semana pós concepção estão relacionadas a avanço no alongamento do conceito (GARRETT et al., 1988; CARTER et al., 2008; SATTERFIELD et al., 2009), aumento na produção de interferon-tau (MANN; LAMMING, 2001; MANN et al., 2006) e fertilidade de vacas de corte (PUGLIESI et al., 2016).

Os mecanismos pelos quais a progesterona age no sistema reprodutivo feminino para garantir a manutenção da gestação ainda não foram completamente desvendados. Recentemente nosso grupo estabeleceu um protocolo para sincronização de ovulações de vacas de corte visando a manipulação do crescimento do folículo pré-ovulatório (FPO), modulando por consequência o crescimento do corpo lúteo (CL) e subseqüentes concentrações de progesterona (P4; MESQUITA et al., 2014). Em tal estudo as vacas foram divididas em dois grupos: grupo folículo grande – corpo lúteo grande (FG-CLG ou LF-LCL, associado à maior receptividade) e grupo folículo pequeno – corpo lúteo pequeno (FP-CLP ou SF-SCL, associado à menor receptividade uterina). Um estudo posterior comprovou maior fertilidade do grupo FG-CLG em relação ao grupo FP-CLP (PUGLIESI et al., 2016).

Para associar dados encontrados na literatura referentes aos possíveis mecanismos responsáveis pelo incremento na taxa de fertilidade causado pelas diferenças no tamanho do FOP, CL e concentrações de progesterona, amostras de endométrio referentes aos grupos FG-CLG e FP-CLP foram coletadas (MESQUITA et al., 2014) e posteriormente analisadas por RNASeq, com a intenção de caracterizar o transcriptoma de vacas com diferentes fenótipos de fertilidade e identificar as vias diferentemente enriquecidas nos grupos (MESQUITA et al., 2015). Desta forma grupos de transcritos relacionados ao transporte e metabolismo de aminoácidos no útero foram identificados

O objetivo do presente trabalho foi investigar a influência do ambiente endócrino peri-ovulatório nas vias de transporte e metabolismo de aminoácidos na primeira semana do diestro em vacas de corte. Para isso, formulamos a hipótese de que maior FPO e maior CL subseqüente estimulam a síntese de aminoácidos no endométrio bem como seu transporte para o lúmen uterino proporcionando maiores concentrações de AA no histotrofo (Figura 1).

Figura 1 - Modelo Hipotético Gráfico.

Fonte: (FRANÇA, M. R., 2016)

Efeito esperado do ambiente endócrino peri-ovulatório nas vias de transporte e metabolismo de aminoácidos (AA). Maiores concentrações dos hormônios esteroides derivadas de maiores folículos pré-ovulatórios (FPO) e subsequentes maiores corpos lúteos (CL) no grupo folículo grande CL grande (FG-CLG) estimulam o metabolismo e o transporte de AA (triângulos verdes) via transportadores de aminoácidos (estrelas azuis) em comparação ao Grupo folículo pequeno CL pequeno (FP-CLP). O transporte ocorre da corrente sanguínea para as células do estroma, epitélio glandular e luminal em direção ao lúmen uterino levando ao aumento da concentração de AA no histotrofo e proporcionando ambiente uterino mais favorável ao desenvolvimento inicial do embrião. Dia da indução da ovulação (D0); Dia da coleta das amostras D4 e D7.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Aminoácidos são substâncias orgânicas que contêm tanto um grupo amina quanto um grupo ácido (WU, 2009). Existem mais de 300 aminoácidos na natureza, porém somente 20 deles são subunidades funcionais usadas para síntese de proteínas. Ornitina, citrulina, homocisteína, taurina e β -alanina apesar de não formarem proteínas participam de importantes processos no metabolismo celular (CURIS et al., 2007; PERŁA-KAJÁN et al., 2007; MANNA et al., 2009). No lúmen uterino, os aminoácidos são importantes componentes do histotrofo e participam de importantes processos celulares embrionários inclusive regulando o desenvolvimento e implantação do embrião (STEEVES; GARDNER, 1999; VAN WINKLE, 2001; MARTIN et al., 2003).

Tendo em vista a relevância da presença dos aminoácidos para o desenvolvimento embrionário inicial, é importante ressaltar que a regulação das concentrações de aminoácidos no endométrio e placenta bem como seu transporte nesses tecidos requer a presença e atividade de carreadores específicos de AA (SMITH et al., 2003). O sistema de nomenclatura das proteínas carreadoras de solutos SLC (Solute Carrier Proteins) é recente e passou a ser usado massivamente a partir de 2004 (HEDIGER et al., 2004). Os transportadores são divididos em famílias, agrupadas de acordo com o sistema de transporte e características do soluto a ser transportado. Até o momento pelo menos cinquenta e duas famílias foram descritas em mamíferos das quais oito são responsáveis pelo transporte de aminoácidos (SLC1, SLC3, SLC6, SLC7, SLC17, SLC36, SLC38 e SLC43; HEDIGER et al., 2013).

Após ser transportado até o ambiente intracelular, é necessário que haja um metabolismo adequado dos aminoácidos para garantir a funcionalidade de cada tecido (EL IDRISSE, 2008; PHANG et al., 2008; WU, 2009). O intestino delgado é o maior sítio de catabolismo de aminoácidos, portanto é onde ocorre a regulação da entrada de aminoácidos para a circulação periférica e é o alvo da grande maioria dos estudos relacionados à síntese e metabolismo de aminoácidos (WU, 1998; RIEDIJK et al., 2007). As vias de metabolismo dos aminoácidos são específicas, catabolizadas por enzimas próprias para cada substrato, porém, exibem diversas

características em comum (WU, 2009). Dentre os metabólitos resultantes do catabolismo dos aminoácidos estão: amônia, CO_2 , ácidos graxos de cadeia longa e curta, glicose, H_2S , corpos cetônicos, óxido nítrico, ureia, ácido úrico, poliaminas e mesmo outros aminoácidos (BLACHIER et al., 2007; MONTAÑEZ et al., 2008).

Diversas reações como transaminação, desaminação, descarboxilação, hidroxilação, redução, desidrogenação, hidrólise, dioxigenação, transferência de carbono, condensação, oxidação podem ocorrer nos tecidos a fim de produzir produtos necessários ao bom funcionamento da célula, destruir ou ainda evitar a síntese de substâncias nocivas ao bom funcionamento do tecido (WU, 2009). Para que haja o aporte adequado de aminoácidos destinados ao funcionamento celular é necessário que haja equilíbrio no conjunto de reações, como transporte e catabolismo de aminoácidos (COLLARINI; OXENDER, 1987). A regulação do transporte de aminoácidos deve atender às necessidades nutricionais da célula. No caso, o carreamento de um aminoácido para o ambiente intracelular irá atuar como regulador do catabolismo do mesmo, podendo ser considerado uma etapa do metabolismo deste (COLLARINI; OXENDER, 1987). Por exemplo, em hepatócitos, o metabolismo da alanina é estimulado pela quantidade da própria alanina que é transportada para dentro da célula (SIPS et al., 1980).

Portanto, a importância dos aminoácidos vai além da construção de proteínas. Na gestação inicial o transporte dessas moléculas com direção ao lúmen parece estar orquestrado às oscilações hormonais que ocorrem acerca do momento da ovulação. Além disso, essas moléculas estão relacionadas a diversos eventos celulares, importantes para a receptividade uterina e desenvolvimento embrionário inicial. Nessa revisão, serão abordados temas relacionados ao transporte e metabolismo de aminoácidos nos tecidos endometrial e embrionário e sua modulação por hormônios esteroides.

2.1 Sistemas de transporte de aminoácidos

De acordo com suas estruturas químicas, os aminoácidos recebem diferentes tipos de classificação. Aminoácidos podem ser divididos em neutros, catiônicos ou

aniônicos, polares ou apolares (aromáticos, hidrofóbicos) ou ainda classificados segundo o tamanho da cadeia de carbono (BARKER; ELLORY, 1990).

Os transportadores de aminoácidos reconhecem o substrato a ser transportado, se ligam a ele e carregam os aminoácidos de dentro para fora da célula ou de fora para dentro. Essas proteínas carreadoras são classificadas de acordo com a similaridade da estrutura da sua sequência peptídica primária, especificidade do substrato transportado (aminoácidos ácidos, básicos ou neutros) e dependência de íons para catalisar a reação de transporte (e.g., transporte dependente de sódio; PALACÍN et al., 1998).

Os transportadores de aminoácidos identificados no endométrio bovino são classificados entre os seguintes sistemas: Sistema N, Sistema y^+ , Sistema $y^+ L$, Sistema ASC, Sistema X_{AG-} , Sistema β , Sistema Asc, Sistema L, Sistema A, Sistema B^0 , Sistema Gly, Sistema x_c^- revisado por (KANAI; HEDIGER, 2004; GRILLO et al., 2008; FOTIADIS et al., 2013).

Sistema N

Esse sistema recebeu esse nome para indicar a presença de um átomo de nitrogênio na cadeia lateral de seus substratos. O sistema N caracteriza-se por um sistema dependente de sódio e apresenta alta sensibilidade a alterações de pH (KILBERG et al., 1980). O sistema N é composto por duas isoformas, SN1 e SN2, também chamadas de SLC38A3 e SLC38A5 respectivamente. Seus alvos de transporte estão restritos a glutamina, asparagina e histidina (KARL et al., 1989; NOVAK; BEVERIDGE, 1997). Porém SLC38A3 apresenta maior afinidade para a retirada de glutamina da célula em condições fisiológicas (KILBERG et al., 1980; CHAUDHRY et al., 1999).

Sistema y^+

O Sistema y^+ é um sistema de transporte com alta afinidade para aminoácidos catiônicos (lisina, arginina, ornitina) independente de íons e insensível a alterações de pH (WHITE; CHRISTENSEN, 1982). Esse sistema é composto pelos transportadores CAT1, CAT2, CAT3 e CAT4 ou SLC7A1, SLC7A2, SLC7A3 e

SLC7A4 respectivamente (CLOSS, 1996; CLOSS et al., 2006). SLC7A1 parece ser o carreador mais importante para transporte de aminoácidos catiônicos na placenta de humanos (AYUK et al., 2000). Esse sistema também é capaz de realizar o transporte de aminoácidos neutros, porém com menor afinidade e apenas na presença de sódio (CHRISTENSEN, 1964).

Sistema y^+L

Esse sistema faz o transporte de aminoácidos catiônicos e apresenta alta afinidade por aminoácidos neutros na presença de um íon de sódio. Esse sistema realiza o transporte de aminoácidos através de mecanismos similares aos transportadores do sistema y^+ (BERTRAN et al., 1992; PALACÍN, 1994). Dois transportadores compõe esse grupo, y^+LAT1 e y^+LAT2 ou SLC7A7 e SLC7A6 respectivamente (FOTIADIS et al., 2013).

Sistema ASC

Os transportadores desse sistema reagem com alanina, serina, cisteína e aminoácidos homólogos com até cinco carbonos e prolina, porém com maior afinidade para alanina, serina, cisteína e treonina. O transporte dos aminoácidos ocorre de forma dependente de sódio e pode atuar em uma ampla faixa de pH (CHRISTENSEN et al., 1967; SAIER et al., 1988). Na maioria das células ele representa o sistema mais importante de transporte de aminoácidos dependente de sódio e é a segunda maior via de transporte de alanina (EDMONDSON et al., 1979; GAZZOLA et al., 1981; SHOTWELL et al., 1981). O sistema é composto por dois transportadores ASCT1 e ASCT2 (SLC1A4 e SLC1A5 respectivamente), ambos presentes na membrana basal de células placentárias humanas (GRILLO et al., 2008; KANAI et al., 2013). O transportador SLC1A5 parece estar envolvido na reciclagem de glutamina, pois realiza o transporte bidirecional de glutamina através da troca por glutamato (BRÖER et al., 1999).

Sistema X_{AG}⁻

Esse sistema opera de forma dependente de sódio principalmente no transporte de aspartato e glutamato com alta afinidade por glutamato (MILLAR et al., 1996). O Sistema X_{AG}⁻ compreende três transportadores, SLC1A1, SLC1A2 e SLC1A3 (KANAI; HEDIGER, 2004).

Sistema β

Os membros do Sistema β transportam taurina e β -alanina com alta afinidade através de um mecanismo dependente dos íons sódio e cloro (CHRISTENSEN, 1964; KULANTHAIVEL et al., 1991). SLC6A6 é o transportador que representa esse sistema (PRAMOD et al., 2013).

Sistema Asc

Esse sistema é responsável pelo transporte de alanina, serina e cisteína e opera por mecanismo independente de sódio. Membros desse sistema são capazes de operar no transporte de diversos aminoácidos com maior afinidade por serina e glicina (FUKASAWA et al., 2000; HELBOE et al., 2003). O transportador Asc-1, codificado pelo gene SLC7A10, pertence à família de transportadores que requer a associação a uma glicoproteína para realizar o transporte do substrato (VERREY et al., 2004).

Sistema L

Esse sistema foi assim denominado por sua alta afinidade pela leucina mas também é responsável pelo transporte de isoleucina, tirosina, glutamina, valina, metionina, fenilalanina e triptofano. O sistema L apresenta alta capacidade de transporte e pode ser ativado mesmo com baixas concentrações de substrato. Além disso esses carreadores podem atuar como um sistema de troca, transportando um aminoácido no sentido intracelular outro no sentido extracelular e parecem atuar de forma dependente de gradiente de próton (MITSUMOTO et al., 1986; BARKER; ELLORY, 1990; BABU et al., 2003). LAT1, LAT2, LAT3 e LAT4 (ou SLC7A5,

SLC7A8, SLC43A1 e SLC43A2 respectivamente) são os representantes desse sistema (BODOY et al., 2013; FOTIADIS et al., 2013).

Sistema A

O sistema A é um sistema presente de forma ubíqua nos tecidos de mamíferos. Esse sistema atua de forma dependente de sódio e realiza o transporte de aminoácidos neutros de cadeia curta e não ramificada como alanina (pela qual apresenta maior afinidade), serina, glicina, prolina e glutamina e 2(metilamino)-isobutirato (MeAIB), um tipo de análogo de aminoácido não metabolizável (OXENDER; CHRISTENSEN, 1963; JOHNSON; SMITH, 1988). Esse sistema compreende três membros: SNAT1, SNAT2 e SNAT4 ou SLC38A1, SLC38A2 e SLC38A4 respectivamente (MACKENZIE; ERICKSON, 2004). SLC38A1 e SLC38A2 operam por meio de mecanismos semelhantes. SLC38A4, que apresenta menor afinidade por aminoácidos neutros, pode transportar aminoácidos catiônicos na presença de um íon sódio (HATANAKA et al., 2000; SUGAWARA et al., 2000; YAO et al., 2000; HATANAKA et al., 2001).

Sistema B⁰

O carreador referente a esse sistema realiza o transporte de aminoácidos neutros e básicos de forma dependente de íons sódio e cloro (PRAMOD et al., 2013). SLC6A14 (ou ATB^{0,+}) é capaz de promover o transporte de diversos aminoácidos com aparente maior afinidade por glutamina, arginina e leucina (KARUNAKARAN et al., 2011).

Sistema Gly

O sistema Gly é composto por dois transportadores, GLYT1 (SLC6A9) e GLYT2 (SLC6A5) e transporta glicina apenas na presença de íons sódio e cloro. Carreadores desse sistema parecem não atuar como permutador de aminoácidos (KING; GUNN, 1989; BARKER; ELLORY, 1990; PRAMOD et al., 2013).

Sistema x_c⁻

Transportadores desse sistema estão presentes de forma ubíqua em mamíferos. Tipicamente, esse transportador promove a troca da cistina extracelular e o glutamato intracelular, fornecendo substrato para a síntese de glutatona. Recentemente esse sistema foi também descrito como transportador de cistationina (SATO et al., 1999; KOBAYASHI et al., 2015). SLC7A11 ou xCT é o representante desse sistema, que juntamente com membros da família SLC3A forma heterodímeros para promover o transporte de aminoácidos (SATO et al., 1999).

2.2 Requerimentos do Embrião Pré-Implantação

Durante o desenvolvimento embrionário, os aminoácidos são elementos indispensáveis, visto que são componentes pra síntese tanto de proteínas como de substâncias não proteicas como óxido nítrico, poliaminas, neurotransmissores e ainda nucleotídeos purina e pirimidina (GRILLO et al., 2008). Além disso, em humanos, a presença de aminoácidos não essenciais e glutamina nas 48 horas iniciais de cultivo aumentou significativamente o crescimento da massa celular interna, as taxas de implantação de blastocistos e ainda o desenvolvimento fetal em humanos (LANE; GARDNER, 1997).

Cada aminoácido é utilizado de forma individual pelos embriões, visto que a taxa de depleção no meio de cultivo é diferente para cada aminoácido. Do mesmo modo, a demanda das células embrionárias por aminoácidos é diferente em embriões XX ou XY e mais importante, as necessidades embrionárias passam por alterações ao longo do desenvolvimento do embrião (ZWINGMAN et al., 1993; PARTRIDGE; LEESE, 1996).

Vários estudos já foram realizados para comparar a utilização de aminoácidos durante diferentes estágios do desenvolvimento embrionário (PARTRIDGE e LEESE, 1996; LANE; GARDNER, 1997; LI et al., 2006).

Independente do estágio de desenvolvimento, a alanina foi invariavelmente secretada no meio de cultivo embrionário. A produção de alanina pelo embrião ocorre provavelmente para prevenir a toxicidade pela produção de amônia (LEE; FUKUI, 1996; PARTRIDGE; LEESE, 1996; STURMEY et al., 2010).

Embriões bovinos no intervalo do estágio 8 células a mórula secretaram 21 aminoácidos (glicina, glutamato, alanina, aspartato, prolina, lisina, leucina, ornitina, serina, treonina, taurina, valina, tirosina, isoleucina, fenilalanina, triptofano, histidina, asparagina, beta-alanina, citrulina e metionina) e absorveram apenas arginina e glutamina. No intervalo do estágio mórula a blastocisto os embriões absorveram 15 aminoácidos (asparagina, glutamato, glicina, prolina, glutamina, treonina, valina, fenilalanina, isoleucina, leucina, ornitina, arginina, tirosina, metionina e lisina) e secretaram apenas 8 aminoácidos (serina, alanina, asparagina, histidina, triptofano, beta-alanina, citrulina e taurina (LI et al., 2006).

Os zigotos bovinos apresentam necessidades baixas de aminoácidos com relação a embriões em estágio mais avançado de desenvolvimento (PARTRIDGE; LEESE, 1996) provavelmente por que o aumento da síntese proteica ocorre após a ativação do genoma no estágio 8-16 células (FREI et al., 1989). Curiosamente, o perfil de metabolismo de aminoácidos pode ser usado para prever a viabilidade do embrião e baixo metabolismo de aminoácidos nos dias 1 e 2 após a inseminação podem ser indicativos de melhor viabilidade (STURMEY et al., 2010).

Altas concentrações de aminoácidos no início do desenvolvimento embrionário, quando as necessidades do embrião são baixas, pode ser prejudiciais ao embrião. Em hamsters, metionina, fenilalanina e isoleucina inibiram o desenvolvimento de embriões no estágio inicial, mas não foram inibitórios após 8 células (CARNEY; BAVISTER, 1987).

A adição de aminoácidos ao meio de cultivo de embriões bovinos contendo soro fetal bovino não afetou o desenvolvimento dos mesmos até 16 células, porém 4 dias após a inseminação a adição de AA aumentou a taxa de desenvolvimento de blastocistos, número total de células, número de células no trofotoderma e na camada celular interna (STEEVES; GARDNER, 1999).

Em embriões murinos, aminoácidos não essenciais e glutamina aumentaram a formação e eclosão de blastocistos, enquanto aminoácidos essenciais estimularam clivagem, diferenciação das células da camada celular interna e desenvolvimento fetal (LANE; GARDNER, 1997).

2.3 Presença de Aminoácidos no Ambiente Uterino e Regulação por Esteroides

Durante a gestação inicial, a mãe deve proporcionar ao embrião um ambiente uterino favorável, para facilitar o desenvolvimento embrionário inicial, as primeiras interações materno-embrionárias e o processo de implantação (CAVAGNA; MANTESE, 2003). Os aminoácidos parecem estar entre as importantes moléculas com potencial para favorecer o desenvolvimento embrionário inicial.

Fahning e colaboradores foram os primeiros pesquisadores a determinar as concentrações de aminoácidos no lúmen uterino de vacas. Nesse estudo 25 aminoácidos foram identificados em fluidos coletados do útero de vacas cíclicas. As concentrações desses aminoácidos apresentaram alterações ao longo do ciclo estral, porém não foi encontrado um padrão de alterações comum a todos os aminoácidos. Essas alterações ocorreram de forma individual para cada aminoácido (FAHNING et al., 1967).

Curiosamente, essas variações na disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino encontradas por Fahning e colaboradores não foram acompanhadas por modificações das concentrações dos mesmos aminoácidos na corrente sanguínea, o que sugere o controle hormonal das secreções uterinas de aminoácidos (FAHNING et al., 1967).

De fato, em coelhos, a castração reduziu a concentração de glutamato e serina no fluido uterino. A administração de estradiol levou ao aumento de glutamato e redução na disponibilidade de alanina, treonina e glicina. Já a administração de progesterona levou ao aumento de glicina e serina (GREGOIRE et al., 1961). Em bovinos, a suplementação de progesterona foi capaz de alterar a disponibilidade de aminoácidos nos fluidos uterinos e ovidutais (HUGENTOBLE et al., 2010).

Portanto, as concentrações de aminoácidos no lúmen uterino parecem ser moduladas pelos hormônios esteroides. Interessantemente, tanto a abundância de transcritos referentes a transportadores de aminoácidos no endométrio quanto a disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino de ovinos com ovários sem CL e cujos folículos foram aspirados, foram aumentadas após infusão de progesterona (GAO et al., 2009a, b, c; FORDE et al., 2014). A expressão gênica de SLC7A1 e SLC1A5 no endométrio de ovinos aumentou após a suplementação de progesterona. Para confirmar que o estímulo da abundância do mRNA dos

transportadores foi causado pela progesterona, os animais receberam um antagonista de P4, que levou a redução da abundância desses transcritos (GAO et al., 2009b).

Em bovinos, a suplementação de hormônios esteroides também influencia a o transporte de aminoácidos no endométrio. A infusão de progesterona foi capaz de estimular a disponibilidade de aminoácidos no útero e plasma materno de vacas sem folículos ou corpo lúteo (GROEBNER et al., 2011). Em outro estudo, a suplementação de estradiol em vacas ovariectomizadas estimulou a expressão gênica de SLC1A5, SLC38A5 e SLC7A11 no endométrio. A suplementação de progesterona levou a um aumento na expressão de SLC1A1, SLC1A6 e SLC7A5, porém o efeito de P4 foi revertido após a administração de estradiol (SHIMIZU et al., 2010).

Em resumo, os aminoácidos são componentes das secreções uterinas indispensáveis para o desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação inicial. Visto que sua disponibilidade no lúmen uterino está relacionada à viabilidade embrionária e é modulada por hormônios esteroides, a via do transporte dos aminoácidos representa um possível mecanismo relacionado aos fenótipos de fertilidade observados em animais com diferentes ambientes endócrinos peri-ovulatórios.

3 EVIDÊNCIA DA MODULAÇÃO DO METABOLISMO E TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS NO ENDOMÉTRIO PELOS PERFIS ENDÓCRINO PERI-OVULATÓRIOS LEVANDO A RECEPTIVIDADE UTERINA

O presente capítulo aborda os dados apresentados no artigo intitulado "**Evidence of endometrial amino acid metabolism and transport modulation by peri-ovulatory endocrine profiles driving uterine receptivity**", submetido para a revista *Journal of Animal Science and Biotechnology*". Os dados estão apresentados aqui de forma resumida e a abordagem na íntegra está disponível no Apêndice A desta tese.

Em vacas de corte, folículos pré-ovulatórios (FPO) maiores, maiores concentrações de estradiol (E2) no proestro/estro e progesterona (P4) no diestro favorecem o crescimento do conceito e a fertilidade (GARRETT et al., 1988; CARTER et al., 2008; SATTERFIELD et al., 2009; PUGLIESI et al., 2016). As oscilações hormonais que acontecem durante o ciclo estral conduzem alterações na composição bioquímica dos fluidos uterinos. Essas alterações, reguladas principalmente pela progesterona, levam a um ajuste do ambiente uterino para receber o embrião (BAZER et al., 1979; SPENCER et al., 2004; SPENCER et al., 2007). Porém, os mecanismos mediados pelos esteroides femininos que influenciam a receptividade uterina ao embrião precisam ser esclarecidos.

Os aminoácidos são componentes das secreções uterinas que são cruciais para a sobrevivência do embrião antes da implantação (DANIEL; KRISHNAN, 1967). Curiosamente, em gado de leite, a capacidade reprodutiva das vacas parece estar positivamente associada a concentrações uterinas de aminoácidos (MEIER et al., 2014).

A hipótese deste trabalho é que o tamanho do FPO e as concentrações de E2 e P4 modulam a abundância de transcritos relacionados ao transporte (Solute Carrier Family 1 member 1; SLC1A1; Solute Carrier Family 1 member 4; SLC1A4; Solute Carrier Family 1 member 5; SLC1A5; Solute Carrier Family 6 member 1; SLC6A1; Solute Carrier Family 6 member 14; SLC6A14; Solute Carrier Family 6 member 6; SLC6A6; Solute Carrier Family 7 member 2; SLC7A2; Solute Carrier Family 7 member 4; SLC7A4; Solute Carrier Family 7 member 5; SLC7A5; Solute Carrier Family 7 member 7; SLC7A7; Solute Carrier Family 7 member 8; SLC7A8; Solute

Carrier Family 7 member 11; SLC7A11; Solute Carrier Family 17 member 5; SLC17A5; Solute Carrier Family 17 member 9; SLC17A9; Solute Carrier Family 36 member 2; SLC36A2; Solute Carrier Family 38 member 1; SLC38A1; Solute Carrier Family 38 member 4; SLC38A4; Solute Carrier Family 38 member 6; SLC38A6; Solute Carrier Family 38 member 7; SLC38A7; Solute Carrier Family 43 member 2; SLC43A2) e metabolismo de AA (D-aspartate oxidase; DDO e Selenocysteine lyase; SCLY) no endométrio e afetam a concentração luminal de AA (glutamato, α -aminoadipato, asparagina, serina, glutamina, glicina, histidina, β -alanina, taurina, treonina, alanina, prolina, ácido α -aminobutírico, tirosina, valina, metionina, cistationina, isoleucina, fenilalanina, triptofano, ornitina e lisina). Para isso, o crescimento folicular de vacas Nelore foi manipulado com o objetivo de formar dois grupos: FPO grande e CL grande (FG-CLG) e FPO pequeno e CL pequeno (FP-CLP). No Dia 4 (D4; Exp 1) e Dia 7 (D7; Exp 2) após a injeção de GnRH para indução da ovulação, foram coletados tecido endometrial e lavado uterino *post-mortem*. A abundância de transcritos foi avaliada por qRT-PCR e as concentrações de AA nos lavados foram quantificadas por HPLC. Tanto no Exp 1 quanto no Exp 2, o tamanho do FPO, concentrações plasmáticas de E2 no D-1 e de P4 no D4 (Exp 1) e D7 (Exp 2) foram maiores no grupo FG-CLG em comparação ao grupo FP-CLP ($P < 0.05$). No D4 a abundância de *SLC6A6*, *SLC7A4*, *SLC17A5*, *SLC38A1*, *SLC38A7* e *SCLY* e no D7, *SLC1A4*, *SLC6A1*, *SLC6A14*, *SLC7A4*, *SLC7A7*, *SLC7A8*, *SLC38A1*, *SLC38A7*, *SLC43A2* e *DDO* foi maior no endométrio dos animais do grupo FG-CLG ($p < 0,05$). No D4, maiores concentrações de taurina, alanina e ácido α -aminobutírico foram observadas no grupo FP-CLP ($p < 0,05$). Em contraste, menores concentrações de valina e cistationina foram encontradas nos lavados uterinos do D7 dos animais do grupo FP-CLP ($p < 0,05$).

Comparando o transcriptoma do endométrio e a disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino dos animais do grupo FG-CLG e FP-CLP, é possível perceber que o endométrio das vacas do grupo FG-CLG, que é mais receptivo ao embrião, apresenta maior abundância de transcritos relacionados ao transporte de aminoácidos no D4 e no D7 do diestro. No D4, a disponibilidade de aminoácidos no lúmen uterino das vacas do grupo FG-CLG é menor. Isso está associado tanto a uma baixa demanda embrionária por aminoácidos, uma vez que o embrião encontra-se em transição entre o oviduto e o útero, quanto a uma alta demanda pelo tecido uterino que se encontra em ativa proliferação. Já no D7, quando o embrião já está

presente no útero e necessita de maior disponibilidade de aminoácidos no meio, esses nutrientes estão presentes em maiores concentrações no lúmen uterino dos animais do grupo FG-CLG. Deste modo, podemos concluir que as alterações do ambiente endócrino peri-ovulatório condizentes com maiores taxas de fertilidade, alteram o transcriptoma de vias relacionadas ao transporte e metabolismo dos aminoácidos no endométrio bem como a disponibilidade desses nutrientes no lúmen uterino na primeira semana do diestro, acompanhando as necessidades nutricionais tanto das células endometriais quanto do embrião, de forma a proporcionar um ambiente favorável ao desenvolvimento embrionário inicial.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Primeiramente, através da manipulação do crescimento folicular, foi possível obter grupos de animais com distintos perfis endócrinos acerca do momento da ovulação. Esses diferentes perfis endócrinos foram capazes de alterar o transporte e metabolismo de AA nos dias 4 e 7 após a indução da ovulação.

Mais especificamente, no D4, o grupo FG-CLG apresentou menores concentrações de aminoácidos no lavado uterino, porém maior abundância de transcritos relacionados ao transporte e metabolismo de AA com relação ao outro grupo. Já no D7, o aumento na abundância dos transcritos relacionados ao transporte e metabolismo de AA foi acompanhado do aumento da disponibilidade de AA no lavado uterino no grupo FG-CLG em comparação ao grupo FP-CLP.

Os resultados apresentados nessa tese sugerem que antes do embrião se mover do oviduto ao útero, o transporte e metabolismo dos AA prioriza a preparação das células endometriais para receber o embrião e não o acúmulo nas secreções uterinas. Porém, no D7, quando o embrião está em contato direto com as secreções uterinas, os genes relacionados ao transporte de AA no endométrio e a concentração de AA no histotrofo são estimulados nas vacas do grupo FG-CLG. Portanto o metabolismo e transporte de AA no sentido das células endometriais ou das secreções uterinas pode ser um mecanismo importante para a receptividade materna.

REFERÊNCIAS

- ASHWORTH, C. J.; SALES, D. I.; WILMUT, I. Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. **J Reprod Fertil**, v. 87, n. 1, p. 23-32, 1989.
- AYUK, P. T.; SIBLEY, C. P.; DONNAI, P.; D'SOUZA, S.; GLAZIER, J. D. Development and polarization of cationic amino acid transporters and regulators in the human placenta. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 6, p. C1162-71, 2000.
- BABU, E.; KANAI, Y.; CHAIROUNGDU, A.; KIM D. K.; IRIBE, Y.; TANGTRONGSUP, S.; JUTABHA, P.; LI, Y.; AHMED, N.; SAKAMOTO, S.; ANZAI, N.; NAGAMORI, S.; ENDOU, H. Identification of a novel system L amino acid transporter structurally distinct from heterodimeric amino acid transporters. **J Biol Chem**, v. 278, n. 44, p. 43838-45, 2003.
- BARKER, G. A.; ELLORY, J. C. The identification of neutral amino acid transport systems. **Exp Physiol**, v. 75, n. 1, p. 3-26, 1990.
- BAZER, F. W. Uterine protein secretions: relationship to development of the conceptus. **J Anim Sci**, v. 41, n. 5, p. 1376-82, 1975.
- BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M.; THATCHER, W. W. Actions of hormones on the uterus and effect on conceptus development. **J Anim Sci**, v. 49, p. 35-45, 1979. Supplement 2.
- BERTRAN, J.; MAGAGNIN, S.; WERNER, A.; MARKOVICH, D.; BIBER, J.; TESTAR, X.; ZORZANO, A.; KÜHN, L. C.; PALACIN, M.; MURER, H. Stimulation of system y(+)-like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 12, p. 5606-10, 1992.
- BETTERIDGE, K. J.; FLÉCHON, J.-E. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. **Theriogenology**, v. 29, p. 155-187, 1988.
- BLACHIER, F.; MARIOTTI, F.; HUNEAU, J. F.; TOMÉ, D. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. **Amino Acids**, v. 33, n. 4, p. 547-62, 2007.
- BODOY, S.; FOTIADIS, D.; STOEGER, C.; KANAI, Y.; PALACÍN, M. The small SLC43 family: facilitator system I amino acid transporters and the orphan EEG1. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 638-45, 2013 2013.
- BRÖER, A.; BROOKES, N.; GANAPATHY, V.; DIMMER, K. S.; WAGNER, C. A.; LANG, F.; BRÖER, S. The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. **J Neurochem**, v. 73, n. 5, p. 2184-94, 1999.

CARNEY, E. W.; BAVISTER, B. D. Stimulatory and inhibitory effects of amino acids on the development of hamster eight-cell embryos in vitro. **J In Vitro Fert Embryo Transf**, v. 4, n. 3, p. 162-7, 1987.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reprod Fertil Dev**, v. 20, n. 3, p. 368-75, 2008.

CAVAGNA, M.; MANTESE, J. C. Biomarkers of endometrial receptivity--a review. **Placenta**, v. 24, p. S39-47, 2003. Supplement B.

CHAUDHRY, F. A.; REIMER, R. J.; KRIZAJ, D.; BARBER, D.; STORM-MATHISEN, J.; COPENHAGEN, D. R.; EDWARDS, R. H. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. **Cell**, v. 99, n. 7, p. 769-80, 1999.

CHAVATTE-PALMER, P.; GUILLOMOT, M. Comparative implantation and placentation. **Gynecol Obstet Invest**, v. 64, n. 3, p. 166-74, 2007.

CHRISTENSEN, H. N. A Transport system serving for mono- and diamino acids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 51, p. 337-44, 1964.

CHRISTENSEN, H. N.; LIANG, M.; ARCHER, E. G. A distinct Na⁺-requiring transport system for alanine, serine, cysteine, and similar amino acids. **J Biol Chem**, v. 242, n. 22, p. 5237-46, 1967.

CLOSS, E. I. CATs, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transporters. **Amino Acids**, v. 11, n. 2, p. 193-208, 1996.

CLOSS, E. I.; BOISSEL, J. P.; HABERMEIER, A.; ROTMANN, A. Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). **J Membr Biol**, v. 213, n. 2, p. 67-77, 2006.

COLLARINI, E. J.; OXENDER, D. L. Mechanisms of transport of amino acids across membranes. **Annu Rev Nutr**, v. 7, p. 75-90, 1987.

CURIS, E.; CRENN, P.; CYNOBER, L. Citrulline and the gut. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 10, n. 5, p. 620-6, 2007.

DANIEL, J. C.; KRISHNAN, R. S. Amino acid requirements for growth of the rabbit blastocyst in vitro. **J Cell Physiol**, v. 70, n. 2, p. 155-60, 1967.

DEMETRIO, D. G.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G.; VASCONCELOS, J. L. FACTORS affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **J Dairy Sci**, v. 90, n. 11, p. 5073-82, 2007.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reprod Domest Anim**, v. 43, p. 260-7, 2008. Supplement 2.

DISKIN, M. G.; MURPHY, J. J.; SREENAN, J. M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Anim Reprod Sci**, v. 96, n. 3-4, p. 297-311, 2006. >.

EDMONDSON, J. W.; LUMENG, L.; LI, T. K. Comparative studies of alanine and alpha-aminoisobutyric acid uptake by freshly isolated rat liver cells. **J Biol Chem**, v. 254, n. 5, p. 1653-8, 1979.

EL IDRISSEI, A. Taurine increases mitochondrial buffering of calcium: role in neuroprotection. **Amino Acids**, v. 34, n. 2, p. 321-8, 2008.

FAHNING, M. L.; SCHULTZ, R. H.; GRAHAM, E. F. The free amino acid content of uterine fluids and blood serum in the cow. **J Reprod Fertil**, v. 13, n. 2, p. 229-36, 1967.

FORDE, N.; SIMINTIRAS, C. A.; STURMEY, R.; MAMO, S.; KELLY, A. K.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; LONERGAN, P. Amino acids in the uterine luminal fluid reflects the temporal changes in transporter expression in the endometrium and conceptus during early pregnancy in cattle. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e100010, 2014.

FOTIADIS, D.; KANAI, Y.; PALACÍN, M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 139-58, 2013.

FREI, R. E.; SCHULTZ, G. A.; CHURCH, R. B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. **J Reprod Fertil**, v. 86, n. 2, p. 637-41, 1989.

FUKASAWA, Y.; SEGAWA, H.; KIM, J. Y.; CHAIROUNGDU, A.; KIM, D. K.; MATSUO, H.; CHA, S. H.; ENDOU, H.; KANA, I. Y. Identification and characterization of a Na(+)-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. **J Biol Chem**, v. 275, n. 13, p. 9690-8, 2000.

GAO, H.; WU, G.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Select nutrients in the ovine uterine lumen. IV. Expression of neutral and acidic amino acid transporters in ovine uteri and peri-implantation conceptuses. **Biol Reprod**, v. 80, n. 6, p. 1196-208, 2009a.

GAO, H.; WU, G.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Select nutrients in the ovine uterine lumen. III. Cationic amino acid transporters in the ovine uterus and peri-implantation conceptuses. **Biol Reprod**, v. 80, n. 3, p. 602-9, 2009b.

GAO, H.; WU, G.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; LI, X.; BAZER, F. W.. Select nutrients in the ovine uterine lumen. I. Amino acids, glucose, and ions in uterine luminal flushings of cyclic and pregnant ewes. **Biol Reprod**, v. 80, n. 1, p. 86-93, 2009c.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **J Reprod Fertil**, v. 84, n. 2, p. 437-46, 1988.

GAZZOLA, G. C.; DALL'ASTA, V.; GUIDOTTI, G. G. Adaptive regulation of amino acid transport in cultured human fibroblasts. Sites and mechanism of action. **J Biol Chem**, v. 256, n. 7, p. 3191-8, 1981.

GREGOIRE, A. T.; GONGSAKDI, D.; RAKOFF, A. E. The free amino acid content of the female rabbit genital tract. **Fertil Steril**, v. 12, p. 322-7, 1961.

GRILLO, M. A.; LANZA, A.; COLOMBATTO, S. Transport of amino acids through the placenta and their role. **Amino Acids**, v. 34, n. 4, p. 517-23, 2008.

GROEBNER, A. E. RUBIO-ALIAGA, I.; SCHULKE, K.; REICHENBACH, H. D.; DANIEL, H.; WOLF, E.; MEYER, H. H.; ULBRICH, S. E. Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation development. **Reproduction**, v. 141, n. 5, p. 685-95, 2011.

HATANAKA, T.; HUANG, W.; LING, R.; PRASAD, P. D.; SUGAWARA, M.; LEIBACH, F. H.; GANAPATHY, V. Evidence for the transport of neutral as well as cationic amino acids by ATA3, a novel and liver-specific subtype of amino acid transport system A. **Biochim Biophys Acta**, v. 1510, n. 1-2, p. 10-7, 2001.

HATANAKA, T.; HUANG, W.; WANG, H.; SUGAWARA, M.; PRASAD, P. D.; LEIBACH, F. H.; GANAPATHY, V. Primary structure, functional characteristics and tissue expression pattern of human ATA2, a subtype of amino acid transport system A. **Biochim Biophys Acta**, v. 1467, n. 1, p. 1-6, 2000.

HEDIGER, M. A.; ROMERO, M. F.; PENG, J. B.; ROLFS, A.; TAKANAGA, H.; BRUFORD, E. A. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. **Pflugers Arch**, v. 447, n. 5, p. 465-8, 2004

HEDIGER, M. A.; CLÉMENÇON, B.; BURRIER, R. E.; BRUFORD, E. A. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 95-107, 2013

HELBOE, L.; EGEBJERG, J.; MØLLER, M.; THOMSEN, C. Distribution and pharmacology of alanine-serine-cysteine transporter 1 (asc-1) in rodent brain. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 2227-38, 2003.

HUGENTOBLE, S. A.; DISKIN, M. G.; LEESE, H. J.; HUMPHERSON, P. G.; WATSON, T.; SREENAN, J. M.; MORRIS, D. G. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 4, p. 445-54, 2007.

HUGENTOBLE, S. A.; SREENAN, J. M.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J.; DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood. **Reprod Fertil Dev**, v. 22, n. 4, p. 684-94, 2010.

JOHNSON, L. W.; SMITH, C. H. Neutral amino acid transport systems of microvillous membrane of human placenta. **Am J Physiol**, v. 254, n. 6 Pt 1, p. C773-80, 1988.

KANAI, Y.; CLÉMENÇON, B.; SIMONIN, A.; LEUENBERGER, M.; LOCHNER, M.; WEISSTANNER, M.; HEDIGER, M. A. The SLC1 high-affinity glutamate and neutral amino acid transporter family. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 108-20, 2013.

KANAI, Y.; HEDIGER, M. A. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. **Pflugers Arch**, v. 447, n. 5, p. 469-79, 2004.

KANE, M. T.; MORGAN, P. M.; COONAN, C. Peptide growth factors and preimplantation development. **Hum Reprod Update**, v. 3, n. 2, p. 137-57, 1997.

KARL, P. I.; TKACZEWSKI, H.; FISHER, S. E. Characteristics of histidine uptake by human placental microvillous membrane vesicles. **Pediatr Res**, v. 25, n. 1, p. 19-26, 1989.

KARUNAKARAN, S. RAMACHANDRAN, S.; COOTHANKANDASWAMY, V.; ELANGO, S.; BABU, E.; PERIYASAMY-THANDAVAN, S.; GURAV, A.; GNANAPRAKASAM, J. P.; SINGH, N.; SCHOENLEIN, P. V.; PRASAD, P. D.; THANGARAJU, M.; GANAPATHY, V. SLC6A14 (ATB0,+) protein, a highly concentrative and broad specific amino acid transporter, is a novel and effective drug target for treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. **J Biol Chem**, v. 286, n. 36, p. 31830-8, 2011.

KILBERG, M. S.; HANDLOGTEN, M. E.; CHRISTENSEN, H. N. Characteristics of an amino acid transport system in rat liver for glutamine, asparagine, histidine, and closely related analogs. **J Biol Chem**, v. 255, n. 9, p. 4011-9, 1980.

KING, P. A.; GUNN, R. B. Na⁺- and Cl⁻-dependent glycine transport in human red blood cells and ghosts. A study of the binding of substrates to the outward-facing carrier. **J Gen Physiol**, v. 93, n. 2, p. 321-42, 1989.

KOBAYASHI, S.; SATO, M.; KASAKOSHI, T.; TSUTSUI, T.; SUGIMOTO, M.; OSAKI, M.; OKADA, F.; IGARASHI, K.; HIRATAKE, J.; HOMMA, T.; CONRAD, M.; FUJII, J.; SOGA, T.; BANNAI, S.; SATO, H. Cystathionine is a novel substrate of

cystine/glutamate transporter: implications for immune function. **J Biol Chem**, v. 290, n. 14, p. 8778-88, 2015.

KULANTHAIVEL, P.; COOL, D. R.; RAMAMOORTHY, S.; MAHESH, V. B.; LEIBACH, F. H.; GANAPATHY, V. Transport of taurine and its regulation by protein kinase C in the JAR human placental choriocarcinoma cell line. **Biochem J**, v. 277 (Pt 1), p. 53-8, 1991.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. **J Reprod Fertil**, v. 109, n. 1, p. 153-64, 1997.

LEE, E. S.; FUKUI, Y. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in a chemically defined medium and amino acid uptake by vitro-produced bovine morulae and blastocysts. **Biol Reprod**, v. 55, n. 6, p. 1383-9, 1996.

LI, R.; WEN, L.; WANG, S.; BOU, S. Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 404-14, 2006.

MACKENZIE, B.; ERICKSON, J. D. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. **Pflugers Arch**, v. 447, n. 5, p. 784-95, 2004.

MANN, G. E.; FRAY, M. D.; LAMMING, G. E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. **Vet J**, v. 171, n. 3, p. 500-3, 2006.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175-80, 2001.

MANNA, P.; SINHA, M.; SIL, P. C. Taurine plays a beneficial role against cadmium-induced oxidative renal dysfunction. **Amino Acids**, v. 36, n. 3, p. 417-28, 2009.

MARTIN, P. M.; SUTHERLAND, A. E.; VAN WINKLE, L. J. Amino acid transport regulates blastocyst implantation. **Biol Reprod**, v. 69, n. 4, p. 1101-8, 2003.

MCNEILL, R. E.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; MORRIS, D. G. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1435-41, 2006.

MEIER, S.; MITCHELL, M. D.; WALKER, C. G.; ROCHE, J. R.; VERKERK, G. A. Amino acid concentrations in uterine fluid during early pregnancy differ in fertile and subfertile dairy cow strains. **J Dairy Sci**, v. 97, n. 3, p. 1364-76, 2014.

MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; SCOLARI, S. C.; FRANÇA, M. R.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M.; PAPA, P. C.; BRESSAN, F. F.; MEIRELLES, F. V.; SILVA, L. A.; NOGUEIRA, G. P.; MEMBRIVE, C. M.; BINELLI, M. Manipulation of the periovulatory sex-steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression on early diestrus Nelore cows. **Theriogenology**, v. 81, n.6 p.861-69, 2014.

MESQUITA, F. S.; RAMOS, R. S.; PUGLIESI, G.; ANDRADE, S. C.; VAN HOECK, V.; LANGBEEN, A.; OLIVEIRA, M. L.; GONELLA-DIAZA, A. M.; GASPARIN, G.; FUKUMASU, H.; PULZ, L. H.; MEMBRIVE, C. M.; COUTINHO, L. L.; BINELLI, M. The receptive endometrial transcriptomic signature indicates an earlier shift from proliferation to metabolism at early diestrus in the cow. **Biol Reprod**, v. 93, n. 2, p. 52, 2015.

MILLAR, I. D.; CALVERT, D. T.; LOMAX, M. A.; SHENNAN, D. B. The mechanism of L-glutamate transport by lactating rat mammary tissue. **Biochim Biophys Acta**, v. 1282, n. 2, p. 200-6, 1996.

MINTEN, M. A.; BILBY, T. R.; BRUNO, R. G.; ALLEN, C. C.; MADSEN, C. A.; WANG, Z.; SAWYER, J. E.; TIBARY, A.; NEIBERGS, H. L.; GEARY, T. W.; BAUERSACHS, S.; SPENCER, T. E. Effects of fertility on gene expression and function of the bovine endometrium. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e69444, 2013.

MITSUMOTO, Y.; SATO, K.; OHYASHIKI, T.; MOHRI, T. Leucine-proton cotransport system in Chang liver cell. **J Biol Chem**, v. 261, n. 10, p. 4549-54, 1986.

MONTAÑEZ, R.; RODRÍGUEZ-CASO, C.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; MEDINA, M. A. In silico analysis of arginine catabolism as a source of nitric oxide or polyamines in endothelial cells. **Amino Acids**, v. 34, n. 2, p. 223-9, 2008.

NOVAK, D. A.; BEVERIDGE, M. J. Glutamine transport in human and rat placenta. **Placenta**, v. 18, n. 5-6, p. 379-86, 1997.

OXENDER, D. L.; CHRISTENSEN, H. N.; Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the ehrlich cell. **J Biol Chem**, v. 238, p. 3686-99, 1963.

PALACÍN, M. A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of a transport function. **J Exp Biol**, v. 196, p. 123-37, 1994.

PALACÍN, M.; ESTÉVEZ, R.; BERTRAN, J.; ZORZANO, A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. **Physiol Rev**, v. 78, n. 4, p. 969-1054, 1998.

PARTRIDGE, R. J.; LEESE, H. J. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. **Reprod Fertil Dev**, v. 8, n. 6, p. 945-50, 1996.

PEIPPO, J.; MACHATY, Z.; PETER, A. Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1373-9, 2011.

PERŁA-KAJÁN, J.; TWARDOWSKI, T.; JAKUBOWSKI, H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. **Amino Acids**, v. 32, n. 4, p. 561-72, 2007.

PHANG, J. M.; DONALD, S. P.; PANDHARE, J.; LIU, Y. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 681-90, 2008.

PRAMOD, A. B.; FOSTER, J.; CARVELLI, L.; HENRY, L. K. SLC6 transporters: structure, function, regulation, disease association and therapeutics. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 2-3, p. 197-219, 2013 2013.

PUGLIESI, G.; SANTOS, F. B.; LOPES, E.; NOGUEIRA, É.; MAIO, J. R.; BINELLI, M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1239-48, 2016.

RIEDIJK, M. A.; STOLL, B.; CHACKO, S.; SCHIERBEEK, H.; SUNEHAG, A. L.; VAN GOUDOEVER, J. B.; BURRIN, D. G. Methionine transmethylatation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 9, p. 3408-13, 2007.

ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. The functions of uterine secretions. **J Reprod Fertil**, v. 82, n. 2, p. 875-92, 1988.

ROBERTS, R. M.; LEAMAN, D. W.; CROSS, J. C. Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 200, n. 1, p. 7-18, 1992.

SAIER, M. H.; DANIELS, G. A.; BOERNER, P.; LIN, J. Neutral amino acid transport systems in animal cells: potential targets of oncogene action and regulators of cellular growth. **J Membr Biol**, v. 104, n. 1, p. 1-20, 1988.

SATO, H.; TAMBA, M.; ISHII, T.; BANNAI, S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. **J Biol Chem**, v. 274, n. 17, p. 11455-8, 1999.

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

SHOTWELL, M. A.; JAYME, D. W.; KILBERG, M. S.; OXENDER, D. L. Neutral amino acid transport systems in Chinese hamster ovary cells. **J Biol Chem**, v. 256, n. 11, p. 5422-7, 1981.

SIPS, H. J.; GROEN, A. K.; TAGER, J. M. Plasma-membrane transport of alanine is rate-limiting for its metabolism in rat-liver parenchymal cells. **FEBS Lett**, v. 119, n. 2, p. 271-4, 1980.

SMITH, R. J.; DEAN, W.; KONFORTOVA, G.; KELSEY, G. Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation. **Genome Res**, v. 13, n. 4, p. 558-69, 2003.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reprod Fertil Dev**, v. 19, n. 1, p. 65-78, 2007.

SPENCER, T; E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biol Reprod**, v. 71, n. 1, p. 2-10, 2004.

STEEVES, T. E.; GARDNER, D. K. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. **Biol Reprod**, v. 61, n. 3, p. 731-40, 1999.

STRONGE, A. J.; SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MEE, J. F.; KENNY, D. A.; MORRIS, D. G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1212-24, 2005.

STURMEY, R. G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; LEESE, H. J.; LONERGAN, P. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. **Mol Reprod Dev**, v. 77, n. 3, p. 285-96, 2010.

SUGAWARA, M.; NAKANISHI, T.; FEI, Y. J.; MARTINDALE, R. G.; GANAPATHY, M. E.; LEIBACH, F. H.; GANAPATHY, V. Structure and function of ATA3, a new subtype of amino acid transport system A, primarily expressed in the liver and skeletal muscle. **Biochim Biophys Acta**, v. 1509, n. 1-2, p. 7-13, 2000.

VAN WINKLE, L. J. Amino acid transport regulation and early embryo development. **Biol Reprod**, v. 64, n. 1, p. 1-12, Jan 2001.

VERREY, F.; CLOSS, E. I.; WAGNER, C. A.; PALACIN, M.; ENDOU, H.; KANAI, Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. **Pflugers Arch**, v. 447, n. 5, p. 532-42, 2004.

WHITE, M. F.; CHRISTENSEN, H. N. Cationic amino acid transport into cultured animal cells. II. Transport system barely perceptible in ordinary hepatocytes, but active in hepatoma cell lines. **J Biol Chem**, v. 257, n. 8, p. 4450-7, 1982.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1-17, 2009.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **J Nutr**, v. 128, n. 8, p. 1249-52, 1998.

YAO, D.; MACKENZIE, B.; MING, H.; VAROQUI, H.; ZHU, H.; HEDIGER, M. A.; ERICKSON, J. D. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. **J Biol Chem**, v. 275, n. 30, p. 22790-7, 2000.

ZWINGMAN, T.; ERICKSON, R. P.; BOYER, T.; AO, A. Transcription of the sex-determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 3, p. 814-7, 1993.

Apêndice A

Journal of Animal Science and Biotechnology
Evidence of endometrial amino acid metabolism and transport modulation by peri-ovulatory endocrine profiles driving uterine receptivity
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Evidence of endometrial amino acid metabolism and transport modulation by peri-ovulatory endocrine profiles driving uterine receptivity	
Article Type:	Research	
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (140527/2013-3)	Miss. Moana Rodrigues França
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (BR) (2014/01727-4)	Miss Maressa Izabel Santos da Silva
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (481199/2012-8)	Phd Mario Binelli
	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2011/03226-4)	Phd Mario Binelli
Abstract:	<p>In beef cattle, changes in the peri-ovulatory endocrine milieu are associated with conceptus growth and fertility. A large size pre-ovulatory follicle (POF) and resulting elevated progesterone (P4) concentrations during diestrus affect pregnancy rates positively. Amino acids (AA) are important components of maternally-derived secretions that are crucial for embryo survival before implantation. The hypothesis is that the size of the POF and P4 concentration on early diestrus modulate endometrial abundance of SLC transcripts related to AA transport and metabolism and subsequently impact on luminal AA concentrations. Follicle growth of Nelore cows was manipulated to produce two experimental groups: large POF and CL (LF-LCL group) and small POF and CL (SF-SCL group). On Day 4 (D4; Experiment 1) and Day 7 (D7; Experiment 2) post GnRH-induced ovulation (GnRH treatment = Day 0), animals were slaughtered and uterine tissues and uterine washings collected. The qRT-PCR method was used to evaluate expression levels of AA transporters in D4 and D7 endometrial tissues. Concentrations of AA were quantified on D4 and D7 uterine washings by HPLC. Transcript results show that, on D4 SLC1A4, SLC38A1, SLC6A6, SLC7A4, SLC17A5, SLCY and ASNS and on D7 SLC1A4, SLC6A1, SLC6A14, SLC7A4, SLC7A8, SLC17A5, SLC38A1, SLC38A7, SLC43A2 and DDO were more abundant in endometrium of cows from the LF-LCL group ($p < 0.05$). In addition, AA concentrations in the uterine lumen were also influenced by the endocrine profiles of the mother. In this context, D4 uterine washings revealed that higher concentrations of taurine, alanine and α-aminobutyric acid were observed in SF-SCL ($p < 0.05$). In contrast, lower concentrations of valine and cystathionine were quantified on D7 uterine washings from SF-SCL cows ($p < 0.05$).</p> <p>In conclusion, the present study revealed an association between AA transport and metabolism pathway in uterus and specific peri-ovulatory endocrine profiles related to the receptive status of the mother. The latter insights indicate that AAs might be important contributors of maternal receptivity.</p>	
Corresponding Author:	Mario Binelli Universidade de Sao Paulo Pirassununga, SP BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Moana Rodrigues França	

Apêndice A

First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Moana Rodrigues França
	Maressa Izabel Santos da Silva
	Guilherme Pugliesi
	Veerle Van Hoeck
	Mario Binelli
Order of Authors Secondary Information:	
Opposed Reviewers:	

Apêndice A

Evidence of endometrial amino acid metabolism and transport modulation by peri-ovulatory endocrine profiles driving uterine receptivity

Moana Rodrigues França^a; Maressa Izabel Santos da Silva^a; Guilherme Pugliesi^a; Veerle Van Hoeck^b; Mario Binelli^{a*}

^aDepartment of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil.

^bGamete Research Centre, Antwerp University, Antwerp, Antwerp, Belgium

MRF mfranca@usp.br

MISS maressaisabel@hotmail.com

GP pugliesi_vet@hotmail.com

VVH vvanhoeck@gmail.com

MB binelli@usp.br

*Corresponding author binelli@usp.br

225, Duque de Caxias Norte Ave. Jd. Elite

13635-900 - Pirassununga - SP - Brazil

Apêndice A

Abstract

Background: In beef cattle, changes in the peri-ovulatory endocrine milieu are associated with conceptus growth and fertility. A large size pre-ovulatory follicle (POF) and resulting elevated concentrations of progesterone (P4) during diestrus affect pregnancy rates positively. Amino acids (AA) are important components of maternally-derived secretions that are crucial for embryonic survival before implantation. The hypothesis is that the size of the POF and concentrations of P4 on early diestrus modulate endometrial abundance of SLC transcripts related to AA transport and metabolism and subsequently impact on luminal concentrations of AA. Follicle growth of Nelore cows was manipulated to produce two experimental groups: large POF and CL (LF-LCL group) and small POF and CL (SF-SCL group). On Day 4 (D4; Experiment 1) and Day 7 (D7; Experiment 2) post GnRH-induced ovulation (GnRH treatment = Day 0), animals were slaughtered and uterine tissues and uterine washings collected. The qRT-PCR method was used to evaluate expression levels of AA transporters in D4 and D7 endometrial tissues. Concentrations of AA were quantified on D4 and D7 uterine washings by HPLC.

Results: Transcript results show that, on D4 *SLC6A6*, *SLC7A4*, *SLC17A5*, *SLC7A7*, *SLC38A7* and *SCLY* and on D7 *SLC1A4*, *SLC6A1*, *SLC6A14*, *SLC7A4*, *SLC7A8*, *SLC17A5*, *SLC38A1*, *SLC38A7*, *SLC43A2* and *DDO* were more abundant in endometria of cows from the LF-LCL group ($P<0.05$). In addition, concentrations of AA in the uterine lumen were also influenced by the endocrine profiles of the mother. In this context, D4 uterine washings revealed that greater concentrations of taurine, alanine and α -aminobutyric acid were observed in SF-SCL ($P<0.05$). In contrast, lower concentrations of valine and cystathionine were quantified on D7 uterine washings from SF-SCL cows ($P<0.05$).

Conclusion: The present study revealed an association between the abundance of transcripts related to AA transport and metabolism in the endometrium and specific peri-ovulatory endocrine profiles related to the receptive status of the mother. The latter insights suggest that AAs are involved in maternal receptivity.

Keywords: amino acids; cattle; endocrine milieu; solute carrier protein; uterus;

Apêndice A

INTRODUCTION

A profitable beef cattle production system requires high reproductive efficiency. Acceptable female fertility rates depend on in-depth understanding of endocrine, cellular and molecular mechanisms regulating pregnancy. Hormonal variations during each bovine estrous cycle induce uterine changes that are crucial for uterine receptivity for conceptus development and implantation. Elevated levels of plasmatic progesterone (P4) immediately after conception are related to advanced conceptus elongation [1-3]. Moreover, recent studies showed that low plasmatic concentrations of P4 are associated with a sub-optimal uterine environment for conceptus (or blastocyst) development [3-5]. Conversely, a positive association exists between the probability of a successful pregnancy and plasma concentrations of P4 at Day 7 after estrus in both dairy and beef cows [4, 6]. However, the identity of molecules and mechanisms responsible for triggering the latter observations need further investigation.

In this context, information on the involvement of amino acid (AA) transport and metabolic pathways and availability to the embryo during early diestrus remains limited. During the first two weeks of pregnancy, before implantation, the conceptus depends exclusively on intrauterine milieu created by the endometrial secretions or molecules transported into the lumen by the uterine endometrium prior to implantation and placentation [7]. Amino acids are important components of these maternally-derived secretions that are crucial for embryonic survival mainly during early pregnancy [8-12]. Optimal amounts of essential and non-essential AAs are important for embryonic development, which is altered in case of sub-optimal amounts of these molecules [13-15].

The transport and concentration regulation of AAs in cells and tissues, including placenta and endometrium, depends on specific transport proteins [16]. There is no consistent information regarding regulation of protein synthesis and activity of AAs transporters, however, changes in transcriptional profiles of AA transporters in fact reveal changes in AAs availability in the uterine lumen [12]. Interestingly, gene expression of AA transporter increases simultaneously in maternal endometrium and conceptus cells. This is indicative of an active transport of AAs from maternal circulation to endometrial lumen exclusively for embryonic development.

Amino acids seem to be indispensable for embryonic survival and development. When non-essential AAs were completely removed from the medium, blastocyst growth drastically decreased [14], the same was observed in medium with any combination of glucose and phosphate without AAs [15].

More interestingly, P4 infusion in animals with no CL and no follicle increased AA availability in uterus and maternal plasma of cows [17] and gene expression of AA transporters in ovine and bovine endometria [8, 12, 18].

Apêndice A

During early embryonic development *in vitro*, AAs requirement seems to change [19]. Until the blastocyst stage, excess of essential AAs seems to be detrimental for embryonic development at least *in vitro* [13], however, absence of non-essential AAs in culture medium is unfavorable for embryonic development [14]. During blastocyst expansion stage, few changes were observed in AAs turnover during embryo culture [20], when patterns of AA depletion and release were similar to those observed *in vitro* for pre elongation embryos [21]. More interestingly, AA turnover has been pointed as an indicative of embryonic viability in humans and cattle [22, 23]. With similar relevance, enzymes present in endometrial tissue can regulate AAs synthesis or degradation. These enzymes are not characterized in bovine endometrium. In other tissues, DDO (D-aspartate oxidase) catalyzes the deamination of alanine and aspartate [24]. SCLY (Selenocysteine lyase), is involved in production of alanine and elemental selenium from selenocysteine [25].

In this context, AAs uterine transport and luminal availability emerge as important substrates that might play a role in the maternal-embryonic well-being. However, there is limited information available on how changes in pre-and post-ovulatory endocrine milieu affect transport of AAs from maternal circulation to endometrial cells and finally to the uterine lumen. We hypothesize that the size of POF and subsequent physiological circulating concentrations of P4 on early diestrus modulate endometrial expression of AA transporter proteins pathways.

In this context, we recently described a model to manipulate pre-ovulatory follicle growth to produce groups of cyclic beef cows with distinctly different circulating pre-ovulatory concentrations of E2 and early diestrus concentrations of P4 [26]. Based on the contrasting ovarian and endocrine characteristics of these two groups of animals, we studied both on D4 and D7 of the estrous cycle: (1) transcript abundance of AA transporters in endometrial tissues; (2) transcript abundance of enzymes related to AAs metabolism in endometrial tissues and (3) uterine luminal concentrations of AA.

Previous studies indicated that the phenotype of smaller follicles and short proestrus was associated with lower receptivity and capacity to support conceptus development, in comparison with a group manipulated to have a longer proestrus and ovulate a larger follicle [27]. We focused on days 4 and 7 for our investigation because it is around days 4-5 that the embryo moves from oviduct to the uterus, thus, from this moment until implantation (i.e., day 20 in cattle) the embryo depends exclusively on endometrial secretions for its development [28-30]. Moreover, most of embryonic losses occur during the two first weeks of pregnancy [31]. Therefore, mechanistic insights retrieved from this animal model could serve as potential basis for future strategies to fine-tune maternal receptivity towards the embryo.

Apêndice A

MATERIALS AND METHODS

Animals and reproductive management

Eighty six Nelore (*Bos indicus*) cows started in the experiment. Females selected were cycling, pluriparous, non-lactating and did not present any detectable reproductive disorder. In order to form two distinct groups of females with different POF sizes and subsequent CL volume and-plasmatic concentrations of P4 (Fig 1), a hormonal protocol was used as described previously [26, 27, 32]. Briefly, cows received two injections of prostaglandin F2 α (PGF; 0.5mg; Cloprostenol; Sincrocio[®]; Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil) 14 days apart. Next, ovaries were examined using transrectal ultrasonography (US) to confirm the presence of a PGF-responsible CL 10 days after the second PGF administration, (D-10; D0 = day of induction of ovulation by GnRH injection). On D-10, all females were treated with 2mg of estradiol benzoate, (Sincrodiol[®], Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil) to stimulate the emergence of a follicular wave and received an intravaginal P4-releasing device (1mg; Sincrogest[®]; Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil). Additionally, females assigned to the large POF followed by large CL (LF-LCL) group also received on D-10 a PGF injection (0.5mg; Cloprostenol; Sincrocio[®]) to induce CL regression during follicle development, whereas cows assigned to the small POF followed by small CL (SF-SCL) did not. Sixty hours prior to the induction of ovulation, P4 devices were removed and an injection of PGF was administered to the LF-LCL females, whereas cows in the SF-SCL received PGF administration 12 hours later (D-2.5 and D-2, respectively). Ovulation was induced on D0 by administration of gonadotrophin releasing hormone agonist (GnRH; 1 μ g buserelin; Sincroforte[®]; Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil).

Follicular growth, ovulation and CL diameter were monitored by transrectal ultrasound. Only cows that ovulated in response to the GnRH (i.e., between 24 and 36 h after GnRH injection; N=57) were included in the data analysis. Cows were slaughtered and their reproductive tracts were collected for further analysis on D4 (Experiment 1; LF-LCL n=16; SF-SCL n= 8) or D7 (Experiment 2; LF-LCL n= 18 SF-SCL n=18).

Ultrasound Exams and CL measurements

Transrectal ultrasound exams were performed using both an Aloka SSD-500 equipment attached to a 5MHz linear. Presence of an active CL on D-10, time of ovulation, CL size and the properties of the dominant follicle and POF were noted. Post mortem CLs were dissected and weighed separately and length, width and height were recorded. A calculated diameter for each CL was estimated by the mean of these three values. The CL volume was estimated using the sphere volume calculation ($V=4/3\pi R^3$), where R was equal to half the mean diameter.

Apêndice A

Figure 1. Experimental model and hormonal treatments. Growth of the pre-ovulatory follicle (POF) of beef cows was programmed to generate two groups of cows, the large follicle-large CL group (LF-LCL; associated with greater receptivity to the embryo and greater fertility) and small follicle-small CL group (SF-SCL). To decrease exposure to P4 and thereby stimulate growth of the POF, animals from LF-LCL group received an injection of PGF at the moment of intravaginal P4-releasing device insertion vs. no injections in the animals from SF-SCL group. Also, removal of the P4-releasing device was 12 hours earlier in the LF-LCL group. Follicle size, ovulation and CL size were accessed by ultrasound scanning of the ovaries. Blood samples were collected for P4 assay. Ovulation was induced by GnRH on D0. On D4 (Experiment 1) and D7 (Experiment 2) animal were slaughtered for samples collection. BS, blood sampling; GnRH, 1 μ g of busereline acetate im; P4, P4 progesterone-releasing device containing 1g of P4; +PGF, cows received 0.5 mg of sodium cloprostenol on D-10; -PGF, cows did not receive Cloprostenol on D-10; EB, 2mg of estradiol benzoate; Slaughter, endpoint for endometrial tissue and uterine washings collection (Adapted from Reference 26).

Plasma Progesterone Measurement

Blood was collected from the jugular vein on D7. Blood samples were centrifuged at 1500 x g during 30 min at 4°C. Plasma aliquots were stored at -20°C until analysis. Plasmatic concentrations of P4 were measured by radioimmunoassay analysis (Coat-A-Count®; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Munich, Germany) as described previously [33].

Endometrial tissue and uterine fluid collection

Post mortem, uteri were collected and the uterine horns, ipsilateral to the CL, were washed with 20 mL PBS. Subsequently, washings were centrifuged (1000xg) for 30 minutes at 4°C and the supernatant was collected, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Subsequently, endometrial tissue from washed uteri was dissected from intercaruncular region of ipsilateral uterine horn, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Apêndice A

Quantification of amino acids

Free concentrations of AA in uterine flushings were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using HPLC Luna Column 3u C18(2) 100A 250x4,6mm (00G-4251-E0 - Phenomenex, Torrence, CA, USA). The protocol for AA quantification was adapted from [34]. Briefly, 100 µL of internal standards of free AAs and Methanol were added to 200 µg of uterine flushing samples (n=12 LF-LCL n=7SF-SCL for experiment 1; n=9 LF-LCL; n= 10 SF-SCL for experiment 2). Dissolved samples were deproteinized using Vivaspin 500 (MWCO 3000Da, Sartorius, Goettingen, Germany) followed by centrifugation (15000xG for 45minutes at 4°C) and derivatization and samples were analyzed by programmed chromatography. Samples were analyzed as simplicates. Results were obtained by comparing each AA peak to its respective peak in multi-level (3 levels) standard curve, based on certified standards.

Analysis of gene expression levels in endometrial tissue

Total RNA was extracted from endometrial samples using the RNeasy mini kit (Qiagen Laboratories, Germantown, MD, USA) following manufacturer instructions. Concentration of RNA and purity were estimated using NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England). Total RNA extracts were stored at -80 °C until cDNA synthesis. One microgram of total RNA was used for reverse-transcription using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to manufacturer's instructions.

Quantification of endometrial gene expression was obtained by qPCR analysis using StepOne Plus[®] apparatus from Applied Biosystems. Transcript abundance of the AA transport-related genes was determined. Genes tested were *SLC1A1*, *SLC1A4*, *SLC1A5*, *SLC6A1*, *SLC6A6*, *SLC6A14*, *SLC7A2*, *SLC7A4*, *SLC7A5*, *SLC7A7*, *SLC7A8*, *SLC7A11*, *SLC17A5*, *SLC17A9*, *SLC36A2*, *SLC38A1*, *SLC38A4*, *SLC38A6*, *SLC38A7*, *SLC43A2*, *SCLY*, *DDO*. Each primer pair was analyzed considering probabilities of hairpin, homodimers and heterodimers formation using Oligo Analyzer 3.1 software (IDT[®]; <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Sequence specificities were tested using *Basic Local Alignment Search Tool* software Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). PCR product identity was confirmed by sequencing (Table1). Abundance of transcripts was compared between tissues from animals of LF-LCL and SF-SCL groups from Experiment 1 (n=8 per group) and experiment 2 (n=8 for LF-LCL and n=9 for SF-SCL group). The selection of reference genes was performed using GeNorm software (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>) [35]. After selection performed by the software, RPS18 was selected as endogen control for endometrium on D4 and cyclophilin, β-actin and GAPDH were chosen for endometrium on D7. Transcript abundance was calculated as the

Apêndice A

relative abundance between the target gene and the geometric average of selected housekeeping genes and given as an arbitrary number.

Table 1. Target genes, primer sequence and amplicon information.

Gene	Gene Symbol	Representative ID	Sequence	Amplicon size (BP)
Solute Carrier Family 1 member 1	<i>SLC1A1*</i>	NM_174599.2	F: AAGGAGTTGGAGCAAATGGA R: AACGAGATGGTATCGGACTTG	152
Solute Carrier Family 1 member 4	<i>SLC1A4*</i>	NM_001081577.1	F: ATCTTGATAGGCGTGGTTTC R: GCAAACTGGTTCTCTCTATAA	132
Solute Carrier Family 1 member 5	<i>SLC1A5*</i>	NM_174601.2	F: TCCAAATCTGCCCAGTCCTCAACT R: TTCCCATGATTCCCTATGCCCTGA	141
Solute Carrier Family 6 member 1	<i>SLC6A1*</i>	NM_001077836.1	F: GTGTCTCCATTTCTGGTTT R: GCACAGCACTGAAGATGAA	150
Solute Carrier Family 6 member 14	<i>SLC6A14*</i>	NM_001098461.1	F: GATGCTGCCACACAGATATT R: TAGCAAATCCAGCGAACAC	154
Solute Carrier Family 6 member 6	<i>SLC6A6*</i>	NM_174610.2	F: GAAAGCCGTGACGATGAT R: GGTGAAAGCCCTTCCTTAG	158
Solute Carrier Family 7 member 2	<i>SLC7A2*</i>	XM_010820288.1	F: GATGCTGGAGGGACTAGAT R: AGATACCCAGGCACAGAA	146
Solute Carrier Family 7 member 4	<i>SLC7A4*</i>	NM_001192042.1	F: GACCCACGGACTCTAGTTTA R: GGTTGAGCGATACCTATTGTG	156
Solute Carrier Family 7 member 5	<i>SLC7A5*</i>	NM_174613.2	F: TGTGGTCCGATAGGCATAGA R: ACAACGGTGGATGCTGTT	151

Apêndice A

Solute Carrier Family 7 member 7	<i>SLC7A7*</i>	NM_001075151.1	F: CCTCCAGGTCCTATGTATGT R: CAGCCAGCAGGAGATAGA	144
Solute Carrier Family 7 member 8	<i>SLC7A8*</i>	NM_001192889.1	F: GAGATTGGATTGGTCAGTGG R: GCTCCCACAACCTGTGATAAG	155
Solute Carrier Family 7 member 11	<i>SLC7A11*</i>	XM_010826337.1	F: GTACAGGGATTGGCTTCATC R: CTGGCACAACCTCCAGTATT	144
Solute Carrier Family 17 member 5	<i>SLC17A5*</i>	NM_001205974.1	F: CTGCAGTCCCTTATTTAGGC R: GGAATATCGCAGGTCCAATC	144
Solute Carrier Family 17 member 9	<i>SLC17A9*</i>	NM_001100378.2	F: GTCTAGACACACCAAGG R: GGGAAGGTCTCCTTAAA	141
Solute Carrier Family 36 member 2	<i>SLC36A2*</i>	NM_001206180.1	F: GACGACCAAGGGATAAC R: AGAGTGGAGGAGATGAA	157
Solute Carrier Family 38 member 1	<i>SLC38A1*</i>	XM_002687321.3	F: TCACGGTTCGATCTTCTTTATT R: ATCCTTCATGGAGGGTATGA	131
Solute Carrier Family 38 member 4	<i>SLC38A4*</i>	NM_001205943.1	F: CTGTGCCCATAGTGCTATTC R: GGCACAAGGATGACCAAA	139
Solute Carrier Family 38 member 6	<i>SLC38A6*</i>	XM_010823227.1	F: CACCTCAATACTGCCCATATAC R: GACGCCACACTGTCATAAA	150
Solute Carrier Family 38 member 7	<i>SLC38A7*</i>	NM_001100355.1	F: TATAGCTGTGATGGCAAAGG R: CTCAGGAAGCTGGATATTT	153
Solute Carrier Family 43 member 2	<i>SLC43A2*</i>	NM_001075546.1	F: AAGGCCCAGGATGAGAT R: AAGCAGGAGACAGCAAAG	149
Cyclophilin	<i>PPIA[#]</i>	NM_178320.2	F: GCCATGGAGCGCTTTGG R: CCACAGTCAGCAATGGTGATCT	65

Apêndice A

B-actin	ACTB [#]	NM_173979.3	F: GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA R: TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	78
D-aspartate oxidase	DDO [*]	NM_173908.2	F: CTGGCGTATCCAATGTAACC R: CCTCAAACCCACTTTCTCTC	158
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH [#]	NM_001034034.2	F: GCCATCAATGACCCCTTCAT R: TGCCGTGGGTGGAATCA	70
Ribosomal protein S18	RPS18 [#]	NM_001033614.2	F: GCCTGAGAAACGGCTACCAC R: CACCAGACTTGCCCTCCAAT	171
Selenocysteine lyase	SCLY [*]	NM_001083804.1	F: AGGAAGGCCAAGGAGATTAT R: CGTGGACTTTGTGGAAGTG	151

(F) Primer forward sequence; (R) Primer reverse sequence. * indicates primer sequences obtained by PrimerQuestQM software (IDT technologies) . [#][64].

Statistic analysis

Cows from each group were ranked according to plasmatic concentration of P4 at D7, P4 at D7/P4 at D2 ratio, CL size at D7, CL weight, follicle size at D-2, D-1 and D0 and pre-ovulatory follicle size as previously described [36]. The samples selected for analysis were according to this ranking. Further analyses were conducted in 8 animals per group (D4) and 8 and 9 animals (D7) from the LF-LCL and SF-SCL groups, respectively. Data were tested for normality of residues using the Shapiro-Wilk's test and for homogeneity of variances using the F-max test (SAS; Version 9.2; SAS Institute). Data were analyzed independently for Experiments 1 and 2, as they were not conducted contemporaneously. Discrete dependent variables (diameter of dominant follicle on D-2 and D0, POF diameter, CL volume and weight measured post-mortem and plasmatic concentrations of P4 on D4 or D7) were analyzed by one-way ANOVA for the effect of group using the PROC GLM procedure (SAS; Version 9.2; SAS Institute). Amino acid quantification data were tested for presence of outliers by Dyxon's test and outliers were removed before normality of residues test. Uterine flushings concentrations of amino acid values that did not follow the normality of residues were transformed for analysis. On D4, uterine flushings concentrations of threonine, alanine, methionine sulfone internal standard, tyrosine, leucine and lysine were transformed to natural log and isoleucine, ornithine and lysine were transformed to ranks. On D7, taurine, proline, alpha amino butyric acid, valine, cysteine, isoleucine

Apêndice A

and lysine were transformed to natural log and β -alanine was transformed to ranks. Concentrations of amino acid in uterine flushings and relative gene expression was analyzed by student's t test.

RESULTS

Animal Model

The hormonal strategy employed successfully produced groups of cows presenting distinctly different peri-ovulatory ovarian and endocrine characteristics, as expected and described earlier [26, 32, 36-38]. Specifically for Experiment 1, cows assigned to the LF-LCL group had larger follicle diameters on D-2, D-1 and D0 when compared to animals from the SF-SCL group ($P < 0.01$; table 2). Pre-ovulatory follicles were also larger for animals from the LF-LCL ($P < 0.01$; table 2), but plasmatic concentration of P4 on D4 was similar for animals from both groups ($P > 0.05$; table 2). For experiment 2, cows assigned to the LF-LCL group had larger POF diameters when compared to animals from the SF-SCL group ($P < 0.01$; Table 2). Furthermore, the larger POFs resulted in larger, and heavier CLs on Day 7 ($P < 0.05$; Table 2). Moreover, plasmatic concentrations of P4 on Day 7 were also greater in cows from the LF-LCL group. More details on ovarian and endocrine responses from the LF-LCL and SF-SCL groups on D4 and D7 were published elsewhere [26, 39].

Gene Expression

On D4, abundances of *SLC6A6*, *SLC7A4*, *SLC17A5*, *SLC38A1*, *SLC38A7* and *SCLY* were in average 64.34%, 70.64%, 42.36%, 56.24%, 35.54% and 41.45% greater in endometrium of LF-LCL cows compared to the SF-SCL endometrial tissue, respectively ($P \leq 0.05$; Table 3; Fig 7). These solute carriers are responsible for alanine, serine, proline, taurine, β -alanine, aspartate, glutamate, histidine, ornithine, lysine and glutamine transport. The enzymes *SCLY* is responsible for alanine synthesis from selenocysteine.

On D7, abundance of transcripts for *SLC1A4*, *SLC6A1*, *SLC6A14*, *SLC7A4*, *SLC7A7*, *SLC7A8*, *SLC17A5*, *SLC38A1*, *SLC38A7*, *SLC43A2* and *DDO* was 49,62%, 73,26%, 68,98%, 126,14%, 33,32%, 186,4%, 73,88%, 67,93%, 35,91%, 46,28%, and 69,64% greater in in the endometrium of LF-LCL group, ($P \leq 0.05$; Table 3; Fig 7).

Apêndice A

Table 2. Follicle, CL and P4 measurements.

End-points	LF-LCL	SF-SCL	P<F
Experiment 1 (D4)			
Follicle diameter (mm)			
D-2	12.66±0.4	8.84±0.6	0.00006
D-1	13.93±0.6	9.58±0.3	0.00003
D0	15.64±0.6	11.52±0.4	0.00005
Pre-ovulatory follicle (mm)	15.99±0.3	11,32±0.2	0.00000002
CL volume on D4(cm ³)	2.66±1.2	2.3±1	0.03
CL weight on D4(g)	1.06±0.06	0.68±0.08	0.002
Plasma P4 concentrations on D4 (ng/mL)	1.17±0.3	0.8±0.1	0.21
Experiment 2 (D7)			
Follicle diameter (mm)			
D-2	10.73±0.7	7.09±0.3	0.0002
D-1	11.79±0.6	7.73±0.4	0.000001
D0	13.04±0.5	9.68±0.4	0.00002
Pre-ovulatory follicle (mm)	13.63±0.5	10.09±0.3	0.000005
CL volume on D7 (cm ³)	2.29±0.2	1.53±0.2	0.03
CL weight on D7 (g)	2.83±0.2	1.53±0.2	0.0001
Plasma P4 concentrations (ng/mL)			
on D7	3.68±0.2	2.1±0.2	0.008

Cows were synchronized to have larger (LF-LCL; Exp 1 n=8; Exp 2 n=8) or smaller (SF-SCL; Exp 1 n= 8; Exp 2 n= 9) pre-ovulatory follicles and corpora lutea. Mean ± SEM.

Table 3: Relative quantification of transcript abundance by qPCR.

Gene	LF-LCL	SF-SCL	P<F
<i>SLC1A1</i>			
D4	0.1215±0.0126	0.1662±0.0339	0.2371
D7	0.0051±0.0004	0.0044±0.0005	0.2830
<i>SLC1A4</i>			
D4	0.0107±0.0014	0.0073	0.08
D7	0.0391±0.004	0.0262±0.004	0.05
<i>SLC1A5</i>			
D4	1.25±0.08	1.35±0.1	0.45
D7	0.7±0.07	0.9±0.01	0.51

Apêndice A

<i>SLC6A1</i>			
D4	0.0006±0.0001	0.0005±0.0001	0.5506
D7	0.4561±0.0350	0.2633±0.0282	0.0006
<i>SLC6A6</i>			
D4	0.0181±0.0017	0.0110±0.0007	0.0020
D7	0.0682±0.0068	0.0711±0.0090	0.8064
<i>SLC6A14</i>			
D4	0.021±0.004	0.025±0.006	0.58
D7	0.0286±0.0028	0.0169±0.0011	0.001
<i>SLC7A2</i>			
D4	0.0067±0.0014	0.0068±0.0012	0.9437
D7	0.0047±0.0007	0.0045±0.0009	0.8666
<i>SLC7A4</i>			
D4	0.0012±0.0002	0.0007±0.0002	0.052
D7	0.0077±0.0011	0.0034±0.0006	0.0036
<i>SLC7A5</i>			
D4	0.0522±0.008	0.0549±0.005	0.78
D7	0.0598±0.01	0.0599±0.007	0.99
<i>SLC7A7</i>			
D4	0.0167±0.0012	0.0159±0.0015	0.6886
D7	0.0579±0.0031	0.0434±0.0025	0.0021
<i>SLC7A8</i>			
D4	0.0153±0.0021	0.0180 0.0051	0.6238
D7	0.1068±0.0157	0.0373±0.0071	0.0012
<i>SLC7A11</i>			
D4	0.0004±0.0001	0.0004±0.0001	0.7969
D7	0.0004±0.0001	0.0005±0.0001	0.8120
<i>SLC17A5</i>			
D4	0.0193±0.0012	0.0135±0.0015	0.0089
D7	0.0629±0.0074	0.0362±0.0024	0.0039
<i>SLC17A9</i>			
D4	0.0033±0.0005	0.0028±0.0007	0.6243
D7	0.0054±0.0008	0.0048±0.0009	0.6354
<i>SLC36A2</i>			
D4	0.0005±0.0001	0.0006±0.0002	0.55
D7	0.0035±0.0013	0.0025±0.001	0.56
<i>SLC38A1</i>			
D4	0.066±0.008	0.042±0.004	0.019
D7	0.63±0.08	0.38±0.04	0.01
<i>SLC38A4</i>			
D4	0.0072±0.0009	0.0086±0.004	0.19
D7	0.0158±0.009	0.01978±0.002	0.12
<i>SLC38A6</i>			
D4	0.0044±0.0001	0.0047±0.0003	0.3745
D7	0.0077±0.0005	0.0066±0.0004	0.1304
<i>SLC38A7</i>			
D4	0.0404±0.004	0.0302±0.0014	0.02
D7	0.9601±0.009	0.7069±0.008	0.05
<i>SLC43A2</i>			
D4	0.6539±0.0217	0.6357±0.1383	0.8983
D7	0.0065±0.0006	0.0044±0.0006	0.0326

Apêndice A

<i>DDO</i>			
D4	0.0113±0.0021	0.0119±0.0023	0.8501
D7	0.0208±0.0028	0.0123±0.0011	0.0123
<i>SCLY</i>			
D4	0.0090±0.0006	0.0064±0.0003	0.0009
D7	0.0122±0.0011	0.0110±0.0005	0.3279

Mean ± standard error of the mean of the relative abundance of target genes and endogenous controls for large follicle-large CL group (LF-LCL; Exp 1 n=8; Exp 2 n=8) and small follicle-small CL group (SF-SCL; Exp 1 n= 8; Exp 2 n=9).

Amino Acids Quantification in the Uterine Washing

Glutamate, amino adipic acid, asparagine, serine, glutamine, glycine, histidine, β-alanine, taurine, β-amino isobutyric acid, threonine, alanine, proline, α-amino butyric acid, tyrosine, valine, methionine, cystathionine, cysteine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophan, ornithine and lysine were the AAs detected in uterine flushing on D4 and D7 (Table 4).

When comparing the levels in the uterine washings between groups, D4 data show that concentrations of taurine, alanine and α-amino butyric acid in uterine flushings were higher (68.71%, 70% and 44,81% respectively) in SF-SCL washings compared to LF-LCL counterparts ($P \leq 0.05$; Table 4; Fig 2-4; Fig 7).

Conversely, on Day 7, the concentration of valine and cystathionine in uterine flushings were greater (95% and 74.18% respectively) in the LF-LCL uterine washing (Table 4; Fig 5-7).

Table 4: Concentrations of amino acids in uterine washings.

Amino acid	LF-LCL (μmol/g)	SF-SCL (μmol/g)	P<F
<i>GLU</i>			
D4	115.30±9.23	157.40±23.49	0.066
D7	127.93±13.97	153.13±21.92	0.38
<i>AAD</i>			
D4	91.52±0.60	91.63±1.19	0.93
D7	91.54±0.82	92.71±0.93	0.22
<i>ASN</i>			
D4	115.63±2.80	126.66±7.56	0.12
D7	139.83±6.55	141.68±6.43	0.84
<i>SER</i>			
D4	6.76±1.03	11.04±2.80	0.19
D7	17.34±1.96	15.15±3.12	0.63
<i>GLN</i>			
D4	95.74±2.51	108.58±7.08	0.06
D7	120.05±6.16	122.52±7.91	0.81
<i>GLY</i>			
D4	119.36±12.39	164.37±31.04	0.13
D7	339.70±41.51	352.53±43.62	0.84

Apêndice A

<i>HYS</i>			
D4	11.21±0.51	12.81±0.61	0.08
D7	12.42±0.74	12.75±0.82	0.80
<i>B-ALA</i>			
D4	70.44±0.60	71.18±0.82	0.58
D7	80.95±3.88	73.78±1.06	0.08
<i>TAU</i>			
D4	117.20±9.57	197.90±32.56	0.01
D7	460.47±106.32	334.93±41.22	0.69
<i>THR</i>			
D4	6.88±2.00	8.77±2.79	0.66
D7	10.10±1.65	9.83±1.73	0.92
<i>ALA</i>			
D4	55.59±5.42	95.70±21.07	0.04
D7	76.94±8.97	91.15±11.40	0.36
<i>PRO</i>			
D4	6.27±0.98	9.72±2.21	0.13
D7	29.23±7.78	23.63±3.93	0.81
<i>AAAB</i>			
D4	19.82±1.38	28.71±2.85	0.03
D7	32.48±7.75	23.29±2.38	0.82
<i>TYR</i>			
D4	6.22±0.99	8.37±1.99	0.16
D7	6.20±0.74	6.77±0.78	0.62
<i>VAL</i>			
D4	19.11±1.91	23.90±3.56	0.23
D7	33.11±7.81	16.73±2.27	0.03
<i>MET</i>			
D4	22.16±0.26	22.36±0.29	0.64
D7	22.73±0.56	22.70±0.26	0.96
<i>CYS</i>			
D4	127.83±6.44	142.07±10.47	0.27
D7	309.37±49.54	177.92±17.55	0.02
<i>ILE</i>			
D4	18.09±2.25	21.58±3.25	0.21
D7	15.40±0.95	15.80±1.13	0.93
<i>PHE</i>			
D4	120.92±16.94	120.33±25.84	0.98
D7	117.49±23.60	142.63±16.80	0.39
<i>TRP</i>			
D4	388.73±35.18	433.83±76.04	0.54
D7	403.82±32.67	398.52±33.38	0.91
<i>ORN</i>			
D4	98.07±1.86	96.62±2.29	0.51
D7	97.36±2.33	96.71±1.83	0.82
<i>LYS</i>			
D4	4.61±1.04	4.90±1.58	0.65
D7	13.44±3.69	6.73±0.42	0.70

Mean ± standard error of the mean of the concentration of amino acid in µmol/g of uterine washings for large follicle-large CL group (LF-LCL; Exp 1 n=12; Exp 2 n= 9) and small follicle-small CL group (SF-SCL; Exp 1 n=7; Exp 2 n= 10).

Apêndice A

Figure 2. Individual and mean concentrations of alanine in uterine washings from D4 and D7 of diestrus. Each gray dot indicates an individual animal. Blue dots indicate mean±sem. LF-LCL indicates Large Follicle-Large CL group and SF-SCL indicates Small Follicle-Small CL group.

Figure 3. Individual and mean concentrations of taurine in uterine washings from D4 and D7 of diestrus. Each gray dot indicates an individual animal. Blue dots indicate mean±sem. LF-LCL indicates Large Follicle-Large CL group and SF-SCL indicates Small Follicle-Small CL group.

Apêndice A

Figure 4. Individual and mean concentrations of α -aminobutyric acid in uterine washings from D4 and D7 of diestrus. Each gray dot indicates an individual animal. Blue dots indicate mean $\pm$ sem. LF-LCL indicates Large Follicle-Large CL group and SF-SCL indicates Small Follicle-Small CL group.

Figure 5. Individual and mean concentrations of valine in uterine washings from D4 and D7 of diestrus. Each gray dot indicates an individual animal. Blue dots indicate mean $\pm$ sem. LF-LCL indicates Large Follicle-Large CL group and SF-SCL indicates Small Follicle-Small CL group.

Apêndice A

Figure 6. Individual and mean concentrations of cystathionine in uterine washings from D4 and D7 of diestrus. Each gray dot indicates an individual animal. Blue dots indicate mean $\pm$ sem. LF-LCL indicates Large Follicle-Large CL group and SF-SCL indicates Small Follicle-Small CL group.

DISCUSSION

Disappointing fertility success in beef cow industry is mainly caused by excessive rates of embryonic mortality during early pregnancy, which has been linked to inadequate endometrial receptivity [40, 41]. During early pregnancy, the mother needs to provide the optimal uterine micro-environment towards the embryo in order to facilitate initial embryonic-maternal interactions leading to subsequent implantation [42]. However, the exact definition of an optimal embryonic micro-environment during early pregnancy remains to be elucidated. As previous studies pointed towards the importance of greater concentrations of AA in the uterus to increase fertility outcome in dairy cows [9], this study attempted to investigate the link between pathways of metabolism of AAs and beef cow fertility during early diestrus. Therefore, we characterized AA transport and metabolic pathways in endometrium and AA levels in the uterine lumen on days 4 and 7 after induction of ovulation in response to different endocrine profiles. Furthermore, the study was conducted in cyclic, non-inseminated cows based on the previous report by Forde et al. [43]. In that report, authors indicated that from the first week of diestrus until after Day 13, pregnant cow endometrium undergoes molecular changes similar to those of cyclic cows endometrium. Thus, it is reasonable to assume that treatment effects observed in the present report would be similar, were there embryos present.

In this context, a previously described *in vivo* receptivity model was used here [26, 32, 36, 38] aiming to define the AA signatures of the receptive endometrial tissues and histotroph. Using this same

Apêndice A

model, we were able to manipulate two fundamental aspects of receptivity: compared to the LF-LCL group, fertility was less in the SF-SCL group (i.e., the low receptivity group) [27] and concentration of PGR in the endometrium was greater in that same group on D7 of the estrous cycle [37]. More specifically, data on bovine endometrial tissue transcriptome associated with AA transport has been integrated with information on uterine flushing AA profiles from high receptive (LF-LCL) versus low receptive (SF-SCL) cows groups. In beef cattle, altered endocrine patterns during follicle growth are known to influence the follicular size and steroidogenic capacity before ovulation [44]. Thereby, corpora lutea originating from larger follicles are characterized by larger sizes, resulting in greater circulating concentrations of P4 compared to those originating from smaller follicles [45, 46]. In our study, POF influenced CL size and plasmatic levels of P4 on D7 but not on D4. It is important to summon up that CL is a transient endocrine organ that starts to develop after ovulation, when theca and granulosa cells differentiate into luteal cells [47]. The D4 and D7 CL are considered to be in different stages of development [48, 49]. Specifically, at D4 CL is under early development and did not achieve a large enough area to show differences in P4 production such as on D7. Interestingly, gene expression related to P4 production indicated a greater capacity for P4 production at D7 than at D4 [49]. In cattle, POF size is directly related to E2 production [50, 51], that suggests that POF size and probably circulating concentrations of E2 influenced uterine environment and endometrial gene expression on D4 and D7.

The uterine flushing AA signatures show that on D4, concentrations of taurine, alanine and α -aminobutyric acid in uterine flushings were greater in uterine lumen of SF-SCL group, which in this animal model represents the low receptive uterus. The mRNA of *SCLY*, the enzyme related to alanine production, was up-regulated in LF-LCL group. Moreover, *SLC6A6* mRNA, which transports β -alanine and mainly taurine, was more abundant in endometrium of cows from LF-LCL group. A collective interpretation of these data suggests that alanine biosynthesis was stimulated in the LF-LCL group, as well as its transport, mainly is a lumen-to-endometrium direction. Stimulating accumulation of alanine in the endometrium may be important for endometrial cellular functions, such as proliferation, to guarantee endometrial receptivity. Alternatively, in accordance to data on cardiomyocytes, excess supplementation of AA may downregulate its transporter [52]. This relationship could explain the findings on the SF-SCL group.

Although bovine early embryos are supposed to use all available AAs, alanine was the only one not used, and even secreted by the embryo [53]. This suggests that regulation of this AA, which is available in greater concentration in low receptive than in high receptive uterus, plays no major role for early embryonic development. Taurine, which was more abundant in SF-SCL group, seems to be beneficial for embryonic development [54], however, the addition of elevated dose of cysteamine, a

Apêndice A

taurine precursor, to embryo culture media was toxic to the bovine embryo [55]. Supplementation of α -aminobutyric acid to embryo culture medium did not affect porcine embryo cell viability [56]. Similar to alanine transport, *SLC38A1* is a transporter with high affinity for glutamine and it was more abundant in the high receptive endometrial tissue than in low receptive tissues, whereas glutamine tended to be more abundant in uterine washings of low receptive group. These data can be associated to the major proliferative activity found in LF-LCL endometrium on D4, which was related to adequate uterus conditioning for receiving the embryo [39]. This proliferative activity may also be the responsible for the observation of an increase in transporter abundance without an associated increase in the concentration of the target substrate in uterine lumen. Indeed, glutamine is essential for cell proliferation in other tissues [57].

On D7, regulation of AA transporter transcript abundance and cognate substrates is complex, and several scenarios were observed. For example, *SLC1A4* was more abundant in endometrium of LF-LCL cows, although its direct targets, serine, tyrosine, threonine, were present in similar concentrations in the uterine lumen of cows of both groups. Likewise, *SLC38A1* and *SLC38A7* transcripts were up-regulated in endometrium of LF-LCL group on D7. These transporters have high affinity for glutamine transport, but this AA was present in similar concentration in uterine lumen of both groups. In contrast, regardless of a similar abundance of transporter *SLC7A11* between groups on days 4 and 7, cystathionine, a product of serine and homocysteine condensation by cystathionine β -synthase [58], and valine were present in greater concentrations in the uterine washing of cows from LF-LCL group compared to cows from the SF-SLC group. In a third scenario, *SLC6A14* and one of its transporting targets, valine, was stimulated in the LF-LCL group. Correspondingly, in human cervix, an increase in *SLC6A14* mRNA was associated with a parallel increase in protein [59]. Interestingly, after the 4 cell stage, valine, along with leucine, isoleucine, and methionine, was favorable for cleavage rates of the diploids after compaction and increased total number of cells in the blastocyst and inner cell mass [60]. *SLC7A8* transcript was up-regulated in LF-LCL endometrium on D7 and this carrier transports neutral AAs such as valine, which is also up-regulated in LF-LCL group. *SLC7A8* is also responsible for alanine transport. Despite the fact that concentration of alanine in uterine washings is similar for both groups, transcript abundance of *DDO*, an enzyme related to alanine degradation is up-regulated in LF-LCL group. Perhaps there is a requirement to strictly control luminal concentrations of alanine on D7.

In this study, quantification of AAs was conducted using uterine washings, composed of histotroph diluted in 20 ml of PBS. Such method of quantification is appropriate for estimating AAs availability in uterus.

Collectively, the present data suggest that in the more receptive uterine phenotype, on D4, AAs transport and metabolic pathways are directed to supply endometrial requirements for growth and

Apêndice A

function. Coincidentally, around D4, embryos have a limited demand for AAs and they are in transit from the oviduct to the uterus. Thus, the AA composition of the histotroph reflects more the endometrial demands for proper function than a milieu for embryonic development. More interestingly, on D7, when embryo is expected to be in uterus, AAs are more abundant in uterine secretions of LF-LCL group, probably to serve as a supply to meet embryonic requirements. Correspondingly, transcript abundance data show a greater number of AA transporters that are upregulated in the more receptive endometrium on D7. This phenotype is probably associated with the embryo greater AA requirement needed for the subsequent stages of development (i.e., hatching and elongation). In terms of sex steroid regulation of such processes, D4 phenotype reflects estradiol classical actions that include stimulus to endometrial cell proliferation, while D7 phenotype is associated with progesterone actions, such as glandular secretory activity and histotroph formation to support embryonic growth [4, 39, 61-63]. A summarized view of the AA transport systems in the endometrium, in association with receptivity during early diestrus is presented in figure 7. To the best of our knowledge, this is the first investigation that relates early diestrus temporal changes in AA transport and availability in the uterine lumen to different peri-ovulatory endocrine patterns that characterize fertility phenotypes. This study points to an important link between pathways to metabolism of AAs in the endometrium and uterine receptivity. Besides, these data can be a basis for novel studies in bovine reproduction biotechnology with the aim to develop new tools to improve beef cattle fertility and profitability.

CONCLUSIONS

This study showed that the AA transporters transcript abundance in the endometrium is linked with the receptive state of the endometrial tissue at both D4 and D7. Also the uterine flushing AA patterns are different between contrasting receptivity status of cows, both at D4 and at D7. The latter data indicate that AA metabolism and transport can be a potential key that needs to be regulated in order to fine-tune the maternal receptive state during early diestrus.

Apêndice A

Figure 7. Amino acid transport in the uterus of cows on D4 and D7 of diestrus. This figure shows the comparative abundance of transcripts related to amino acid (AA) transport and metabolism and the luminal concentration of AA between more receptive endometrium (Large Follicle-Large Corpus Luteum group) and less receptive endometrium (Small Follicle-Small Corpus Luteum group) on D4 and D7 after estrus. On D4, the transport of AA seems to occur preferentially from the uterine lumen towards endometrial cells, because despite elevated expression of genes related to AA transporters in endometrium there is lower availability of AA in uterine washings. Such direction of transport benefits events such as cell proliferation, which requires AA. On D7, AA availability in uterine lumen and abundance of genes related to AA transport are both stimulated in the more receptive endometrium. This phenotype is consistent with a greater provision of substrates to support embryonic needs for growth. ↑, up-regulated in LF-LCL group in comparison to SF-SCL group; ↓ down-regulated in LF-LCL group in comparison to SF-SCL group; γ, carriers related to transport of AAs similarly abundant in the lumen of both groups. Solid lines connect a transporter with its cognate substrate(s); *, $P \leq 0.05$; #, $P < 0.1$; SLC, Solute carrier protein; SCLY, Selenocysteine Lyase; DDO, D-aspartate Oxidase.

Apêndice A

List of abbreviations

AA - amino acid
AAAB - α -amino butyric acid
AAD - α -amino adipic acid
ALA - alanine
ANOVA - analysis of variance
ASN - asparagine
ASNS - asparagine synthase
B-ALA - β -alanine
cDNA - complementar deoxyribonucleic acid
CL - corpus luteum
CYS - cysteine
DDO - D-aspartate oxidase
E2 - estradiol
GLN - glutamine
GLU - glutamate
GLY - glycine
GnRH - gonadotrophin releasing hormone
GPT - glutamic-pyruvate transaminase
HPLC - high capacity liquid chromatography
HYS - histidine
ILE - isoleucine
LF-LCL - large follicle-large CL group
LYS – lysine
MET - methionine
ORN - ornithine
P4 - progesterone
PBS - phosphate buffer solution
PHE - phenylalanine
POF - pre-ovulatory follicle
PRO - proline
PROC GLM - general linear models procedure
qRT-PCR - real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction
RNA - ribonucleic acid
SCLY - selenocysteine lyase
SER - serine
SF-SCL - small follicle-small CL group
SLC - solute carrier protein
TAU - taurine
THR - threonine
TRP - tryptophan
TYR - tyrosine
VAL - valine

Apêndice A

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

Animal procedures were approved by the Ethics and Animal Handling Committee of the University of São Paulo (protocol 2280/2011). The experiments were conducted at the University of São Paulo, Pirassununga, Brazil.

Consent for publication

Not Applicable.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

Competing interests

"The authors declare that they have no competing interests."

Funding

FAPESP 2014/01727-4 to MISS

CNPq- 481199/2012-8 and FAPESP- 2011/03226-4 to MB

CNPq 140527/2013-3 to MRF

The funding bodies had no participation on the study, collection, analysis, interpretation of data nor in writing the manuscript.

Authors' contributions

MFR contributed to animal management, qPCR analysis, statistical analysis of transcripts and amino acids data and was a major contributor in writing the manuscript. MISS contributed to animal management, performed samples preparation for qPCR analysis and performed qPCR analysis. GP performed animals and reproductive management, statistical analysis of follicle, corpus luteum and progesterone data and contributed in writing the manuscript. VVH contributed in writing the manuscript. MB was the PI and contributed to experiment design and writing the manuscript.

Acknowledgements

Authors wish to thank FAPESP, CNPq and CAPES for financial support and scholarships, Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil for providing drugs and hormones, Dr. Messias Alves da Trindade Neto, faculty, post-doctoral fellows, students and staff of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo for technical support.

Authors' information (optional)

Not applicable.

REFERENCES

Apêndice A

1. Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT, Morgan GL: **Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle.** *J Reprod Fertil* 1988, **84**:437-446.
2. Satterfield MC, Song G, Kochan KJ, Riggs PK, Simmons RM, Elsik CG, et al.: **Discovery of candidate genes and pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and conceptus elongation.** *Physiol Genomics* 2009, **39**:85-99.
3. Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, et al.: **Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers.** *Reprod Fertil Dev* 2008, **20**:368-375.
4. Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Spencer TE, et al.: **Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle.** *Biol Reprod* 2009, **81**:784-794.
5. Clemente M, de La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, et al.: **Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium?** *Reproduction* 2009, **138**:507-517.
6. Demetrio DG, Santos RM, Demetrio CG, Vasconcelos JL: **Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows.** *J Dairy Sci* 2007, **90**:5073-5082.
7. Spencer TE, Bazer FW: **Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals.** *J Anim Sci* 2004, **82 E-Suppl**:E4-13.
8. Gao H, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Li X, Bazer FW: **Select nutrients in the ovine uterine lumen. I. Amino acids, glucose, and ions in uterine luminal flushings of cyclic and pregnant ewes.** *Biol Reprod* 2009, **80**:86-93.
9. Meier S, Mitchell MD, Walker CG, Roche JR, Verkerk GA: **Amino acid concentrations in uterine fluid during early pregnancy differ in fertile and subfertile dairy cow strains.** *J Dairy Sci* 2014, **97**:1364-1376.
10. Hugentobler SA, Diskin MG, Leese HJ, Humpherson PG, Watson T, Sreenan JM, et al.: **Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine.** *Mol Reprod Dev* 2007, **74**:445-454.
11. Hugentobler SA, Sreenan JM, Humpherson PG, Leese HJ, Diskin MG, Morris DG: **Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood.** *Reprod Fertil Dev* 2010, **22**:684-694.
12. Forde N, Simintiras CA, Sturmey R, Mamo S, Kelly AK, Spencer TE, et al.: **Amino Acids in the Uterine Luminal Fluid Reflects the Temporal Changes in Transporter Expression in the Endometrium and Conceptus during Early Pregnancy in Cattle.** *PLoS One* 2014, **9**:e100010.
13. Steeves TE, Gardner DK: **Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture.** *Biol Reprod* 1999, **61**:731-740.
14. Daniel JC, Krishnan RS: **Amino acid requirements for growth of the rabbit blastocyst in vitro.** *J Cell Physiol* 1967, **70**:155-160.

Apêndice A

15. Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K: **Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium.** *Biol Reprod* 1993, **48**:1320-1325.
16. Smith RJ, Dean W, Konfortova G, Kelsey G: **Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation.** *Genome Res* 2003, **13**:558-569.
17. Groebner AE, Rubio-Aliaga I, Schulke K, Reichenbach HD, Daniel H, Wolf E, et al.: **Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation development.** *Reproduction* 2011, **141**:685-695.
18. Gao H, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW: **Select nutrients in the ovine uterine lumen. ii. glucose transporters in the uterus and peri-implantation conceptuses.** *Biol Reprod* 2009, **80**:94-104.
19. Partridge RJ, Leese HJ: **Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos.** *Reprod Fertil Dev* 1996, **8**:945-950.
20. Donnay I, Leese HJ: **Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst.** *Mol Reprod Dev* 1999, **53**:171-178.
21. Morris DG, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM: **Amino acid turnover by elongating cattle blastocysts recovered on days 14-16 after insemination.** *Reproduction* 2002, **124**:667-673.
22. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, et al.: **Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity.** *Hum Reprod* 2002, **17**:999-1005.
23. Sturmey RG, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese HJ, Lonergan P: **Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability.** *Mol Reprod Dev* 2010, **77**:285-296.
24. Setoyama C, Miura R: **Structural and functional characterization of the human brain D-aspartate oxidase.** *J Biochem* 1997, **121**:798-803.
25. Mihara H, Kurihara T, Watanabe T, Yoshimura T, Esaki N: **cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteine lyase. Candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis.** *J Biol Chem* 2000, **275**:6195-6200.
26. Mesquita FS, Pugliesi G, Scolari SC, França MR, Ramos RdS, Oliveira ML, et al.: **Manipulation of the periovulatory sex-steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression on early diestrus Nelore cows.,** vol. in press. *Theriogenology: Theriogenology*; 2014.
27. Pugliesi G, Santos FB, Lopes E, Nogueira É, Maio JR, Binelli M: **Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI.** *Theriogenology* 2016, **85**:1239-1248.
28. Bazer FW: **Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus.** *J Anim Sci* 1975, **41**:1376-1382.
29. Roberts RM, Bazer FW: **The functions of uterine secretions.** *J Reprod Fertil* 1988, **82**:875-892.

Apêndice A

30. Kane MT, Morgan PM, Coonan C: **Peptide growth factors and preimplantation development.** *Hum Reprod Update* 1997, **3**:137-157.
31. Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM: **Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term.** *Anim Reprod Sci* 2000, **58**:39-44.
32. França MR, Mesquita FS, Lopes E, Pugliesi G, Van Hoeck V, Chiaratti MR, et al.: **Modulation of periovulatory endocrine profiles in beef cows: consequences for endometrial glucose transporters and uterine fluid glucose levels.** *Domest Anim Endocrinol* 2015, **50**:83-90.
33. Garbarino EJ, Hernandez JA, Shearer JK, Risco CA, Thatcher WW: **Effect of lameness on ovarian activity in postpartum holstein cows.** *J Dairy Sci* 2004, **87**:4123-4131.
34. White JA, Hart RJ, Fry JC: **An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials.** *J Automat Chem* 1986, **8**:170-177.
35. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al.: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biol* 2002, **3**:RESEARCH0034.
36. Ramos RS, Oliveira ML, Izaguirry AP, Vargas LM, Soares MB, Mesquita FS, et al.: **The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows.** *Reprod Biol Endocrinol* 2015, **13**:39.
37. Araújo ER, Sponchiado M, Pugliesi G, Van Hoeck V, Mesquita FS, Membrive CM, et al.: **Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract.** *Reprod Fertil Dev* 2014.
38. Ramos RoS, Mesquita FS, D'Alexandri FL, Gonella-Diaza AM, Papa PeC, Binelli M: **Regulation of the polyamine metabolic pathway in the endometrium of cows during early diestrus.** *Mol Reprod Dev* 2014, **81**:584-594.
39. Mesquita FS, Ramos RS, Pugliesi G, Andrade SC, Van Hoeck V, Langbeen A, et al.: **The Receptive Endometrial Transcriptomic Signature Indicates an Earlier Shift from Proliferation to Metabolism at Early Diestrus in the Cow.** *Biol Reprod* 2015, **93**:52.
40. Minten MA, Bilby TR, Bruno RG, Allen CC, Madsen CA, Wang Z, et al.: **Effects of fertility on gene expression and function of the bovine endometrium.** *PLoS One* 2013, **8**:e69444.
41. Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM: **Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions.** *Anim Reprod Sci* 2006, **96**:297-311.
42. Cavagna M, Mantese JC: **Biomarkers of endometrial receptivity--a review.** *Placenta* 2003, **24 Suppl B**:S39-47.
43. Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, et al.: **Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant?** *Biol Reprod* 2011, **85**:144-156.
44. Stegner JE, Kojima FN, Bader JF, Lucy MC, Eilersieck MR, Smith MF, et al.: **Follicular dynamics and steroid profiles in cows during and after treatment with progestin-based protocols for synchronization of estrus.** *J Anim Sci* 2004, **82**:1022-1028.

Apêndice A

45. Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC: **Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate.** *Theriogenology* 2001, **56**:307-314.
46. Pfeifer LF, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Small JA, Adams GP, Dionello NJ, et al.: **Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle.** *Theriogenology* 2009, **72**:1237-1250.
47. Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN: **Molecular mechanisms of ovulation and luteinization.** *Mol Cell Endocrinol* 1998, **145**:47-54.
48. Redmer DA, Grazul AT, Kirsch JD, Reynolds LP: **Angiogenic activity of bovine corpora lutea at several stages of luteal development.** *J Reprod Fertil* 1988, **82**:627-634.
49. Park HJ, Park SJ, Koo DB, Kong IK, Kim MK, Kim JM, et al.: **Unfolding protein response signaling is involved in development, maintenance, and regression of the corpus luteum during the bovine estrous cycle.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **441**:344-350.
50. Lopes AS, Butler ST, Gilbert RO, Butler WR: **Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows.** *Anim Reprod Sci* 2007, **99**:34-43.
51. Nishimoto H, Hamano S, Hill GA, Miyamoto A, Tetsuka M: **Classification of bovine follicles based on the concentrations of steroids, glucose and lactate in follicular fluid and the status of accompanying follicles.** *J Reprod Dev* 2009, **55**:219-224.
52. Zhang Y, Yang L, Yang YJ, Liu XY, Jia JG, Qian JY, et al.: **Low-dose taurine upregulates taurine transporter expression in acute myocardial ischemia.** *Int J Mol Med* 2013, **31**:817-824.
53. Kuran M, Robinson JJ, Brown DS, McEvoy TG: **Development, amino acid utilization and cell allocation in bovine embryos after in vitro production in contrasting culture systems.** *Reproduction* 2002, **124**:155-165.
54. Takahashi Y, Kanagawa H: **Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of in vitro fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium.** *J Vet Med Sci* 1998, **60**:433-437.
55. Guyader-Joly C, Guérin P, Renard JP, Guillaud J, Ponchon S, Ménézo Y: **Precursors of taurine in female genital tract: effects on developmental capacity of bovine embryo produced in vitro.** *Amino Acids* 1998, **15**:27-42.
56. Whitaker BD, Knight JW: **Exogenous gamma-glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos.** *Theriogenology* 2004, **62**:311-322.
57. Ko TC, Beauchamp RD, Townsend CM, Thompson JC: **Glutamine is essential for epidermal growth factor-stimulated intestinal cell proliferation.** *Surgery* 1993, **114**:147-153; discussion 153-144.
58. Mendes MI, Santos AS, Smith DE, Lino PR, Colaço HG, de Almeida IT, et al.: **Insights into the regulatory domain of cystathionine Beta-synthase: characterization of six variant proteins.** *Hum Mutat* 2014, **35**:1195-1202.

Apêndice A

59. Gupta N, Prasad PD, Ghamande S, Moore-Martin P, Herdman AV, Martindale RG, et al.: **Up-regulation of the amino acid transporter ATB(0,+) (SLC6A14) in carcinoma of the cervix.** *Gynecol Oncol* 2006, **100**:8-13.
60. Van Thuan N, Harayama H, Miyake M: **Characteristics of preimplantational development of porcine parthenogenetic diploids relative to the existence of amino acids in vitro.** *Biol Reprod* 2002, **67**:1688-1698.
61. Arai M, Yoshioka S, Tasaki Y, Okuda K: **Remodeling of bovine endometrium throughout the estrous cycle.** *Anim Reprod Sci* 2013, **142**:1-9.
62. Reynolds LP, Kirsch JD, Kraft KC, Knutson DL, McClaflin WJ, Redmer DA: **Time-course of the uterine response to estradiol-17beta in ovariectomized ewes: uterine growth and microvascular development.** *Biol Reprod* 1998, **59**:606-612.
63. Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW: **Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals.** *Biol Reprod* 2004, **71**:2-10.
64. Bettgowda A, Patel OV, Ireland JJ, Smith GW: **Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro.** *Mol Reprod Dev* 2006, **73**:267-278.