# **EVERTON LOPES** Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório sobre a expressão de microRNAs e o sistema IL1/TLRs no endométrio bovino

# **EVERTON LOPES**

# Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório sobre a expressão de microRNAs e o sistema IL1/TLRs no endométrio bovino

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

De acordo:

Orientador(a)

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.3324 FMVZ Lopes, Everton

Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório sobre a expressão de microRNAs e o sistema IL1/TLRs no endométrio bovino / Everton Lopes. -- 2016.

93 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. Receptividade. 2. MicroRNAs. 3. Sistema imune. 4.Bovino. I. Título.

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO





# FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

# CERTIFICADO

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

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

São Paulo, 22 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni Presidente

# FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LOPES, Everton Título: <b>Efeito do ambi</b>	ente endócrino peri-ovulatório sobre a expressão de
	sistema IL1/TLRs no endométrio bovino
	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	
	Julgamento:
Prof. Dr.	
Instituição:	Julgamento:
Prof. Dr.	
Instituição:	Julgamento:
Prof. Dr.	
	Julgamento:

Prof. Dr.

Instituição: \_\_\_\_\_Julgamento: \_\_\_\_\_

# **AGRADECIMENTOS**

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.

Ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP, e aos seus professores.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo no período do Doutorado.

À FAPESP pelo suporte financeiro ao Projeto Assinaturas da Receptividade, no qual está inserido este trabalho.

Ao Professor Dr. Mario Binelli pela orientação durante o doutorado. Foi época de muito aprendizado e sua confiança sempre foi fonte de motivação. Obrigado pela parceria.

À Veerle Gringa Van Hoeck, pelo apoio imenso na parte científica e pela infinita amizade. Você derrama seu carisma e agrega as pessoas ao seu redor como poucos. Obrigado por esse aprendizado.

Fernando Mesquita, pela parceria, amizade durante o meu mestrado e doutorado.

Guilherme Pugliesi, amigo por quem tenho grande admiração pela pessoa que é.

Juliano da Silveira pela parceria. Sempre disponível para discussões e um estimado amigo.

Aos amigos e colegas do LFEM pelo convívio e pelas inúmeras ajudas.

Ao amigos e colegas do Departamento de Reprodução, a todos de Pirassununga e a todos de São Paulo.

Aos amigos e colegas do LMMD.

À Dra. Célia, pele enorme compreensão e apoio durante toda minha jornada.

À minha esposa Maria Clara, por seu companheirismo, dedicação e compreensão.

Ao meu pai, Dinoral, minha mãe Ana e meus irmãos, Angélica e Eder, por entenderem esse objetivo e abdicarem de muitas coisas para me apoiar sempre. Não chegaria tão longe sem o apoio de vocês.

# **RESUMO**

LOPES, E. Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório sobre a expressão de microRNAs e o sistema IL1/TLRs no endométrio bovino. [Effect of the periovulatory endocrine milieu on microRNAs expression and IL1/TLR systems in bovine endometrium]. 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Em bovinos, o desenvolvimento embrionário pré implantacional depende das funções do endométrio bovino que tem suas funções mediadas por uma complexa interação da ação e dos efeitos dos hormônios esteroides ovarianos E2 e P4. Estes hormônios regulam a expressão gênica e controlam o ambiente uterino modulando, entre outros, a expressão de microRNAs e a rede de citocinas relacionadas ao sistema imune. Os objetivos do presente trabalho foram abordados em dois capítulos, sendo (I) comparar os efeitos dos distintos ambientes endócrinos periovulatórios sobre a expressão de microRNAs (II) e na modulação do sistema IL1/TLR no endométrio bovino nos dias 4 e 7 após a indução da ovulação. Para isso, controlou-se farmacologicamente o crescimento do folículo objetivando induzir a ovulação de folículos de maior diâmetro (grupo folículo grande-CL grande, FG-CLG) ou de menor diâmetro (grupo folículo pequeno-CL Pequeno, FP-CLP). Vinte e duas vacas multíparas nelore, foram pré-sincronizadas, metade destes animais foram destinados para o grupo FG-CLG e receberam uma dose de prostaglandina F2a (PGF) e um dispositivo de progesterona, juntamente com benzoato de estradiol no D-10. No momento da retirada dos dispositivos de progesterona (entre D-1,75 e D-2,5) todos os animas receberam uma dose de PGF. A ovulação foi induzida com acetato de buserelina (D0). O que diferiu entre os tratamentos foi que os animais do grupo FP-CLP não receberam uma dose de PGF no D-10 e o momento da retirada dos dispositivos foi entre D-1,25 e o D-1,5. No capítulo I, o a expressão de microRNAs foi determinada por qPCR nos dias 4 e 7. Dos 90 microRNAs testados, 21 apresentaram se *up-regulated* e dois *down-regulated* no grupo FG-CLG (P<0.1) no D4. No D7, quatro microRNAs foram diferentemente expressos, sendo um upregulated e três down-regulated no grupo FG-CLG (P<0.1) no D7. Para os microRNAs diferentemente expressos determinou-se mRNA-alvos preditos. Uma análise de ontologia demonstrou que os mRNAs-alvos apresentaram enriquecimento funcional na via dos receptores de hormônios esteroides, entre outras. No capítulo II,

o sistema IL1/TLR foi avaliado quanto a abundância de transcriptos envolvidos neste sistema, do microRNA bta-mir-155 e das proteínas IL1β e IL1R1. A abundância relativa de mRNA apresentou diferença (P<0.1) na abundância dos mRNAs de *IL1R1, TAB1* e *FOXP3*, das proteínas IL1β e IL1R1, sendo essas moléculas *upregulated* no grupo FG-CLG. O microRNA bta-mir-155 foi *down-regulated* no grupo FG-CLG (P<0.1). Diante disto, pode-se concluir que o ambiente endócrino periovulatório determina o perfil de expressão de microRNAs e modula o sistema IL1/TLR no endométrio bovino.

Palavras-chave: Receptividade. MicroRNAs. Sistema Imune. Bovino.

# **ABSTRACT**

LOPES, E. Effect of the periovulatory endocrine milieu on microRNAs expression and IL1/TLR systems in bovine endometrium. [Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório sobre a expressão de microRNAs e o sistema IL1/TLRs no endométrio bovino]. 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In cattle, the pre implantation embryo development depends on the functions of the bovine endometrium that has its functions mediated by a complex interaction of action and the effects of ovarian steroid hormones E2 and P4. These hormones regulate gene expression and control the modulating uterine environment among others, the expression of microRNAs and the network of cytokines related to the immune system. The objectives of this study were discussed in two chapters, (I) to compare the effects of different peri-ovulatory endocrine environment on the expression of microRNAs (II) and modulation of the IL-1 system / TLR in bovine endometrium on days 4 and 7 after induction of ovulation. For this, it was controlled pharmacologically follicle growth aiming to induce ovulation of follicles larger diameter (great grand-CL follicle group, FG-CLG) or smaller in diameter (small-CL Small follicle group, FP-PLC). Twenty two nelore multiparous cows were pre-sync, half of these animals were used for the FG-NCG group and received a dose of F2á prostaglandin (PGF) and progesterone device along with oestradiol benzoate in D-10. Upon withdrawal of progesterone devices (between 1.75 and D-D-2,5) all animas received a dose of PGF. Ovulation was induced with buserelin acetate (D0). What differed between treatments was that animals FP-CLP group did not receive a dose of PGF in the D-10 and the time of removal of the devices was between D-1,25 and D-1.5. In Chapter I, the expression of microRNAs was determined by qPCR on 4 and 7. Of the 90 microRNAs tested, 21 showed was up-regulated and down-regulated in two FG-CLG group (P <0.1) in the D4. In D7 four microRNAs were differently expressed, one up-regulated and down-regulated in three FG-CLG group (P < 0.1) at D7. For differently expressed microRNAs was determined predicted mRNA-target. An ontology analysis showed that the mRNA-targets had functional enrichment in via the steroid hormone receptors, among others. In Chapter II, the IL-1 / TLR system was evaluated as the abundance of transcripts involved in this system, the bta-mir-155 microRNA and IL1 $\beta$  and IL1R1 proteins. The relative abundance of mRNA was different (P <0.1) in the abundance of mRNAs IL1R1, TAB1 and FOXP3, the IL1 $\beta$  and IL1R1 proteins, and these up-regulated molecules in the FG-CLG group. The bta-mir-155 microRNA was down-regulated in the FG-CLG group (P <0.1). Given this, we can conclude that the peri-ovulatory endocrine milieu determines the profile of microRNA expression and modulates the IL1 / TLR system in bovine endometrium.

Keywords: Receptivity. microRNA. Immune system. Bovine.

# LISTA DE ABREVIATURAS

μL microlitros

BE Benzoato de Estradiol

BS Coleta de Sangue cDNA DNA complementar

CL Corpo Lúteo
CL Corpo Lúteo

D0Dia 0D4Dia 4D7Dia 7

DEPC Dicarbonato de dietila

DNA Ácido Desoxirribonucléico

E2 Estradiol

E2α Receptor de E2

ERS1 Receptor de estradiol do tipo I

FG-CLG Folículo Grande – Corpo Lúteo Grande

FP-CLP Folículo Pequeno – Corpo Lúteo Pequeno

G Força gravitacional

GnRH Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

IATF Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IFN Interferon

IL Interleucina

IL1R1 Receptor de interleucina do tipo 1
IL1R2 Receptor de Interleucina do tipo 2

IL1RN Antagonista de Interleucina 1

IL1β Interleucina 1 beta

kDA Kilo Daltons

LH Hormônio Luteinizante

mL Mililitros

mRNA RNA mensageiro RNA mensageiro

ng nanogramas

NK *Natural Killers*°C Graus celsios

P4 Progesterona

PBMC Células mononucleares de sangue periférico

PBS Tampão salina fosfatado

PCA Análise de Componente Principal
PCR Reação da polimerase em cadeia

PGF2α Prostaglandina F 2α

PLS-DA Partial Least Square – Discriminant Analysis

PR Receptor de progesterona

PR-B Receptor de progesterona do tipo B
PR-C Receptor de progesterona do tipo C

PRMC Receptor de Progesterona de membrana celular

qPCR PCR em tempo real

RISC RNA-induced-silencing-complex

RNA Ácido Ribonucléico

RNASeq Sequenciamento de RNA

TLR Toll Like Receptors

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	MODULAÇÃO DE MICRORNAS NO ENDOMÉTRIO BOVINO NO DIESTR	
	INICIAL PELOS HORMÔNIOS ESTEROIDES PERI-OVULATÓRIOS	18
2.1	HIPÓTESE	22
2.2	OBJETIVOS	22
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	22
2.3.1	Animais e manejo reprodutivo	22
2.3.2	Extração de RNA total em amostras de endométrio no D4 e D7	26
2.3.3	Seleção de microRNAs para análise em amostras de endométrio no D4 e D7	26
2.3.4	Análise da abundância relativa dos microRNA entre os grupos FG-	•
	CLG e FP-CLP no D4 e D7 do ciclo estral	29
2.3.5	RNASeq	29
2.3.6	Determinação dos mRNA-alvos e análises de ontologia gênica e	
	enriquecimento funcional	
2.3.7	Análise estatística	31
2.4	RESULTADOS	32
2.4.1	Abundância relativa de microRNAs no D4 (Experimento 1)	32
2.4.2	Abundância relativa de microRNAs no D7 (Experimento 2)	35
2.4.3	Análises de ontologia gênica e enriquecimento funcional	39
2.5	DISCUSSÃO	42
2.6	CONCLUSÃO	45
3	EFEITO DO AMBIENTE ENDÓCRINO PERI-OVULATÓRIO SOBRE O	
	SISTEMA IL1/TLRS NO ENDOMÉTRIO BOVINO	46
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE	62

# 1 INTRODUÇÃO

Em bovinos, o período pré-implantacional da gestação (i.e., primeiras três semanas) é caracterizado por complexas interações bioquímicas entre o trato reprodutivo materno e o concepto em desenvolvimento. Perdas gestacionais nesse período são mais frequentes que em qualquer outro estádio da gestação (WILTBANK et al., 2016). A morte embrionária precoce é a principal causa de perdas gestacionais (DISKIN; MORRIS, 2008), e pode ser provocada por múltiplos fatores que incluem a qualidade dos gametas, a qualidade do embrião, e outros, relacionados ao funcionamento do trato reprodutivo feminino (i.e., ovário, oviduto e útero). De fato, a receptividade materna é influenciada principalmente pelo endométrio e suas secreções, as quais irão sustentar o embrião em seu desenvolvimento inicial (BREUEL et al., 1993). Assim, o sucesso gestacional depende de um embrião de boa qualidade e de um ambiente uterino receptivo (WALKER et al., 2010).

Durante a primeira semana, o desenvolvimento embrionário é independente do contato com as tubas uterinas e útero, porém, a passagem do embrião ao longo do trato reprodutivo materno concede ao primeiro melhores condições de desenvolvimento (RIZOS et al., 2002). Nesta fase, o embrião in vivo se desenvolve sob influência do fluido uterino, proveniente de secreções das glândulas endometriais e que tem sua composição determinada pelas alterações temporais estabelecidas pela fase do ciclo estral e pela comunicação materno embrionária (MUÑOZ et al., 2012). Os esteroides sexuais são os principais controladores do funcionamento uterino durante o ciclo estral e a gestação inicial. Neste período, a expressão gênica no endométrio é regulada principalmente pela ação combinada dos hormônios ovarianos, estradiol (E2) e progesterona (P4) (BAUERSACHS; WOLF, 2013; MESQUITA et al., 2015). Estes hormônios controlam a expressão gênica temporal e espacial de genes regulatórios requeridos como parte da cascata bioquímica que coordena o desenvolvimento embrionário precoce, preparando o endométrio para a implantação (SPENCER; SANDRA; WOLF, 2008; FORDE et al., 2009; ARAUJO et al., 2014; GONELLA-DIAZA et al., 2015).

A concentração circulante de P4 na primeira semana da gestação afeta positivamente a probabilidade de sobrevivência do embrião em bovinos (SPENCER;

SANDRA; WOLF, 2008). Esta maior sobrevivência pode advir da melhor modulação da receptividade endometrial já que o endométrio tem suas funções controladas por uma complexa interação dos hormônios esteroides, E2 e P4, os quais agem se ligando aos seus receptores nucleares clássicos (BAUERSACHS; WOLF, 2013), e não genômicos (GELLERSEN; FERNANDES; BROSENS, 2009). Durante o período pré-implantacional, entre os dias 15 e 19 pós-inseminação, as interações entre o concepto e o endométrio são influenciadas pela P4 secretada pelo corpo lúteo e pelo interferon-t (IFN-t) sintetizado pelo trofectoderma, sendo ambos necessários para o reconhecimento materno, estabelecimento e manutenção da gestação (BAZER et al., 2008), e responsáveis pela regulação da expressão gênica e composição do histotrofo. Assim, o concepto viável deve ser capaz de secretar IFN-T suficiente para inibir os mecanismos envolvidos na indução da luteólise (THATCHER et al., 2001). A P4 estimula e mantém a função endometrial auxiliando o crescimento do concepto, implantação e placentação (SPENCER; BAZER, 2004), e controla a expressão gênica temporal e espacial de genes regulatórios requeridos como parte da cascata bioquímica que controla o desenvolvimento embrionário precoce, preparando o endométrio para a implantação (SPENCER; SANDRA; WOLF, 2008; FORDE et al., 2009; ARAUJO et al., 2014; GONELLA-DIAZA et al., 2015). Concentrações menores de P4 circulante diminuem a taxa de recuperação de embriões, bem como o comprimento do concepto (FORDE et al., 2011) e, possivelmente, sua capacidade de desenvolvimento (CARTER et al., 2008) e secreção de IFN-T (MAMO et al., 2012; O'HARA et al., 2014). Desta maneira, o endométrio bovino tem suas funções mediadas por uma complexa interação da ação e dos efeitos dos hormônios esteroides ovarianos E2 e P4, os quais regulam a expressão gênica nesse tecido (BAUERSACHS; WOLF, 2012; ARAUJO et al., 2014; MESQUITA et al., 2014, 2015). Como consequência, o endométrio passará por mudanças na sua composição, seu estado funcional e de diferenciação (BAUERSACHS et al., 2005), de forma temporal e região-dependente (ARAUJO et al., 2014). Logo, a exposição da tuba uterina e do endométrio aos hormônios esteroides ovarianos é fundamental para os eventos relacionados à fecundação e ao desenvolvimento embrionário. De fato, a concentração plasmática de P4 é positivamente associada com a probabilidade de sucesso gestacional (DEMETRIO et al., 2007). O tamanho do folículo pré-ovulatórios está relacionado à sua capacidade de produção de E2 e, ainda, com o tamanho do corpo lúteo formado a partir de sua ovulação. Desta forma, a ovulação de maiores folículos pré-ovulatórios, gera corpos lúteos maiores, os quais apresentam associação positiva com P4 circulante (VASCONCELOS et al., 2001; LÜTTGENAU et al., 2011) e taxas de concepção (PERES et al., 2009).

Diante disto, é evidente a importância dos hormônios ovarianos no período peri-ovulatório e pré-implantacional os quais conduzem o endométrio a alterações na sua composição e diferenciação. Porém, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ação destes hormônios ao longo do ciclo estral. Neste contexto, nosso grupo recentemente descreveu um modelo para manipular o crescimento do folículo pré-ovulatório visando gerar grupos de vacas de corte com concentrações circulantes distintas de E2 pré-ovulação e P4 pós-ovulação (MESQUITA et al., 2014). Desta forma, dois grupos foram gerados a partir da manipulação farmacológica da dinâmica folicular ovariana: (1) grupo folículo grande - corpo lúteo grande (FG-CLG), e (2) grupo folículo pequeno - corpo lúteo pequeno (FP-CLP), descrita detalhadamente na seção material e métodos do Capítulo I. Mesquita et al, (2014) comprovaram a eficácia do protocolo em gerar dois fenótipos com diferentes tamanhos de folículos pré-ovulatórios. O grupo FG-CLG apresentou maior folículo dominante e pré-ovulatório, assim como o corpo lúteo resultante desse folículo ovulado em relação àqueles do grupo FP-CLP. Considerando D0 o dia da indução da ovulação, as concentrações circulantes de E2 nos dias D-2 e D0, e P4 no D7 também apresentaram se maior no grupo FG-CLG, em relação ao grupo FP-CLP (MESQUITA et al., 2014). Testado em programas de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), este modelo de manipulação do crescimento folicular demonstrou que vacas de corte com folículos pré-ovulatórios maiores e, consequentemente CLs maiores, apresentam taxa de gestação mais elevada que vacas com folículos pré-ovulatórios e CLs menores considerando todos os animais, ou apenas animais que ovularam (PUGLIESI et al., 2016). Isto sugere a ação destes hormônios esteroides na receptividade uterina e não apenas a influência de folículos pré-ovulatórios menores resultarem em menor taxa de ovulação comparado a folículos grandes (PUGLIESI et al., 2016). Neste sentido, níveis elevados de E2 ao longo do pró-estro e estro aumentam as taxas de gestação em gado de corte (SA FILHO et al., 2011). Adicionalmente, a suplementação com P4 em animais com folículo pequeno foi capaz de reverter as baixas taxas de fertilidade neste grupo, sugerindo sua ação na modulação do endométrio para aumentar a fertilidade (PUGLIESI et al., 2016).

O modelo acima descrito permitiu a realização de um amplo estudo sobre o funcionamento uterino em suas bases moleculares em ambientes endócrinos periovulatório distintos. A análise do transcriptoma utilizando RNASeq no dia 7 do ciclo estral (i.e., 7 dias após a indução da ovulação pelo GnRH), indicou enriquecimento na via de proliferação celular no grupo FP-CLP e das vias de biossíntese e metabolismo no grupo FG-CLG (MESQUITA et al., 2015). O estudo contempla também vias específicas, como as poliaminas (RAMOS et al., 2014), transportadores de glicose (FRANÇA et al., 2015), estresse oxidativo (RAMOS et al., 2015) e receptores de E2 e P4 (BINELLI et al., 2014).

Tais análises reforçam o papel fisiológico do E2 e P4 para preparação do endométrio e histotrofo para o desenvolvimento embrionário, modulando os mecanismos pelos quais a receptividade uterina é promovida. As análises globais apontam para a necessidade de se ampliar o conhecimento da receptividade uterina no diestro inicial, principalmente no que concerne ao controle do transcriptoma e do papel do sistema imune. Desta forma, incialmente é necessária uma maior compreensão sobre as vias de regulação do transcriptoma. Dentre os fatores de transcrição, uma classe importante são os receptores de esteroides. Os receptores de E2 e P4 são exemplo de fatores de transcrição e podem determinar o perfil de expressão dos microRNAs (YANG; WANG, 2011). Os microRNAs são importantes reguladores do transcriptoma em condições patológicas (HAILEMARIAM et al., 2014; PONSUKSILI et al., 2014) e fisiológicas (BURNS et al., 2014; KRAWCZYNSKI et al., 2015). Essas moléculas são expressas ao longo de todo o ciclo estral em bovinos (PALMA-VERA; SHARBATI; EINSPANIER, 2015). Neste contexto, levantamos a hipótese que o ambiente endócrino peri-ovulatório modula a abundância de microRNAs no endométrio bovino.

Além dessa modulação do transcriptoma, existem evidências que dentre as alterações promovidas pela P4 no útero estejam as que envolvam a imunomodulação do endométrio. Em bovinos, a ativação do sistema imune ou inflamação externa ao trato reprodutivo pode levar à morte embrionária (HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004). Por outro lado, 50% dos antígenos fetais são de origem paterna e, após a eclosão do embrião, antígenos e complexos de histocompatibilidade maior e menor são expostos (GROEBNER et al., 2011), desafiando o sistema imune do endométrio e exigindo deste uma coordenação entre a resposta imune inata e a adaptativa (HUNT; LANGAT, 2009), que envolve

elementos celulares e humorais. Desta maneira, o ambiente uterino deve apresentar uma regulação precisa do sistema imune materno para o desenvolvimento do embrião (MUÑOZ et al., 2012) desde os estádios iniciais. Paula Lopes et al. (1998) demonstraram o desenvolvimento embrionário mediado por IL1β. Além disso, os níveis de expressão proteica da IL1β foram maiores em animais que receberam embriões transferidos no início do ciclo (CORREIA-ÁLVAREZ et al., 2015). Assim, a modulação diferencial do sistema imune no endométrio bovino poderia ser um dos componentes que resultam em melhor fertilidade obtida em animais com maiores concentrações circulantes E2 no pró-estro e P4 no diestro inicial. Desta maneira, temos como objetivos gerais: (1) avaliar a abundância relativa de microRNAs presentes no endométrio nos dias D4 e D7 após a indução da ovulação nos grupos FG-CLG e FP-CLP; (2) estudar as vias enriquecidas relacionadas aos mRNA-alvos preditos dos microRNAs diferentemente expressos entre os grupos FG-CLG e FP-CLP; (3) comparar entre os grupos FG-CLG e FP-CLP a expressão de moléculas importantes do sistema imune no endométrio no D7.

# Capítulo I

# 2 MODULAÇÃO DE MICRORNAS NO ENDOMÉTRIO BOVINO NO DIESTRO INICIAL PELOS HORMÔNIOS ESTEROIDES PERI-OVULATÓRIOS

Revelados há cerca de 35 anos no modelo do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (HORVITZ, 1980), os microRNAs são pequenas moléculas de RNA com aproximadamente 22 nucleotídeos em fita simples, os quais participam no controle da expressão gênica (BAUMJOHANN; ANSEL, 2013). Essas moléculas possuem um papel fundamental na regulação pós-transcricional, sendo consideradas reguladoras-chave da expressão gênica em plantas e animais (MUGGENHUMER et al., 2014). Os microRNAs agem principalmente na degradação do mRNA-alvo ou na repressão traducional do mesmo (KUEHBACHER et al., 2007).

A maioria dos genes de microRNAs está localizada em regiões intergênicas, porém, existem genes de microRNAs alocados nas regiões intrônicas (KIM, 2005) e um conjunto de microRNAs está associado à expressão de outros genes (RODRIGUEZ et al., 2004). A transcrição dos microRNAs é regulada de modo similar à dos mRNAs. O controle da transcrição é um dos principais mecanismos da regulação da expressão de microRNAs em tecidos e fases de desenvolvimentos específicos (WINTER et al., 2009; KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010).

A gênese da molécula de microRNA ocorre a partir de precursores primários denominados pri-microRNAs ou microRNA primários, sendo estes formados a partir da transcrição do gene para microRNA, (HAMMOND, 2015). Essa transcrição que origina o pri-microRNA é mais comumente realizada pelas enzimas RNA polimerase II ou III. A molécula do precursor possui uma complexa estrutura secundária, podendo conter moléculas de microRNA em forma de *hairpin*, cada molécula possuindo uma haste em dupla fita, sequências flanqueadoras e uma alça com bases com ausência de complementariedade (BAUMJOHANN; ANSEL, 2013). Para que a molécula inicial se torne o microRNA maduro são necessárias duas etapas de clivagem. A primeira clivagem realizada no núcleo celular, se dá pela ação da enzima Drosha, uma proteína de 160 kDA (KIM, 2005). Para que a clivagem seja realizada de maneira correta, também é necessária a presença do cofator DGCR8

formando assim o complexo microprocessador, que atua na retirada de uma das regiões da haste que apresenta dupla fita separando também a molécula desejada da região flanqueadora, originando assim, o precursor de microRNA (prémicroRNA~70-100 nucleotídeos) (WAHID et al., 2010). A segunda clivagem ocorre no citoplasma, quando a molécula de pré-microRNA é transportada até o receptor nuclear exportina-5, responsável pela transferência do pré-microRNA do núcleo celular para seu citoplasma (LUND et al., 2004). A partir daí, a enzima DICER associada com a proteína TRBP realiza a nova clivagem (WILSON et al., 2015) a partir da contagem de 22 nucleotídeos do terminal presente na molécula de prémicroRNA, retirando, então, as cadeias de microRNA de interesse. Assim, uma molécula de RNA dupla fita é gerada, a mesma sendo posteriormente incorporada ao complexo da família da proteína denominada Argonauta (WAHID et al., 2010). O microRNA é então incorporado ao RISC (RNA-induced-silencing-complex), num processo dinâmico, porém ainda pouco compreendido (HAMMOND, 2015). A microRNAs é regulação funcional pelos altamente sensível correspondentes entre os nucleotídeos 2-8 do microRNA no sentido 5'-3', região denominada seed (BRENNECKE et al., 2005; MENG et al., 2016) com arranjo conformacional determinado pelas Argonautas (LAMBERT; GU; ZAHLER, 2011). A ligação do microRNA com o mRNA irá suprimir a síntese proteica, silenciando, ou iniciando degradação do mRNA (VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006).

Os microRNAs estão envolvidos em processos biológicos, tais como controle do ciclo celular (BUENO; MALUMBRES, 2011), apoptose (PERNAUTE et al., 2014), diferenciação celular (MATHIEU; RUOHOLA-BAKER, 2013), hematopoiese (KUCHEN et al., 2010), metabolismo de insulina (FROST; OLSON, 2011), metabolismo de colesterol (BORREGO et al., 1999), regulação da esteroidogênese (HU et al., 2013), resposta imune (XIAO; RAJEWSKY, 2009; SUN et al., 2012; BAUMJOHANN; ANSEL, 2013), no controle na embriogênese (KROPP; SALIH; KHATIB, 2014), entre outros. Por outro lado, os microRNAs são regulados em algumas vias, e tem sua expressão determinada pelo ambiente no qual estão presentes. O feedback autorregulatório é um mecanismo comum de controle da expressão gênica e muito importante nos processos celulares. Os microRNAs participam da auto regulação suprimindo mRNA que codifica fatores envolvidos em sua biogênese, além de regular diretamente positiva ou negativamente seus fatores de transcrição (KROL; LOEDIGE; FILIPOWICZ, 2010). Desta forma, existem fortes

evidências de que a expressão de microRNAs é associada aos genes de mRNAs os quais hospedam suas sequências (RODRIGUEZ et al., 2004). Assim, diferentes condições fisiológicas e patológicas podem determinar o perfil de expressão dos microRNAs nos tecidos.

A regulação do transcriptoma pelos microRNAs no trato reprodutivo de várias espécies é objeto de estudos buscando elucidar mecanismos associados aos processos reprodutivos, como o crescimento folicular, a produção de esteroides ovarianos, a receptividade uterina e o desenvolvimento embrionário. Por exemplo, em um estudo de análise através de enriquecimento funcional de genes preditos, ZIELAK-STECIWKO et al., (2014) concluíram que os microRNAs regulam de modo global o desenvolvimento do folículo ovariano. A síntese de estradiol é estimulada em células da granulosa de camundongos (DAI et al., 2013). A expressão do mir-34 em gametas e embriões é importante para a fertilização e desenvolvimento embrionário (TSCHERNER et al., 2014). Em humanos, as evidências que os microRNAs apresentam uma expressão dinâmica ao longo do ciclo menstrual sugerem o papel destes na manutenção da homeostase no endométrio e mudanças na atividade dos microRNAs podem alterar a função endometrial (HULL; NISENBLAT, 2013). A perda gestacional precoce está associada à down regulation do cluster mir-17-19 (VENTURA et al., 2013), e a comunicação entre o endométrio e o embrião é realizada através do microRNA hsa-mir-30d (VILELLA et al., 2015). A comunicação entre endométrio e trofoblasto ocorre também em suínos e pode regular a expressão gênica na interface materno fetal (KRAWCZYNSKI et al., 2015). A secreção de microRNAs através de exossomas e micro vesículas também foi verificada no fluído luminal uterino de ovinos em animais cíclicos e gestantes (BURNS et al., 2014). O endométrio bovino apresenta a expressão de microRNAs ao longo de todo o ciclo, principalmente nas fases de transição entre a fase folicular e luteal, (PALMA-VERA; SHARBATI; EINSPANIER, 2015) e é regulado por fatores como o interferon-t (PALMA-VERA; EINSPANIER, 2016). Além disso, o perfil de expressão dos microRNAs no endométrio bovino é alterado por embriões produzidos in vitro ou in vivo (PONSUKSILI et al., 2014).

O sucesso da gestação em bovinos é regulado por eventos endócrinos, moleculares e celulares ajustados de forma sincronizada. O ambiente endócrino peri-ovulatório controla as alterações do transcriptoma no endométrio de modo temporal e espacial (ARAUJO et al., 2014). As alterações no transcriptoma do

oviduto (GONELLA-DIAZA et al., 2015) e no endométrio (MESQUITA et al., 2015) envolvem diversos genes e vias.

Acredita-se que o transcriptoma apresente controle em níveis póstranscricionais, pelos microRNAs e pode ser modulado no endométrio bovino por hormônios esteroides. Entretanto, pouco se sabe sobre a abundância dos microRNAs ao longo do ciclo, sua função na reprodução e se de fato, as alterações hormonais levariam a diferentes perfis de expressão no endométrio. Portanto, o objetivo neste capítulo foi determinar a abundância de microRNAs nos grupos FGCLG e FP-CLP nos dias 4 e 7 após a indução da ovulação, e testar a hipótese da modulação do ambiente endócrino sobre a abundância de microRNAs, nós avaliamos os mRNA-alvos preditos por softwares de bioinformática para maior compreensão dos mecanismos que podem estar relacionados à expressão de microRNAs no endométrio.

# 2.1 HIPÓTESE

O ambiente endócrino peri-ovulatório modula a abundância de microRNAs no endométrio bovino.

# 2.2 OBJETIVOS

Avaliar a abundância relativa de microRNAs presentes no endométrio nos dias D4 e D7 após a indução da ovulação nos grupos FG-CLG e FP-CLP.

Avaliar as vias enriquecidas dos mRNA-alvos preditos dos microRNAs diferentemente expressos entre os grupos FG-CLG e FP-CLP.

# 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

# 2.3.1 Animais e manejo reprodutivo

O experimento foi realizado no campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo, onde os animais foram mantidos a pasto suplementados com cana de açúcar e/ou silagem de milho, concentrado e minerais e água *ad libitum*.

Para gerar os tratamentos dentro do modelo animal, as ovulações de vinte e duas vacas multíparas, solteiras da raça Nelore (*Bos indicus*), sem anormalidades reprodutivas detectáveis pelo exame ginecológico, com escore de condição corporal entre 3 e 4 (0, magra; 5 obesa) em estágios aleatórios do ciclo estral foram sincronizadas de acordo com o protocolo hormonal demonstrado na figura 1. No modelo animal apresentado aqui e utilizado anteriormente por Mesquita et al. (2014), o objetivo foi manipular o ambiente endócrino peri-ovulatório, ou seja, as concentrações de E2 antes da ovulação e P4 pós ovulação, através da manipulação do tamanho do folículo pré-ovulatório. Para manipular o tamanho do folículo pré-

ovulatório, controlou-se a exposição do folículo dominante à P4 circulante e a duração de proestro. O princípio do protocolo utilizado no modelo animal baseou-se na conhecida ação da P4 na pulsatilidade de LH. Altas concentrações de P4 reduzem a pulsatilidade de LH e consequentemente reduzem o crescimento do folículo no período LH-dependente, portanto, bloqueiam o crescimento folicular. Outra característica deste modelo é a diferença de tempo na remoção do dispositivo de P4 entre os grupos. A antecipação da retirada do dispositivo no grupo FG-CLG estimula o crescimento dos folículos neste grupo sob concentrações baixas de P4 por maior tempo em relação ao grupo FP-CLP, permitindo a ovulação de folículos de maiores diâmetros.

PGF P4 device SF group

PGF P4 device PGF GnRH Slaughter

PGF GnRH Slaughter

Daily BS and ultrasound scanning

SF group

PGF GnRH Slaughter

Days from GnRH treatment

Figura 1 - Modelo experimental de modulação do crescimento folicular

Fonte: (MESQUITA et al., 2015)

Legenda: Modelo desenvolvido objetivando induzir a ovulação de folículos de maior diâmetro (grupo folículo grande, FG-CLG) ou de menor diâmetro (grupo folículo pequeno, FP-CLP). Vacas multiparas Nelore, não-lactantes, cíclicas e pré-sincronizadas, receberam (FG-CLG) ou não (FP-CLP) uma dose de PGF2α e um dispositivo de progesterona, juntamente com benzoato de estradiol (BE). Os dispositivos de progesterona foram removidos 24 horas antes, no grupo FG-CLG, em relação ao grupo FP-CLP. BS: amostras de sangue; foram coletadas diariamente a partir do D0.

Os animais receberam duas injeções de prostaglandina F2α (0,5 mg de Sincrocio<sup>®</sup>, Ourofino, Cravinos, SP, Brasil) com intervalo de 14 dias. Dez dias após a segunda injeção de prostaglandina F2α (doravante denominado dia experimental

-10 ou D-10) todos os animais receberam dispositivo intravaginal de segundo uso contendo P4 (Sincrogest<sup>®</sup>, Ourofino, Cravinos, SP, Brasil) juntamente com a aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ourofino, Cravinos, SP, Brasil). A partir do D-2, os ovários de todos os animais foram examinados diariamente por ultrassonografia para a identificação do folículo pré-ovulatório e no D0 os animais receberam uma injeção de um análogo do hormônio liberador das gonadotrofinas (0,01 mg de Sincroforte®, Ourofino, Cravinos, SP, Brasil). No D2 a ocorrência das ovulações foi confirmada por ultrassonografia. Foram considerados ovulados os animais cujo folículo dominante presente no D0 desapareceu entre o D1 e D1,5. Os grupos experimentais foram determinados durante o procedimento de sincronização. Assim, no D-10 os animais foram estratificados de acordo com a condição corporal e peso vivo e divididos homogeneamente em dois grupos. Os animais do grupo folículo grande (FG-CLG; n=11) receberam uma injeção de prostaglandina F2α no D-10 e outra no D-2,5; os animais do grupo folículo pequeno (FP-CLP; n=11) receberam apenas uma injeção de prostaglandina F2α no D-1,5. Os dispositivos foram removidos concomitantemente à última injeção de prostaglandina F2α.

A partir do D1, amostras de sangue foram coletadas diariamente para a mensuração das concentrações plasmáticas de progesterona. O sangue foi coletado da veia jugular utilizando o sistema de tubos com anticoagulante a vácuo (BD Vacutainer® Plus plastic plasma tube, ref. 367874) e agulha 21G (BD Vacutainer® PrecisionGlide, ref. 360212) e mantidos em gelo durante o manejo com os animais. Ao término da coleta de todos os animais os tubos foram centrifugados por 30 minutos a uma temperatura de 4°C em uma rotação de 650xg. Após a centrifugação o plasma de cada tubo foi acondicionado em tubos cônicos de 1,5 mL e armazenado em freezer –20 °C.

Os exames de ultrassonografia foram realizados usando um aparelho Esaote MyLab 30 Vet Gold (Esaote Healthcare do Brasil, São Paulo, Brasil) para mensurar o diâmetro folicular e o desenvolvimento do corpo lúteo bem como o dia da ovulação. Os diâmetros dos folículos e corpos lúteos foram calculados pela média entre as mensurações do maior diâmetro e o seu eixo perpendicular em ambas as estruturas.

No experimento 1, onze animais por grupo foram abatidos no D4 para a obtenção do corpo lúteo e de tecidos endometriais. Em menos de 20 minutos após o

abate de cada vaca o trato reprodutivo inteiro foi levado ao Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA-VRA-FMVZ-USP). Ainda fora do laboratório, o trato foi colocado sobre uma bandeja com gelo na qual os ovários foram separados e destinados ao laboratório de Teriogenologia (FZEA-USP) onde as análises relacionadas ao corpo lúteo no dia 7 foram realizadas. O útero foi levado ao Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM-FMVZ-USP) onde o endométrio foi dissecado e armazenado em freezer -80°C. O corno uterino ipsolateral ao ovário contendo o corpo lúteo foi lavado com 20 mL de tampão salino fosfatado (PBS) para coleta do histotrofo, este lavado foi centrifugado por 30 minutos à 300xg em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall®, RC3B Plus), aliquotado e armazenado à -80°C. Após a realização da lavagem o corno uterino ipsolateral foi incisado longitudinalmente na sua porção anti-mesometrial e a região intercaruncular do endométrio foi dissecada. Os fragmentos de útero foram separados em terço anterior, médio e posterior e mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, para extração de RNA. Para este estudo, as amostras utilizadas correspondem ao terço médio do endométrio. No experimento 2, o manejo reprodutivo foi idêntico ao descrito. Os animais foram abatidos no D7, e seguiu-se o mesmo procedimento de separação e dissecação de ovários e útero. O dia 7 foi escolhido para coleta das amostras, pois se acredita que este seja um momento determinante para a receptividade ao embrião. Fisiologicamente é o período logo após a passagem do embrião do oviduto para o útero, que ocorre aproximadamente no dia 5. Neste momento o embrião estabelece o contato com o ambiente uterino e a receptividade deste afetará o sucesso gestacional. Além disso, estudos prévios demonstram também a existência de uma associação positiva linear entre a probabilidade de sucesso gestacional e a concentração plasmática de P4 no dia 7 pós-estro em vacas Holandesas e em vacas de corte (PERES et al., 2009).

# 2.3.2 Extração de RNA total em amostras de endométrio no D4 e D7

A expressão de microRNAs em amostras de endométrio foi analisada através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Inicialmente, aproximadamente 30 mg de tecido (endométrio ou oviduto) foram maceradas em aparato de inox submerso em nitrogênio líquido e o RNA foi isolado após a lise com o reagente TRIzol®Reagent (LifeTechnologies), conforme indicado pelo fabricante. O macerado de tecido endometrial foi incubado em 700 µL de reagente TRIzol®Reagent e homogeneizado durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 140 µL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente as amostras, seguindo de nova incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12.000G, 4°C durante 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante, fase aquosa do centrifugado, foi retirado e submetido ao isolamento e purificação de RNA total através da passagem pelo kit miRNeasy® (Qiagen, Cat, 217004). Para garantir a qualidade do RNA e a ausência de contaminação por DNA, as amostras (1µg de RNA total por amostra) foram tratadas com DNAse (NC: AM2222; Ambiom, Life Technologies) num volume final de 10 µL em temperatura ambiente durante 15 minutos. A DNAse foi inativada por adição de EDTA (1µL; 25mM) e aquecimento a 65°C durante 10 minutos. A concentração de RNA total foi determinada através de espectrofotômetro (Nanovue<sup>TM</sup> Plus, GE) e a pureza do RNA foi determinada pela razão A260-A230. A integridade do RNA foi verificada através de análise em Bioanalyzer. As amostras que apresentaram o Número de Integridade de RNA (RIN) maior que 6.0, numa escala de 0 a 10, foram utilizadas para análises posteriores.

# 2.3.3 Seleção de microRNAs para análise em amostras de endométrio no D4 e D7

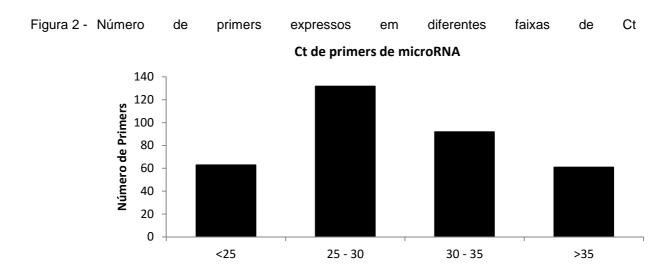
O RNA total foi submetido à síntese de cDNA com o kit miScript PCR Starter Qiagen (Cat. 218193; Venlo, Limburg, Netherlands). A reação foi realizada com 2 µL

de Hiflex buffer, 1 µL de Nucleic mix, e 1 µL de enzima transcriptase reversa, fornecidos pelo kit, além de 200 ng de RNA total diluído em 6 μL de H<sub>2</sub>O tratada com DEPC, seguida por incubação em termociclador a 37°C por 60 minutos e 95°C por 5 minutos, com posterior resfriamento das amostras a 4 °C de acordo com as recomendações do fabricante. Após a síntese de cDNA, o produto foi diluído em 40 μL de H<sub>2</sub>O DEPC. O cDNA foi então destinado à reação de qPCR utilizando se o kit miScript Sybr Green PCR Qiagen (Cat. 218073, Venlo, Limburg, Netherlands) para o preparo de um mix de reação equipamento StepOne Plus (Aplied Biosistems). A reação de PCR foi realizada em volume final de 10 µL por poço de reação em simplicata, sendo 9 µL do *mix* para PCR e 1 µL de primer (Sigma Aldrich). O *mix* foi preparado seguindo recomendações do fabricante (500 µL de Sybr green, 100 µL de miScript Universal primer, 290 μL de H<sub>2</sub>O DEPC e 10 μL de cDNA). A reação foi inicialmente submetida a aquecimento a 95°C durante 15 minutos, seguindo de 45 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo: 95°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos e 70°C durante 30 segundos. Após os ciclos de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a uma curva de dissociação.

Para a seleção de microRNAs, um pool de RNA total contendo amostras de endométrio coletadas nos Experimentos 1 e 2 foi convertido em cDNA e analisado. Foram analisados os níveis de 351 microRNAs bovinos, sendo 348 microRNAs alvos e 3 microRNAs de expressão constitutiva. O painel de microRNAs foi criado com base no banco de dados mirBase (<a href="www.mirbase.org">www.mirbase.org</a>), onde foram utilizadas como primer forward as sequências maduras para os microRNAs de interesse. Foram selecionados os microRNAs alvo que apresentaram uma curva de amplificação com fase exponencial, um Ct menor que 35 e uma curva de dissociação com um (microRNA maturo) ou dois (microRNA maturo e precursor) picos. Destes, 63 microRNAs apresentaram expressão com valor de Ct < 25, 132 com Ct > 25 e <30 e 92 microRNAs com Ct > 30 e <35. Outros 61 microRNAs apresentaram expressão > 35 Cts e foram considerados não expressos ou apresentaram curvas de melting com múltiplos picos (Figura 2).

Do total de 287 microRNAs que apresentaram expressão de Ct até 35, foram selecionados 90 microRNAs priorizando aqueles que apresentaram como alvos mRNA participantes nas vias relacionadas ao sistema imune e biossíntese de esteroides, por serem vias de interesse de nosso estudo, pesquisadas no software DIANA miRPath (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=

mirpath/index). Este software permite a análise de vias de microRNAs, assim, quando fornecido o microRNA de interesse, o software busca os mRNAs alvos preditos, através do algoritmo DIANA-microT-CDS, ou de mRNA alvos validados experimentalmente, derivados do DIANA-TarBase v6.0. O banco de dados conta com algoritmos para humanos e camundongos, e, portanto, foram considerados os microRNAs bovinos com 100% de homologia em relação as microRNAs humanos. Foram selecionados 90 primers (Quadro 1), sendo três microRNAs de referência.



Quadro 1 - MicroRNAs selecionados para análise comparativa da abundância de microRNAs entre os grupos

bta-let-7a-3p	bta-miR-150	bta-miR-106b	bta-miR-143	bta-miR-30d	bta-miR-92b
bta-miR-124a	bta-miR-155	bta-miR-10a	bta-miR-148a	bta-miR-31	bta-miR-98
bta-miR-124b	bta-miR-181a	bta-miR-10b	bta-miR-148b	bta-miR-324	bta-miR-199a-5p
bta-miR-133a	bta-let-7g	bta-miR-125a	bta-miR-27b	bta-miR-335	bta-miR-199b
bta-miR-136	bta-let-7i	bta-miR-125b	bta-miR-221	bta-miR-340	bta-miR-199c
bta-miR-142-3p	bta-miR-100	bta-miR-126-3p	bta-miR-222	bta-miR-342	bta-miR-19a
bta-let-7a-5p	bta-miR-101	bta-miR-21-5p	bta-miR-223	bta-miR-186	bta-miR-19b
bta-let-7b	bta-miR-103	bta-miR-214	bta-miR-29a	bta-miR-191	bta-miR-200a
bta-let-7c	bta-miR-106a	bta-miR-26a	bta-miR-30a-5p	bta-miR-193a-5p	bta-miR-99a-3p
bta-let-7d	bta-miR-181b	bta-miR-26b	bta-miR-149-3p	bta-miR-195	bta-miR-99a-5p
bta-let-7e	bta-miR-181C	bta-miR-27a-3p	bta-miR-151-3p	bta-miR-199a-3p	bta-miR-200b
bta-let-7f	bta-miR-181d	bta-miR-27a-5p	bta-miR-151-5p	bta-miR-494	bta-miR-20 <sup>a</sup>
bta-miR-142-5p	bta-miR-18a	bta-miR-126-5p	bta-miR-15a	bta-miR-7	RNT43snoRNA
bta-miR-146a	bta-miR-192	bta-miR-130b	bta-miR-16a	bta-miR-9-5p	bta-mir-99b
bta-miR-149-5p	bta-miR-21-3p	bta-miR-135a	bta-miR-16b	bta-miR-92a	Hm/Ms/RtT1snRNA

# 2.3.4 Análise da abundância relativa dos microRNA entre os grupos FG-CLG e FP-CLP no D4 e D7 do ciclo estral

A análise da abundância relativa de microRNA foi realizada no Experimento 1 (n=6, FL-CLG; n=5, FP-CLP) e Experimento 2 (n=5, FG-CLG; n=4, FP-CLP). Os dados foram normalizados por 2<sup>-dCt</sup>. O valor de delta Ct foi calculado a partir da média geométrica dos três microRNAs de referência (RNT43snoRNA; Hm/Ms/Rt T1 RNA; bta-miR-99b).

# 2.3.5 RNASeq

Foi realizada uma análise de sequenciamento de RNA (RNASeq). Três replicatas técnicas de cada grupo do experimento 2 foram submetidas à análise. A integridade do RNA extraído foi avaliada através do kit Agilent RNA 6000 Nanochip (Bioanalyzer Agilent Technologies; Santa Clara CA). Amostras com o Número de Integridade de RNA (RIN) acima de 8 (4µg de RNA por amostra) foram tratadas com kit TruSea RNA Sample Preparation San Diego, CA) para preparar a biblioteca de sequenciamento de RNA. Os tamanhos inseridos foram estimados através do Agilent DNA 1000 chip (Agilent Technologies) e as concentrações das bibliotecas foram mensuradas por Real Time PCR com KAPA Library Quantification kit (KAPA Biosystems). As amostras foram então diluídas, formados pools em quantidades equimolar e então sequenciadas no Centro Funcional Aplicado à Agropecuária e Agroenergia – ESALQ usando HiScanSQ Sequencer (Illumina, San Diego, CA). Todos os reads foram depositados no Sequence Read Archive (SRA) do National Center for Biotechnology Information, (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/)número de acesso PRJNA270391 (MESQUITA et al., 2015).

# 2.3.6 Determinação dos mRNA-alvos e análises de ontologia gênica e enriquecimento funcional

O software TargetScan v7.0, 2015 (www.targetscan.org) foi utilizado para a determinação dos mRNA alvos preditos para os microRNAs diferentemente expressos. Para a identificação dos mRNAs-alvos, o software requer dois passos, quais sejam: (1) seleção da espécie; (2) inserção do microRNA de interesse seguido de busca. Os mRNAs alvos são apresentados com sequências referentes à espécie humana. A homologia entre os microRNas bovinos e humanos foi verificada no software MirBAse (www.mirbase.org). As sequências de microRNAs bovinos foram comparadas aos microRNAs de humanos. Como critério de inclusão na análise, utilizou-se apenas os microRNAs com homologia entre humanos e bovinos e com sítios de ligação entre o microRNA e mRNA conservado entre as duas espécies. No experimento 1 foram selecionados para a avaliação os microRNA das famílias mir-221 (bta-mir221; bta-mir-222), da família let-7 (bta-let7a-5p; bta-let7b; bta-let7c; btalet7d; bta-let7e; bta-let7f; bta-let7q; bta-let7i; bta-mir-98) e da família mir-10 (bta-mir-100; bta-mir-99a-5p) (www.mirbase.org). Estas famílias foram selecionadas por apresentarem microRNAs que tiveram a abundância relativa diferente (p<0.1) entre os grupos FG-CLG e FP-CLP. No experimento 2, os microRNAs avaliados foram os que apresentaram diferente abundância relativa entre os grupos (p<0.1), especificamente, bta-mir-100, bta-mir-136, bta-mir-155, bta-mir-200b.

Os genes preditos no TargetScan foram submetidos ao enriquecimento funcional através do Software DAVID **Bioinformatics** Resources 6.7 (<a href="https://david.ncifcrf.gov">https://david.ncifcrf.gov</a>). A identificação dos transcritos gerada pelo TargetScan foi inserida na lista de gerenciamento de genes do software DAVID, e selecionou-se a opção ENSENBL\_TRANSCRIPT\_ID, para identificação dos dados inseridos. A guia Functional Annotation Clustering forneceu as vias de enriquecimento, sendo anotado nesta guia o critério "fold change" e o maior rigor para determinação do enriquecimento. Empiricamente definiu-se explorar os cinco agrupamentos de vias enriquecidas conforme as maiores pontuações de escore de ranqueamento calculado pelo DAVID, porém que apresentaram vias metabólicas com relevância biológica em referência ao contexto da presente tese.

# 2.3.7 Análise estatística

Os dados de abundância relativa de microRNAs foram examinados para a normalidade dos resíduos usando o teste Shapiro-Wilk. Os dados que não seguiram a normalidade dos resíduos foram transformados por ranqueamento. As quantificações dos transcritos de microRNA em D4 ou D7 foram analisadas por análise de variância (ANOVA), utilizando-se o PROC MIXED e considerando-se como variável independente o efeito de tratamento.

# Análise de Componente Principal

Os dados de abundância relativa de microRNAs foram avaliados por Análise de Componente Principal pelo software Metaboanalyst V3.0 (XIA et al., 2015). Para esta análise considerou-se a abundância relativa de todos os microRNAs comparados nos grupos FG-CLG e FP-CLP nos experimentos 1 (D4) e 2 (D7), separadamente.

# PLS-DA (Partial Least Square – Discrinant Analysis)

Os dados de abundância relativa de microRNAs foram avaliados por PLS-DA pelo software Metaboanalyst V3.0 (XIA et al., 2015). A abundância relativa de todos os microRNAs comparados nos grupos FG-CLG e FP-CLP nos experimentos 1 (D4) e 2 (D7), separadamente.

A análise de Componente Principal é uma ferramenta exploratória que permite reconhecer padrões, o qual se destina a agrupar as amostras com características semelhantes e distinguí-las das demais, que por sua vez, poderão vir a formar outro grupo. Ajuda a visualizar toda a informação contida em uma tabela de dados permitindo descobrir no que diz respeito a uma amostra é diferente do outro, quais as variáveis que mais contribuem para essa diferença, e se essas variáveis estão correlacionadas, ou de forma independente um do outro. Ele também permite detectar padrões de amostra, como qualquer agrupamento particular. Já a PLS-DA consiste em uma regressão PLS clássica, onde a variável resposta é uma categoria

que expressa os membros da classe das unidades estatísticas. Portanto, PLS-DA não permite outras variáveis resposta do que aquela para a definição dos grupos de indivíduos. Como consequência, todas as variáveis medidas desempenham a mesma função no que se refere à atribuição de classe. Na verdade, os componentes PLS são construídos para tentar encontrar um resultado adequado entre dois objetivos: descrever o conjunto de variáveis explicativas e prever as respostas.

# 2.4 RESULTADOS

# 2.4.1 Abundância relativa de microRNAs no D4 (Experimento 1)

Amostras dos grupos FG-CLG e FP-CLP obtidas no D4 foram testadas quanto a expressão relativa dos 90 microRNAs selecionados. Vinte e três microRNAs apresentaram diferença significativa entre os grupos (P<0,1; Tabela 1). Destes, 21 apresentaram maior abundância de transcritos no grupo FG-CLG, e dois apresentaram maior expressão no grupo FP-CLP. Através da Análise de Componentes Principais, o grupo FP-CLP apresentou um agrupamento maior entre as amostras, enquanto as amostras do grupo FP-CLP se apresentaram mais dispersas (Figura 3), sem haver, entretanto, separação entre os dois grupos. Tal distribuição foi semelhante na análise através do modelo PLS-DA, sem a separação dos grupos e com maior dispersão das amostras do grupo FG-CLG (Figura 4). O heat map (Figura 5) do perfil de abundância dos microRNAs mostrou agrupamento entre os grupos, considerando os 25 microRNAs avaliados com menor valor de P.

Tabela 1 - Abundância relativa média (2<sup>-ACt</sup>)\*\* de microRNAs diferencialmente expressos entre os grupos FG-CLG e FP-CLP no D4 (Experimento 1).

microRNA	2-4	2 <sup>-∆Ct</sup>		P <f< th=""></f<>
	FG-CLG	FP-CLP	Change	
bta-let-7a-3p-	0.000783	0.000322	2.43	0.095
bta-let-7a-5p	0.232042	0.141244	1.64	0.100
bta-let-7d	0.091355	0.045727	2	0.015
bta-let-7f	0.051538	0.033586	1.53	0.061
bta-let-7g	0.010973	0.006753	1.62	0.038
bta-miR-98	0.001229	0.000646	1.9	0.071
bta-miR-221	0.009192	0.003911	2.35	0.00001
bta-miR-222	0.005936	0.003245	1.83	0.008
bta-miR-99a-5p	0.091091	0.114703	0.79	0.100
bta-miR-100	0.048586	0.060596	0.8	0.026
bta-miR-124 a	0.000963	0.000611	1.58	0.099
bta-miR-125 a	0.022315	0.014113	1.58	0.100
bta-miR142-5p*	0.000298	0.000067	4.44	0.062
bta-miR-149-5p*	0.000734	0.000309	2.37	0.023
bta-miR-150*	0.000587	0.000236	2.48	0.0026
bta-miR-181b	0.005051	0.003553	1.42	0.029
bta-miR-192	0.000324	0.000243	1.33	0.078
bta-miR-199a-5p	0.01719	0.007704	2.23	0.050
bta-miR-214	0.007172	0.003895	1.84	0.086
bta-miR-27b	0.041879	0.024261	1.73	0.046
bta-miR-30d	0.004526	0.002511	1.8	0.100
bta-miR-340	0.000042	0.00002	2.09	0.085
bta-miR-342	0.000685	0.000277	2.48	0.088

<sup>&</sup>lt;u>bta-miR-342</u> 0.000685 0.000277 2.48 0.088 \* Dados transformados por ranqueamento; \*\*  $2^{-\Delta Ct}$ : normalização dos dados de qPCR  $\Delta Ct$  = Ct gene -Ct média geométrica dos microRNAs referência.

Figura 3 - Análise de Componente Principal em amostras do D4 com dados de microRNA. As amostras do grupo FG-CLG (vermelho) se apresentam mais dispersas que as do grupo FP-CLP (verde), entretanto, não há separação entre os grupos.

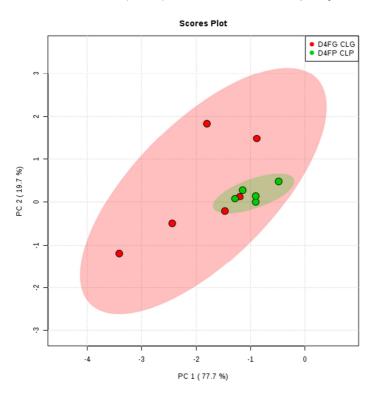
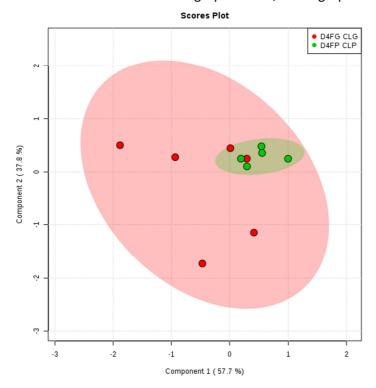


Figura 4 - Análise de PLS-DA em amostras do D4 com dados de microRNA, demonstrou não haver separação entre os grupos FG-CLG (vermelho) e FP-CLP (verde). De forma semelhante ao PCA, as amostras do grupo FG-CLG apresentaram maior dispersão que as amostras do grupo FP-CLP, mais agrupadas no modelo.



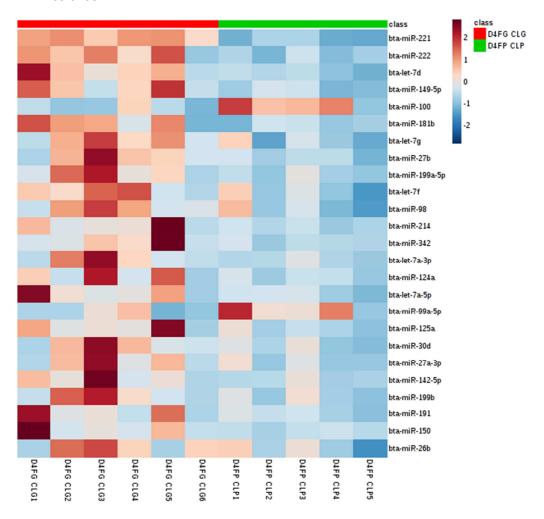


Figura 5 - Heat map da expressão de microRNA no D4 construído por um cluster com todas as amostras analisadas no D4. O painel mostra os microRNAs nas linhas e as amostras em colunas

Legenda: Azul indica menor expressão e vinho maior expressão dos microRNAs nas referidas amostras.

# 2.4.2 Abundância relativa de microRNAs no D7 (Experimento 2)

Amostras dos grupos FG-CLG e FP-CLP foram testadas quanto a sua abundância relativa no D7. Quatro primers apresentaram diferença significativa (Tabela 2), sendo três com maior abundância no grupo FP-CLP (bta-mir-100; bta-mir-136, bta-mir-155), e um com maior abundância no grupo FG-CLG (bta-mir-200b). A análise de Componente Principal não separou os grupos e mostra dispersão bastante semelhante entre os grupos (Figura 6). Interessantemente, a análise de

PLSDA, mostrou uma evidente separação entre os indivíduos dos grupos FG-CLG e FP-CLP (Figura 7), devido principalmente ao Componente 2, entretanto, o valor do Componente 2 apresentado é muito baixo. O componente 1 apresenta um alto valor e demonstra claramente que as amostras apresentam um padrão global de abundância de microRNAs distintas entre si independente dos grupos experimentais. O *heat map* (Figura 8) não apresentou agrupamento bem definido entre as amostras dos grupos FG-CLG e FP-CLP corroborando com a Análises de Componente Principal e PLS-DA.

Tabela 2 - Abundância relativa média (2<sup>-ΔCt</sup>)\*\* de microRNAs diferencialmente expressos entre os grupos FG-CLG e FP-CLP no D4 (Experimento 1)

microRNA	2 <sup>-ΔCt</sup>		Fold	Valor de P
	FG-CLG	FP-CLP	Change	
bta-miR-136	0.000155	0.000226	0.68	0.02
bta-miR-100	0.042319	0.061334	0.69	0.07
bta-miR-155	0.000263	0.000325	0.81	0.05
bta-miR-200b	0.113585	0.072272	1.57	0.01

2<sup>-ΔCt</sup>: normalização dos dados de qPCR;

ΔCt = Ct microRNA alvo -Ct média geométrica dos microRNAs referência.

Figura 6 - Análise de Componente Principal em amostras do D7 com dados de microRNA. A dispersão entre os indivíduos é semelhante e independente de grupo, FG-CLG ou SF-SLC

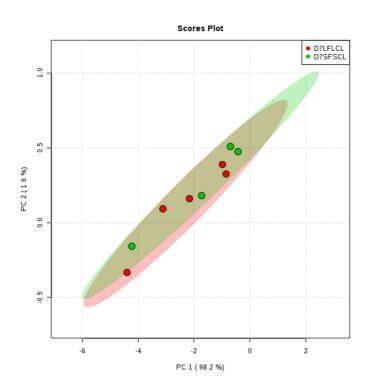


Figura 7 - Análise de PLS-DA em amostras do D7 com dados de microRNA. O modelo separa de forma definida os grupos FG-CLG e FP-CLP

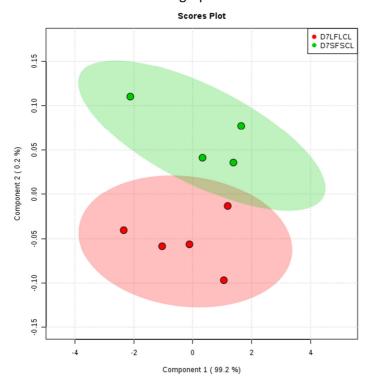
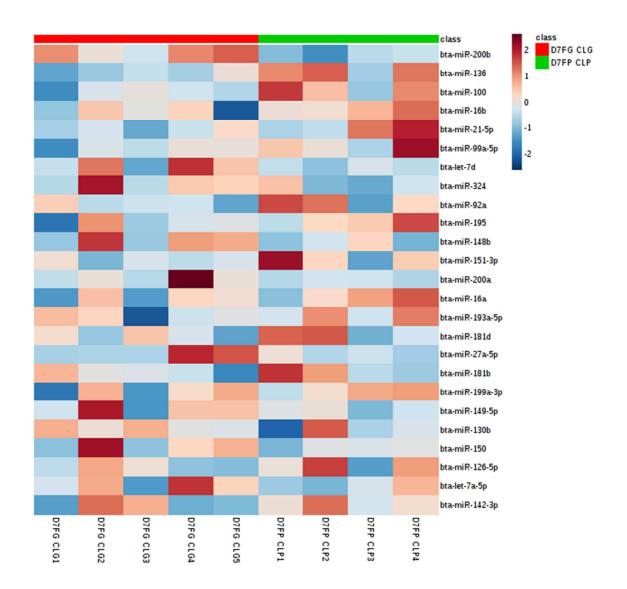


Figura 8 - Heatmap da expressão de microRNA no D7 contruido por um cluster com todas as amostras analisadas no D7. O painel apresenta os microRNAs nas linhas e as amostras em colunas. Azul indica menor expressão e vinho maior expressão dos microRNAs nas amostras



# 2.4.3 Análises de ontologia gênica e enriquecimento funcional

Os transcritos de microRNA que apresentaram diferença em sua expressão foram avaliados quanto aos alvos preditos no software TargetScan e seu enriquecimento funcional avaliado pelo software DAVID. No D4, foram escolhidas três famílias de microRNAs, as quais representam em conjunto 10 dos 23 microRNAs testados e diferentemente expressos, let-7/mir98 (bta-let-7a-5p, bta-let-7d, bta-let-7f, bta-let-7g, bta-mir-98 – *up-regulated* no grupo FG CLG), mir221(bta-mir-221, bta-mir-222 – *up-regulated* no grupo FG CLG) e mir-10 (bta-mir-100, bta-mir-99a-5p – *down-regulated* no grupo FG CLG). A família let-7-mir98 apresentou 2572 mRNA alvos, e gerou 228 clusters de enriquecimento funcional. A família mir221 apresentou 2485 genes alvos preditos com 210 clusters de enriquecimento funcional. A família mir-10 teve 350 genes alvos preditos resultando em 54 vias de enriquecimento apresentadas. Em cada família, foram escolhidas cinco vias de enriquecimento e listados os genes pertencentes à essas vias (Quadro 2).

No D7, os 4 microRNAs que apresentaram diferença estatística foram submetidos à análise de enriqueciento funcional. O microRNA bta-mir-136 apresentou 2980 mRNA alvos, com 210 cluster de enriquecimento. O microRNA bta-mir-100 apresentou 305 mRNAs alvos e 54 clusters de enriquecimento. O microRNA bta-mir-155 teve 2257 mRNA alvos e gerou 105 clusters de enriquecimento, enquanto o microRNA bta-mir-200b teve 2644 mRNA alvos e 227 clusters de enriquecimento funcional. Cada microRNA teve, assim como as famílias de microRNA no D4, a seleçao de 5 vias de enriquecimento avaliadas quanto aos mRNAs presentes nelas (Quadro 3).

Quadro 2 - Vias funcionais de enriquecimento estabelecidas pelo software DAVID e os mRNA alvos preditos para as famílias de microRNA no D4

Família de microRNA	Via de enriquecimento funional (Score)*	Genes alvos	
let-7	Regulation of glucose metabolic (3.58)	C1QTNF2, DYRK2, HIF1A, INSR, IRS1, IRS2, IGF1, IGF2, PPARGC1A, AKT2	
	Fibrillar collagen, C-terminal (3.04)	COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2, COL11A1, COL24A1, COL27A1	
	Dual specificity protein phosphatase	DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP,7 DUSP9	
	(MAP kinase phosphatase)(2.35)		
	Peptidase M12B, ADAM/reprolysin (2.26)	ADAM12, ADAM15, ADAM2, ADAM22, ADAMTS1, ADAMTS14, ADAMTS15, ADAMTS17, ADAMTS20, ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS8	
	Regulation of translation, ncRNA- mediated (1.96)	EIF2C1, EIF2C2, EIF2C3, EIF2C4	
mir-221	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile (2.21)	DDX20, SRSF10, FHF5A, PRPF4, RBM25, RBM8A, SRPK2, YTHDC1, CPSF2, GEMIN7, HNRNPA0, HNRNPD, HPNRPH3, HNRNPR, HRNPU, NOVA1, NCBP1, NCBP2, PRMT5, RNPS1, SNRPD3, SNRPE, SF3A1, SRSF4, SRSF2, SMC1A, SMNDC1, SMN1, TGS1	
	Gene silencing by microRNA, negative regulation of translation (2.03)	EIF2S1, EIF2C2, EIF2C3, EIF2C4	
	Response to glucose stimulus (1.4)	PFKFB2, FKBP1B, SMAD2, ACVR2B, CASP6, EIF2B2, PTENP1, PRKCQ, RPS6KB1, SLC8A1, THBS1	
	Steroid hormone receptor (1.34)	RORB, ESR1, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2F2, NR3C1, NR4A1, NR5A2, PPARA, PGR	
	mRNA transport (1.22)	AGFG1, DDX19A, SFRS13A, G3BP2, RANBP2, RBM8A, SMG7, UPF3A, EIF5A2, FMR1, LRPPRC, NCBP1, NCBP2, NXT2, NUP155, NUP50, NUPL1, QKI	
mir-10	Regulation of biosynthetic process (2.18)	KLF12, PRDM1, SATB1, SMAD4, SMARCA4, BAZ2A, CBX5, ETV3, EIF2AK1, EIF2C2, INPP5D, ILF3, KDM6B, NR6A1, PCGF6, PIAS4, SORBS3, ZBTB7A, ZFP161	
	Regulation of phosphorylation (1.38)	SMAD4, BMPR2, EGF, IL6ST, LIF, MTOR	
	Glycogen metabolic process (1.37)	IL6ST, PHKA2, PPP1CB, PPP1R3B	
	Positive regulation of apoptosis (0.97)	NOX5, RAB27A, ARHGEF12, APH1B, CASP3, CTNNBL1, CSRNP3, ING3, INPP5D, NGEF, PCSK9, RAC1	
	Cell part morphogenesis (0.68)	L1CAM, DCX, DST, GAS7, HOXA1, IGF1R, RAC1,	

<sup>\*</sup> O Score de enriquecimento representa o valor de P do teste Exato de Fischer modificado para análise de enriquecimento gênico.

Quadro 3 - Vias funcionais de enriquecimento estabelecidas pelo software DAVID e os mRNA alvos preditos para os microRNAs no D7

microRNA	Via de enriquecimento funional (Score)*	Genes alvos	
bta-mir-136	gene silencing by microRNA (2.36)	RBM3, SMAD1, SMAD2, EIF2C1, EIF2C2,	
		EIF2C3, EIF2C4, LIN28B, TNRC6A, ZCCHC11	
	positive regulation of phosphorylation	BCL10, BCL2, CD80, FCER1A, SMAD4, AGT,	
	(1.97)	BMP10, BMP2, BMPR1A, BMPR2, CAV1,	
		CCND2, FGF2, GDF2, GDF6, GDF7, HPX, INSR, IGF1, IGF2, ITLN1, IL11, IL6R, NOD2,	
		TLR4, VEGFC	
	Steroid hormone receptor (1.88)	RORB, ESR1, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2F2,	
	Storoid normana recopier (1.66)	NR3C1, NR4A1, NR5A2, PPARA, PGR	
	Dicer pathway (1.78)	EIF2C1, EIF2C2, EIF2C3, EIF2C4	
	Sugar transmembrane transporter	KIAA1919, SLC2A10, SLC2A8, SLC2A9,	
	activity (1.72)	SLC2A5, SLC35A1, SLC35A3, SLC35A5,	
bta-mir-155	Positive regulation of phosphorylation	BCL2, CD80, JAK2, KITLG, RICTOR, ACVR2A,	
	(3.21)	ADIPOQ, ANG, AGT, BMPR2, CAV1, CCND1,	
		DOCK7, EGF, EREG, FAM129A, FGF2, IGF1,	
		IL29, IL6R, IL6ST, PRKAG2, TLR4, TGFBR1,	
		VEGFC,	
	Negative regulation of cell growth (1.8)	BCL2, BTG1, CDKN2AIP, DCUN1D3,	
	Negative regulation of cell growth (1.8)	SERTAD2, APBB2, AGT, CGRRF1, CDKN2C,	
		CTH, DAB2, DCBLD2, ENPP1, FGF2, GNG4,	
		HNF4A, NRP1, RB1, SEMA3A, SEMA3A,	
	TGF-beta receptor/activin receptor, type	ACVR1, ACVR1C, ACVR2A, BMPR2, LY6G6E,	
	I/II (1.55)	TGFBR1,	
	Determination of symmetry (1.54)	CITED2, NOTCH2, TGIF1, ZIC3, ACVR1,	
	DAIA mostly design (4.40)	ACVR2A, DNAH11, FTO, KIF3A, RFX3, SHH,	
	DNA methylation (1.46)	DNMT3A, GATAD2A, ATF7IP, HELLS, HSD3B7, MLL5, TDRD1, FOS,	
bta-mir-100	Negative regulation of biosynthetic	KLF12, PRDM1, SATB1, SMAD4, SMARCA4,	
	process (2.18)	BAZ2A, CBX5, ETV3, EIF2AK1, EIF2C2,	
		INPP5D, ILF3, KDM6B, NR6A1, PCGF6, PIAS4,	
		SORBS3, ZBTB7A, ZFP161	
	Positive regulation of phosphorylation	SMAD4, BMPR2, EGF, IL6ST, LIF, MTOR	
	(1.38) Glycogen metabolic process (1.37)	IL6ST, PHKA2, PPP1CB, PPP1R3B	
	Positive regulation of apoptosis (0.97)	NOX5, RAB27A, ARHGEF12, APH1B, CASP3,	
	Toolard regulation of apoptions (e.e.)	CTNNBL1, CSRNP3, ING3, INPP5D, NGEF,	
		PCSK9, RAC1	
	Cell part morphogenesis (0.68)	L1CAM, DCX, DST, GAS7, HOXA1, IGF1R,	
1		RAC1,	
bta-mir-200b	Regulation of polysaccharide	DYRK2, ENPP1, INSR, IRS1, PPP1CB,	
	biosynthetic process (2.01) Steroid hormone receptor (1.43)	PPP1R3C, AKT2, RORA, ESR1, ESRRG, NR0B1, NR2C1,	
	Gleroid Hormone receptor (1.43)	NR2F2, NR3C1, NR4A2, NR5A2, NR6A1,	
		PPARA, PGR, THRA	
	cyclic-nucleotide phosphodiesterase	PDE3A, PDE3B, PDE4B, PDE4C, PDE4D,	
	activity (1.36)	PDE5A, PDE7B, PDE8A	
	Glycosylation (1.36)	SL3GAL6, ST6GALNAC3, ST6GALNAC5,	
		ST8SIA3, ST8SIA4, B3GALT1, B3GALT5,	
		B3GNT2, B3GNT5, GALNT2, ALG1, ALG2, B3GALNT1, FUT11, FUT8, FUT9, GAL3ST1,	
		LARGE, MAGT1, MAN1A2, MAN2A1,	
		MGAT4A, MGAT2, MGAT3, TRAK1, TRAK2	
	Negative regulation of phosphorylation	FKBP1A, SMAD7, ATXN1, BDKRB2, CDKN1B,	
	(1.22)	ENPP1, INHBA, INSR, JUN, PEBP1, PPP2CA,	
		PTPRC	

<sup>\*</sup> O Score de enriquecimento representa o valor de P do teste Exato de Fischer modificado para análise de enriquecimento gênico.

# 2.5 DISCUSSÃO

Os microRNAs estão envolvidos em um grande número de processos biológicos os quais resultam em controle do ciclo celular, proliferação, desenvolvimento, e processos fisiológicos. Um mRNA-alvo é, frequentemente, inibido por um conjunto de microRNAs, ao passo que cada microRNA pode inibir vários mRNA-alvos (BAUMJOHANN; ANSEL, 2013). Assim, um transcriptoma global, pode apresentar inúmeros microRNAs modulando suas funções. Desta forma, as famílias de microRNAs let-7, mir-221/222 e mir-10, as quais possuem 10, dos 23 microRNAs diferentemente expressos no Experimento 1 (D4), podem modular um grande número de vias e funções biológicas e fisiológicas. O enriquecimento da via de regulação do metabolismo de glicose, por exemplo, tem mRNA-alvos preditos que apontam para a regulação destes pela família let-7. De fato, a família let-7 modula os níveis de glicose suprimindo *INSR*, *IGF1R*, *IRS2*, *PIK3IP1*, *AKT2*, *RICTOR* e TSC1 em camundongos (FROST; OLSON, 2011; ZHU et al., 2011), e apresentam alta homologia entre camundongos e bovinos na sua região seed (www.targetscan.org).

Nos microRNAs diferentemente expressos no Experimento 2 (D7), não houve enriquecimento funcional. A expressão dos microRNAs mir-136, mir-155, mir-100 e mir-200b no endométrio vem sendo descrita em casos de câncer, e em grande proporção dos casos encontram-se up-regulated nos tecidos com câncer comparados aos tecidos normais (HIROKI et al., 2010; DEVOR et al., 2011; TORRES et al., 2012) e envolvem desregulações no sistema imune (O'CONNELL et al., 2007). Esses microRNAs apresentaram enriquecimento na via dos receptores de esteroides e possivelmente modulam a transcrição dos genes a eles relacionados. Entretanto, a regulação da transcrição dos microRNAs também se faz necessária e se dá, principalmente por fatores de transcrição nuclear (HAMMOND, 2015), tais como os receptores de E2 e P4 (YANG; WANG, 2011). Entre as principais vias moduladas pelos microRNAs diferentemente expressos, a via de sinalização por hormônios esteroides foi escolhida para esta discussão por ser diretamente relevante aos processos que ocorrem no período peri-ovulatório. No nosso estudo, observamos entre os animais com perfil hormonal peri-ovulatório distinto 23 microRNAs diferentemente expressos no endométrio bovino no D4 e 4 microRNAs

no D7. Possivelmente, essa maior quantidade de microRNAs modulados no D4 deve-se à presença dos receptores de estrógeno em maior quantidade nesta fase do ciclo se comparado ao D7. Os receptores de E2 e P4 são expressos ao longo do ciclo estral, havendo maior expressão do receptor de estradiol (E2α) entre os dias 0 a 6 do ciclo estral (KIMMINS; MACLAREN, 2001). Além disso, transcritos de ERS1 apresentaram maior abundância no grupo FG-CLG em relação ao FP-CLP no D0, mas não houve efeito de tratamento no D4 entre os grupos FG-CLG e FP-CLP (BINELLI et al., 2014). No D4, o ESR1 não apresenta diferença na sua abundância entre os grupos FG-CLG e FP- CLP, porém é possível que a abundância de alguns microRNAs tenha sido afetada por este receptor em dias anteriores e então armazenadas nas células. De fato, o E2α é responsável pela transcrição de microRNAs, como por exemplo, os da família let-7 em células epiteliais luminais de glândula mamária (BHAT-NAKSHATRI et al., 2009), além da família mir-17-92 (CASTELLANO et al., 2009) presente no endométrio bovino. Dentre os microRNAs mediados pelo receptor de P4 (PR), cita-se a família mir-200, que inclui o mir-200b (RENTHAL et al., 2010), up-regulated no D7, quando há maior abundância de PR. Além de atuar como fatores de transcrição diretos, os receptores de hormônios ovarianos sobre a biogênese dos microRNAs aumentando a expressão das enzimas envolvidas na maturação (GRELIER et al., 2009; NOTHNICK, 2011). De maneira interessante, os receptores E2a e PR tem suas funções moduladas pelos microRNAs.

As famílias de microRNAs mir-221 e let-7 tiveram maior abundância no grupo FG-CLG no D4. A família mir-221 tem sua expressão suprimida pelo complexo E2-E2α em células MCF-7 (DI LEVA et al., 2010), enquanto membros da família let-7 tem sua expressão regulada pelo ESR1 (BAILEY; WESTERLING; BROWN, 2015). Entretanto, o *ESR1* é inibido pelos microRNAs mir-221/222, (ZHAO et al., 2008). De fato, o complexo E2-E2α determina uma assinatura de microRNAs aumentando a expressão de determinados microRNAs e reduzindo a de outros (CASTELLANO et al., 2009). Tal assinatura pode levar a *down-regulation* do complexo E2-E2α, num mecanismo de *feedback* negativo sobre a expressão do *ESR1* (CASTELLANO et al., 2009). No período peri-ovulatório de bovinos, a concentração circulante de E2 é elevada no D0, e diminui consideravelmente no D4, o que poderia promover a menor formação do complexo E2-E2α. Desta forma o aumento da abundância nos microRNAs da família mir-221 pode se dar pela inativação do complexo E2-E2α e

esse aumento poderia assim conduzir à regulação dos receptores de esteroides. Essa modulação vai de encontro com o enriquecimento funcional dos mRNAs-alvos preditos neste estudo, que aponta a regulação dos hormônios esteroides (Quadro 2) como um alvo potencial dos microRNAs mir-221 e mir-222. A modulação da via possivelmente envolve os receptores de progesterona A (PR-A) e C (PR-C), ambos down-regulated no grupo FG-CLG no D4 (BINELLI et al., 2014). Além da modulação dos receptores nucleares, os microRNAs afetam também o receptor de progesterona de membrana celular (PRMC), o qual apresenta menor abundância no grupo FG-CLG no D4 (BINELLI et al., 2014). A família let-7 está envolvida na modulação do PRMC em células ovarianas inibindo a expressão de sua proteína (WENDLER et al., 2011). Deste modo, a maior abundância dos microRNAs da família let-7 poderia também regular a abundância de PRMC no endométrio. Curiosamente, elevadas concentrações de P4 promovem maior expressão de mir-200b (YANG; WANG, 2011). Corroborando com este dado, o bta-mir-200b é up-regulated no grupo FG-CLG no D7, quando a concentração de P4 circulante é maior. O bta-mir-200b também apresentou enriquecimento funcional na via que regula os hormônios esteroides. Desta maneira, é possível sua participação na regulação do PR-B e do PR-C, ambos com menor abundância no grupo FG-CLG (BINELLI et al., 2014). Sabe-se que a exposição do endométrio à P4 conduz a uma redução da expressão de seus receptores (BAZER et al., 2008), podendo ser regulado pelo mir-200b. Entretanto, o aumento da concentração circulante de P4 suprime a expressão de mir-200b no miométrio de camundongos (RENTHAL et al., 2010).

A participação dos hormônios esteroides na expressão de microRNAs é evidente. O controle da ação desses hormônios pela ação dos microRNAs sobre os seus receptores também vem sendo estudada e estabelece um mecanismo de feedback entre essas moléculas. Chama a atenção a modulação do ambiente periovulatório sobre a quantidade de microRNAs diferentemente expressos nos dias estudados. No D4 há mais microRNAs com diferenças determinadas pelo ambiente endócrino. Está bem estabelecido que o D4 apresenta perfil de hormônios circulantes com uma queda de concentração de E2 que o precede, e o aumento da P4 é presente neste dia. Tal oscilação hormonal pode ser um fator determinante no controle da transcrição dos microRNAs, ao passo que no D7, quando a P4 já chegou próximo ao seu platô de concentração, não teria tanto efeito sobre os microRNAs

sendo esses controlados por fatores de transcrição não ligados aos hormônios esteroides.

# 2.6 CONCLUSÃO

O ambiente endócrino peri-ovulatório é capaz de promover alterações na abundância de determinados microRNAs no endométrio bovino e pode promover um feedback negativo sobre seus receptores.

# Capítulo II

# 3 EFEITO DO AMBIENTE ENDÓCRINO PERI-OVULATÓRIO SOBRE O SISTEMA IL1/TLRS NO ENDOMÉTRIO BOVINO

O sistema imune é um importante regulador para a manutenção da gestação. Uma resposta imune inadequada pode ser responsável, pelo menos em partes, pelo grande número de perdas gestacionais (WALKER et al., 2010). De fato, uma modulação ocorre no sistema imune no endométrio e o E2 e P4 podem ser os moduladores dessa adaptação. As células do sistema imune estão presentes ao longo de todo o ciclo estral e durante a gestação no endométrio bovino (OLIVEIRA et al., 2013b), e são moduladas pela fase do ciclo estral.

De fato, os genes e vias de sinalização do sistema imune materno são regulados em animais gestantes, indicando que a resposta imune é um fator chave para a manutenção da gestação (WALKER et al., 2010). Efetivamente, as células do sistema imune estão presentes no endométrio bovino de animais gestantes e cíclicos (GROEBNER et al., 2011), e são moduladas ao longo do ciclo estral. Células como as dentríticas e macrófagos são reguladas pelos hormônios esteroides e participam da imunomodulação do endométrio ao determinar o perfil de citocinas expressas (MANSOURI-ATTIA et al., 2012). As células Thelper, por sua vez, não presentam alteração no seu número (OLIVEIRA et al., 2013a), porém as citocinas provenientes destas células apontam para alterações no perfil de expressão que contribuem para mecanismos relacionados com os tipos celulares Treg e Th2, os quais são moduladores da resposta imune regulatória, benéfica para o sucesso gestacional (WALKER et al., 2010; BAUERSACHS; WOLF, 2013). Desta maneira, o ambiente uterino deve apresentar uma regulação sutil do sistema imune materno para o desenvolvimento do embrião através de citocinas (MUNOZ et al., 2012) desde os estádios iniciais. Assim, a rede de citocinas secretada, sob influência do ciclo estral, modula o endométrio para um ambiente receptivo (LEA; SANDRA, 2007). A IL1β é uma das principais citocinas que participam da regulação local e endócrina de funções reprodutivas e no endométrio (BELLEHUMEUR et al., 2009).

A expressão da IL1β no endométrio e em embriões já foi descrita em bovinos (PAULA-LOPES et al., 1998; PAULA-LOPES; S; HANSEN, 1999; MUÑOZ et al., 2012; CORREIA-ÁLVAREZ et al., 2015), suínos (SEO et al., 2012), humanos (FRANK et al., 1995; HUANG, 2006), camundongos (FOULADI-NASHTA et al., 2008). A presença de IL1β o endométrio bovino se dá principalmente no epitélio luminal e glandular, com marcação menor em estroma, possivelmente oriundo de macrófagos presentes nesta região, e ocorre ao longo do ciclo (PAULA-LOPES; S; HANSEN, 1999; CORREIA-ÁLVAREZ et al., 2015). A proteína é *up-regulated* pela presença do embrião (CORREIA-ÁLVAREZ et al., 2015). A secreção de IL1 mas não se sabe sobre sua modulação por hormônios esteroides neste tecido na primeira semana do ciclo.

Inicialmente descoberta em macrófagos, a IL1β é sintetizada por uma ampla variedade de células, dentre as quais estão Células B, T, NK além de células epiteliais e endoteliais (DINARELLO, 1988), e apresenta auto regulação no endométrio de humanos (BELLEHUMEUR et al., 2009). A resposta é iniciada pelos membros agonistas IL1α e IL1β e a sinalização ocorre através da ligação destes ao receptor de IL1 tipo I (IL1R1) (WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010), expresso na membrana citoplasmática de macrófagos (CEPPI et al., 2009; WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010) e células epiteliais luminais e glandulares do endométrio bovino (CORREIA-ALVAREZ et al., 2015). A IL1α e IL1β se ligam também ao receptor tipo II (IL1R2), porém este receptor não estimula transdução de sinal, bloqueando a ação da IL1. A sinalização da IL1 pode ser inibida por competição pelo antagonista IL1RN, ligante que possui afinidade e especificidade pelo IL1R1 similar ao outros dois ligantes (WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010). Um outro ponto de controle na síntese de IL1 inclui a ação de microRNAs específicos. Por exemplo, células derivadas de monócitos isolados de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), em cultivo, apresentam um conjunto de microRNAs, dentre eles, mir-155 (O'CONNELL et al., 2007). O mir-155 pode inibir a transcrição de *TAB*2, resultando na redução da transcrição de IL1β pela cascata IL1/TLR (Figura 9) (CEPPI et al., 2009).

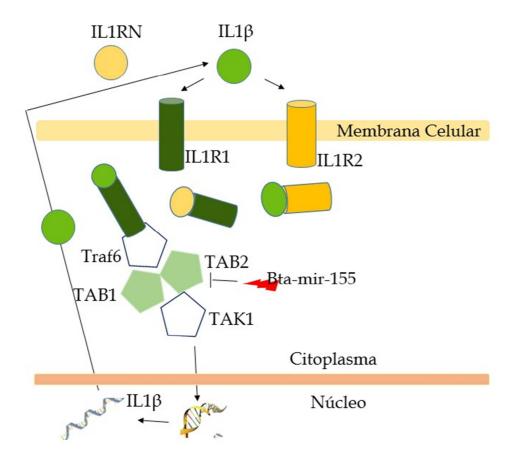
Contudo, possíveis influências do perfil endócrino periovulatório no funcionamento do sistema imune endometrial, especificamente na via de sinalização da IL1, são desconhecidas. De modo geral, sabe-se que as células imunes

respondem aos esteroides sexuais (PAULA-LOPES et al., 1998; STEWART; BULMER; MURDOCH, 1998).

A modulação destas células no endométrio de bovinos envolve a ativação de células T e macrófagos por vias do sistema imune associadas ao favorecimento da interação materno-embrionária e a receptividade (WALKER et al., 2010). As células T efetoras são diferenciadas em Th1, Th2, Treg, Th17, dependendo do estímulo que recebem e das citocinas que produzem, sendo evocadas em animais receptivos as respostas Th2 e Treg (GROEBNER et al., 2011; BAUERSACHS; WOLF, 2013), ativadas por IL-10 e TGFB, respectivamente. Assim como ocorre com as células Thelpers, os macrófagos podem ser ativados pela via clássica (M1), ou alternativa (M2) (SVENSSON et al., 2011). A ativação dos macrófagos pela via clássica se dá na presença de interferon gamma (IFN-γ) + lipopolissacarídeos (LPS) ou TNF, enquanto a ativação dos macrófagos pela via alternativa M2 pode ser estimulada por IL4 e IL13 (M2a), ligantes do sistema TLR/IL1R (M2b) e IL10 (M2c), sendo que cada tipo de estímulo resultará em diferentes perfis de secreção de citocinas (MARTINEZ; GORDON, 2014). Macrófagos presentes no endométrio durante o período préimplantacional de animais gestantes apresentam predominantemente ativação do tipo M2, através da qual é estimulada a expressão de genes relacionados à ação anti-inflamatória, interação entre macrófagos-Células T e o remodelamento tecidual (OLIVEIRA; MCCLELLAN; HANSEN, 2010), e secretam citocinas promotoras do desenvolvimento embrionário (MANSOURI-ATTIA et al., 2012). Entre as citocinas produzidas por macrófagos está a IL1β, importante modulador do sistema imune no endométrio (BELLEHUMEUR et al., 2009).

Desta forma, nossa hipótese é que a exposição a maiores concentrações de estradiol no proestro-estro e progesterona no diestro inicial modula o sistema imune, alterando a abundância de componentes do sistema IL1/TLR no endométrio bovino no D7 para gerar uma maior sinalização. Para isso, o objetivo foi comparar a abundância dos transcritos de genes (listar aqui) relacionados com o sistema IL1/TLR e do bta-mir-155 e a abundância das proteínas IL1β e IL1R no endométrio de animais tratados para ovular folículos de diâmetros contrastantes. O presente estudo foi submetido para publicação na revista *Journal of Reproductive Immunology*. O trabalho na integra encontra-se no apêndice A.

Figura 9 Modelo hipotético gráfico



Legenda: IL1β se liga ao receptor IL1R1. Esta ligação ativa a cascata de sinalização através da enzima TRAF6, que, ao se ligar com o complexo TAB1-TAB2. Este complexo ativara kinases as quais ativam o fator de transcrição para IL1β. O controle da via se dá pelo antagonista IL1RN, que se liga ao receptor IL1R1 e inibe a ligação da IL1β por competição, e pela ligação da IL1β ao receptor IL1R2, o qual inativa a IL1β.

# 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunicação materno-fetal requer interação reciproca entre embrião e útero. Ao longo do ciclo estral, os hormônios estradiol e progesterona são responsáveis pela regulação do endométrio bovino, devendo levar este a um ambiente de receptividade do embrião. Para atingir tal ambiente, o endométrio tem sua expressão de transcritos alterados.

Diante dos inúmeros transcritos expressos pelo endométrio ao longo do ciclo estral, o endométrio deve apresentar mecanismos reguladores para controlar a expressão de proteínas. Desta forma, temos um perfil de microRNAs sendo expressos no endométrio. Nossos resultados mostraram uma grande quantidade de transcritos na fase de transição entre a fase folicular e luteal do ciclo estral. Essa transição deve ser a responsável pela diferença na expressão dos microRNAs em ambientes endócrinos peri-ovulatório. Observamos que o grupo FP-CLP apresentou menos dispersão das amostras quando avaliados em análise multivariada. Como o Complexo E2-ERα é um potente fator de transcrição e, possivelmente, em menores concentrações circulantes, ele ativaria os genes com menor intensidade. É possível inferir um mecanismo de *feedback* negativo que regula os níveis de receptores de estradiol.

O sistema imune no endométrio, muito abordado em casos patológicos, merece ser melhor investigado pelo seu potencial em promover alterações biológicas. A IL1β, reconhecida como uma citocina pró-inflamatoria, se apresenta como um importante regulador em embriões e no endométrio, além da possibilidade de modular o ambiente local de modo autócrino e parácrino, promovendo interação celular importante em todo o sistema imune no endométrio, e podendo determinar uma série de mudanças na expressão de citocinas, e outras moleculas.

Novos estudos são importantes para a melhor compreensão do envolvimento de microRNAs e do sistema imune no endométrio, e uma abordagem holística, envolvendo estudos *in vivo* e *in vitro*, e envolvendo análises de biologia de sistemas, integrando os mecanismos e compreendendo endométrio como um parte importante de um organismo complexo.

# **REFERÊNCIAS**

- ARAUJO, E.; SPONCHIADO, M.; PUGLIESI, G.; VAN HOECK, V.; MESQUITA, F. S.; MEMBRIVE, C. M. B.; BINELLI, M. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. **Reproduction, Fertility and Development**, 2014.
- BAILEY, S. T.; WESTERLING, T.; BROWN, M. Loss of estrogen-regulated microRNA expression increases HER2 signaling and is prognostic of poor outcome in luminal breast cancer. **Cancer Research**, v. 75, n. 2, p. 436–445, 2015.
- BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; GROSS, K.; SCHMIDT, S. E. M.; MEYER, H. H. D.; EINSPANIER, R.; WENIGERKIND, H.; VERMEHREN, M.; BLUM, H.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **Journal of molecular endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 889–908, jun. 2005. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956356">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956356</a>>. Acesso em: 11 jun. 2012.
- BAUERSACHS, S.; WOLF, E. Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. **Animal reproduction science**, v. 134, n. 1-2, p. 84–94, set. 2012. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22917876">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22917876</a>>. Acesso em: 3 set. 2014.
- BAUERSACHS, S.; WOLF, E. Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the bovine uterus. **Journal of reproductive immunology**, v. 97, n. 1, p. 20–6, mar. 2013. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432868">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432868</a>>. Acesso em: 3 set. 2014.
- BAUMJOHANN, D.; ANSEL, K. M. MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 9, p. 666–678, 2013. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/nri3494">http://dx.doi.org/10.1038/nri3494</a>>.
- BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; WU, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 3, p. 179–211, 2008.
- BELLEHUMEUR, C.; BLANCHET, J.; FONTAINE, J.-Y.; BOURCIER, N.; AKOUM, a. Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct mechanisms. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 24, n. 9, p. 2193–204, 2009. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477877">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19477877</a>.
- BHAT-NAKSHATRI, P.; WANG, G.; COLLINS, N. R.; THOMSON, M. J.; GEISTLINGER, T. R.; CARROLL, J. S.; BROWN, M.; HAMMOND, S.; SROUR, E. F.; LIU, Y.; NAKSHATRI, H. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 14, p. 4850–4861, 2009.
- BINELLI, M.; PUGLIESI, G.; HOECK, V. V; SPONCHIADO, M.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M. L.; FRANÇA, M. R. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. p. 246–253, 2014.
- BORREGO, F.; ALONSO, M. C.; GALIANI, M. D.; CARRACEDO, J.; RAMIREZ, R.; OSTOS, B.; PEÑA, J.; SOLANA, R. NK phenotypic markers and IL2 response in NK

- cells from elderly people. **Experimental gerontology**, v. 34, n. 2, p. 253–65, abr. 1999. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363791">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363791</a>.
- BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biology**, v. 3, n. 3, p. 0404–0418, 2005.
- BREUEL, K. F.; LEWIS, P. E.; SCHRICK, F. N.; LISHMAN, a W.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. **Biology of reproduction**, v. 48, n. 3, p. 655–661, 1993.
- BUENO, M. J.; MALUMBRES, M. MicroRNAs and the cell cycle. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 5, p. 592–601, 2011. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.002">http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.002</a>.
- BURNS, G.; BROOKS, K.; WILDUNG, M.; NAVAKANITWORAKUL, R.; CHRISTENSON, L. K.; SPENCER, T. E. Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 15–19, 2014.
- CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; 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. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 3, p. 368–375, 2008.
- CASTELLANO, L.; GIAMAS, G.; JACOB, J.; COOMBES, R. C.; LUCCHESI, W.; THIRUCHELVAM, P.; BARTON, G.; JIAO, L. R.; WAIT, R.; WAXMAN, J.; HANNON, G. J.; STEBBING, J. The estrogen receptor-alpha-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 37, p. 15732–15737, 2009.
- CEPPI, M.; PEREIRA, A. M.; DUNAND-SAUTHIER, I.; BARRAS, E.; REITH, W.; SANTOS, M. A.; PIERRE, P. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in activated human monocyte-derived dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 8, p. 2735–2740, 2009.
- CORREIA-ÁLVAREZ, E.; GÓMEZ, E.; MARTÍN, D.; CARROCERA, S.; PÉREZ, S.; OTERO, J.; PEYNOT, N.; GIRAUD-DELVILLE, C.; CAAMAÑO, J. N.; SANDRA, O.; DURANTHON, V.; MUÑOZ, M. Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor (type I) in the bovine endometrium and embryo. **Journal of reproductive immunology**, v. 110, p. 1–13, 2015. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25955718">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25955718</a>>.
- DAI, A.; SUN, H.; FANG, T.; ZHANG, Q.; WU, S.; JIANG, Y.; DING, L.; YAN, G.; HU, Y. MicroRNA-133b stimulates ovarian estradiol synthesis by targeting Foxl2. **FEBS Letters**, v. 587, n. 15, p. 2474–2482, 2013. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001457931300481X">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001457931300481X</a>.
- DEMETRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Factors Affecting Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5073–5082, 2007. Disponível em:

- <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030207719768">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030207719768</a>.
- DEVOR, E. J.; HOVEY, A. M.; GOODHEART, M. J.; RAMACHANDRAN, S.; LESLIE, K. K. MicroRNA expression profiling of endometrial endometrioid adenocarcinomas and serous adenocarcinomas reveals profiles containing shared, unique and differentiating groups of microRNAs. **Oncology Reports**, v. 26, n. 4, p. 995–1002, 2011.
- DI LEVA, G.; GASPARINI, P.; PIOVAN, C.; NGANKEU, A.; GAROFALO, M.; TACCIOLI, C.; IORIO, M. V.; LI, M.; VOLINIA, S.; ALDER, H.; NAKAMURA, T.; NUOVO, G.; LIU, Y.; NEPHEW, K. P.; CROCE, C. M. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor α interactions in breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 10, p. 706–721, 2010.
- DINARELLO, C. A. Biology of interlekin 1. **FASEB**, v. 2, n. 2, p. 108–115, 1988.
- DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.2, p. 260–267, 2008.
- FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. a. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of reproduction**, v. 84, n. 2, p. 266–78, fev. 2011. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881316">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881316</a>>. Acesso em: 1 set. 2014.
- FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. a; EVANS, a C. O.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 4, p. 784–94, out. 2009. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553605">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553605</a>>. Acesso em: 11 jun. 2012.
- FOULADI-NASHTA, a a; MOHAMET, L.; HEATH, J. K.; KIMBER, S. J. Interleukin 1 signaling is regulated by leukemia inhibitory factor (LIF) and is aberrant in Lif-/mouse uterus. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 1, p. 142–53, 2008. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337516">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337516</a>.
- FRANÇA, M. R.; MESQUITA, F. S.; LOPES, E.; PUGLIESI, G.; VAN HOECK, V.; CHIARATTI, M. R.; MEMBRIVE, C. B.; PAPA, P. C.; BINELLI, M. Modulation of periovulatory endocrine profiles in beef cows: consequences for endometrial glucose transporters and uterine fluid glucose levels. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 50, p. 83–90, 2015. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724014000861">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724014000861</a>>.
- FRANK, G. R.; BRAR, a K.; JIKIHARA, H.; CEDARS, M. I.; HANDWERGER, S. Interleukin-1 beta and the endometrium: an inhibitor of stromal cell differentiation and possible autoregulator of decidualization in humans. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 1, p. 184–191, 1995.
- FROST, R. J. A.; OLSON, E. N. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 52, p. 21075–21080, 2011. Disponível em:

- <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3248488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3248488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>.
- GELLERSEN, B.; FERNANDES, M. S.; BROSENS, J. J. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 15, n. 1, p. 119–138, 2009.
- GONELLA-DIAZA, A. M.; DA SILVA ANDRADE, S. C.; SPONCHIADO, M.; PUGLIESI, G.; MESQUITA, F. S.; VAN HOECK, V.; DE FRANCISCO STREFEZZI, R.; GASPARIN, G. R.; COUTINHO, L. L.; BINELLI, M. Size of the Ovulatory Follicle Dictates Spatial Differences in the Oviductal Transcriptome in Cattle. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0145321, 2015. Disponível em: <a href="http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145321">http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145321</a>.
- GRELIER, G.; VOIRIN, N.; AY, a-S.; COX, D. G.; CHABAUD, S.; TREILLEUX, I.; LÉON-GODDARD, S.; RIMOKH, R.; MIKAELIAN, I.; VENOUX, C.; PUISIEUX, a; LASSET, C.; MOYRET-LALLE, C. Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype. **British journal of cancer**, v. 101, n. 4, p. 673–683, 2009.
- GROEBNER, a E.; SCHULKE, K.; SCHEFOLD, J. C.; FUSCH, G.; SINOWATZ, F.; REICHENBACH, H. D.; WOLF, E.; MEYER, H. H. D.; ULBRICH, S. E. Immunological mechanisms to establish embryo tolerance in early bovine pregnancy. **Reproduction, fertility, and development**, v. 23, n. 5, p. 619–32, 2011. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635810">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635810</a>>.
- HAILEMARIAM, D.; IBRAHIM, S.; HOELKER, M.; DRILLICH, M.; HEUWIESER, W.; LOOFT, C.; CINAR, M. U.; THOLEN, E.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. MicroRNA-regulated molecular mechanism underlying bovine subclinical endometritis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 6, p. 898–913, 2014.
- HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 87, p. 3–14, 2015. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000940">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X15000940</a>.
- HANSEN, P. J.; SOTO, P.; NATZKE, R. P. Mastitis and fertility in cattle possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 51, n. 4, p. 294–301, abr. 2004. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212683">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15212683</a>.
- HIROKI, E.; AKAHIRA, J. I.; SUZUKI, F.; NAGASE, S.; ITO, K.; SUZUKI, T.; SASANO, H.; YAEGASHI, N. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. **Cancer Science**, v. 101, n. 1, p. 241–249, 2010.
- HORVITZ, H. R. Cell-Lineage Mutants O F the Nematode. **Genetics**, v. 96, p. 435–454, 1980.
- HU, Z.; SHEN, W. J.; CORTEZ, Y.; TANG, X.; LIU, L. F.; KRAEMER, F. B.; AZHAR, S. Hormonal Regulation of MicroRNA Expression in Steroid Producing Cells of the Ovary, Testis and Adrenal Gland. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.
- HUANG, H.-Y. The cytokine network during embryo implantation. **Chang Gung medical journal**, v. 29, p. 25–36, 2006. Disponível em:

- <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16642726">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16642726</a>.
- HULL, M. L.; NISENBLAT, V. Tissue and circulating microRNA influence reproductive function in endometrial disease. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 27, n. 5, p. 515–529, 2013. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.07.012">http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.07.012</a>.
- HUNT, J. S.; LANGAT, D. L. HLA-G: a human pregnancy-related immunomodulator. **Current opinion in pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 462–9, ago. 2009. Disponível em: <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2747610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2747610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>. Acesso em: 4 abr. 2012.
- KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 5, p. 376–85, 2005. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15852042">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15852042</a>.
- KIMMINS, S.; MACLAREN, L. a. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placenta**, v. 22, n. 8-9, p. 742–8, 2001. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597195">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11597195</a>.
- KRAWCZYNSKI, K.; NAJMULA, J.; BAUERSACHS, S.; KACZMAREK, M. M. MicroRNAome of Porcine Conceptuses and Trophoblasts: Expression Profile of microRNAs and Their Potential to Regulate Genes Crucial for Establishment of Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 1, p. 21–21, 2015. Disponível em: <a href="http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.114.123588">http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.114.123588</a>>.
- KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597–610, 2010. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1038/nrg2843">http://dx.doi.org/10.1038/nrg2843</a>.
- KROPP, J.; SALIH, S. M.; KHATIB, H. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. APR, p. 1–8, 2014.
- KUCHEN, S.; RESCH, W.; YAMANE, A.; KUO, N.; LI, Z.; CHAKRABORTY, T.; WEI, L.; LAURENCE, A.; YASUDA, T.; PENG, S.; HU-LI, J.; LU, K.; DUBOIS, W.; KITAMURA, Y.; CHARLES, N.; SUN, H. wei; MULJO, S.; SCHWARTZBERG, P. L.; PAUL, W. E.; O'SHEA, J.; RAJEWSKY, K.; CASELLAS, R. Regulation of MicroRNA expression and abundance during lymphopoiesis. **Immunity**, v. 32, n. 6, p. 828–839, 2010. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.05.009</a>.
- KUEHBACHER, a.; URBICH, C.; ZEIHER, a. M.; DIMMELER, S. Role of Dicer and Drosha for Endothelial MicroRNA Expression and Angiogenesis. **Circulation Research**, v. 101, n. 1, p. 59–68, 2007. Disponível em: <a href="http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.107.153916">http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.107.153916</a>.
- LAMBERT, N. J.; GU, S. G.; ZAHLER, A. M. The conformation of microRNA seed regions in native microRNPs is prearranged for presentation to mRNA targets. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 11, p. 4827–4835, 2011.
- LEA, R. G.; SANDRA, O. Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 134, n. 3, p. 389–404, set. 2007. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709558">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709558</a>. Acesso em: 3 set. 2014.

- LUND E, GÜTTINGER S, CALADO A, DAHLBERG JE, K. U. Nuclear Export of Microrna Precursors. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 95–8, 2004.
- LÜTTGENAU, J.; ULBRICH, S. E.; BEINDORFF, N.; HONNENS, a; HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 125, n. 1-4, p. 20–9, maio 2011. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398055">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398055</a>. Acesso em: 3 set. 2014.
- MAMO, S.; MEHTA, J. P.; FORDE, N.; MCGETTIGAN, P.; LONERGAN, P. Conceptus-endometrium crosstalk during maternal recognition of pregnancy in cattle. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 1, p. 6, 1–9, jul. 2012. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517619">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517619</a>. Acesso em: 3 set. 2014.
- MANSOURI-ATTIA, N.; OLIVEIRA, L. J.; FORDE, N.; FAHEY, A. G.; BROWNE, J. a; ROCHE, J. F.; SANDRA, O.; REINAUD, P.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Pivotal role for monocytes/macrophages and dendritic cells in maternal immune response to the developing embryo in cattle. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 5, p. 123, nov. 2012. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034158">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23034158</a>. Acesso em: 3 set. 2014.
- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, n. March, p. 13, 2014. Disponível em:
- <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3944738&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">abstract</a>.
- MATHIEU, J.; RUOHOLA-BAKER, H. Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells. **Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells**, v. 786, p. 307–328, 2013. Disponível em: <a href="http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6621-1">http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6621-1</a>.
- MENG, X.; JIANG, Q.; CHANG, N.; WANG, X.; LIU, C.; XIONG, J.; CAO, H.; LIANG, Z. Small activating RNA binds to the genomic target site in a seed-region-dependent manner. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 5, p. gkw076–, 2016. Disponível em: <a href="http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2016/02/11/nar.gkw076.full">http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2016/02/11/nar.gkw076.full</a>.
- 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. B.; BINELLI, M. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. **Theriogenology**, v. 81, n. 6, p. 861–869, 2014. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X13005384">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X13005384</a>.
- MESQUITA, F. S.; RAMOS, R. S.; PUGLIESI, G.; ANDRADE, S. C. S.; 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. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 2, p. 52–52, 2015. Disponível em: <a href="http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.115.129031">http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.115.129031</a>.
- MUGGENHUMER, D.; VESELY, C.; NIMPF, S.; TIAN, N.; YONGFENG, J.;

- JANTSCH, M. F. Drosha protein levels are translationally regulated during Xenopus oocyte maturation. **Mol Biol Cell**, v. 25, n. 13, p. 2094–2104, 2014. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829383">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829383</a>.
- MUÑOZ, M.; CORRALES, F. J.; CAAMAÑO, J. N.; DÍEZ, C.; TRIGAL, B.; MORA, M. I.; MARTÍN, D.; CARROCERA, S.; GÓMEZ, E. Proteome of the early embryomaternal dialogue in the cattle uterus. **Journal of proteome research**, v. 11, n. 2, p. 751–66, 3 fev. 2012. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22148898">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22148898</a>>.
- NOTHNICK, W. B. Steroidal regulation of uterine miRNA is associated with modulation of the miRNA biogenesis components Exportin-5 and Dicer1. **Endocrine**, v. 37, n. 2, p. 265–273, 2011.
- O'CONNELL, R. M.; TAGANOV, K. D.; BOLDIN, M. P.; CHENG, G.; BALTIMORE, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 5, p. 1604–9, 2007. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774579">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774579</a>.
- O'HARA, L.; FORDE, N.; CARTER, F.; RIZOS, D.; MAILLO, V.; EALY, a D.; KELLY, a K.; RODRIGUEZ, P.; ISAKA, N.; EVANS, a C. O.; LONERGAN, P. Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, n. 2, p. 328–36, jan. 2014. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439105">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439105</a>.
- OLIVEIRA, L. J.; MANSOURRI-ATTIA, N.; FAHEY, A. G.; BROWNE, J.; FORDE, N.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Characterization of the Th Profile of the Bovine Endometrium during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75571, 2013a. Disponível em: <a href="http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0075571">http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0075571</a>.
- OLIVEIRA, L. J.; MANSOURRI-ATTIA, N.; FAHEY, A. G.; BROWNE, J.; FORDE, N.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e75571, jan. 2013b. Disponível em: <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3808391&tool=pmcentre">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3808391&tool=pmcentre</a>
- OLIVEIRA, L. J.; MCCLELLAN, S.; HANSEN, P. J. Differentiation of the endometrial macrophage during pregnancy in the cow. **PloS one**, v. 5, n. 10, p. e13213, jan. 2010. Disponível em:

z&rendertype=abstract>. Acesso em: 3 set. 2014.

- <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2951363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2951363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>. Acesso em: 11 jun. 2012.
- PALMA-VERA, S. E.; EINSPANIER, R. Experimental and bioinformatic analysis of cultured Bovine Endometrial Cells (BEND) responding to interferon tau (IFNT). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 22, 2016. Disponível em: <a href="http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-016-0156-y">http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-016-0156-y</a>.
- PALMA-VERA, S. E.; SHARBATI, S.; EINSPANIER, R. Identification of miRNAs in Bovine Endometrium through RNAseq and Prediction of Regulated Pathways. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 800–806, 2015.

- PAULA-LOPES, F. F.; DE MORAES, a a; EDWARDS, J. L.; JUSTICE, J. E.; HANSEN, P. J. Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-1beta. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1406–1412, 1998.
- PAULA-LOPES, F. F.; S, M. A. A.; HANSEN, P. J. The Presence of Interleukin-1 b in the Bovine Reproductive Tract. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 19, p. 279–285, 1999.
- PERES, R. F. G.; JÚNIOR, I. C.; FILHO, O. G. S.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 681–689, 2009. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X09002131">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X09002131</a>.
- PERNAUTE, B.; SPRUCE, T.; SMITH, K. M.; PERNAUTE, B.; SPRUCE, T.; SMITH, K. M.; S, J. M.; MANZANARES, M.; COBB, B.; RODR, T. A. MicroRNAs control the apoptotic threshold in primed pluripotent stem cells through regulation of BIM MicroRNAs control the apoptotic threshold in primed pluripotent stem cells through regulation of BIM. p. 1873–1878, 2014.
- PONSUKSILI, S.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M.; HADLICH, F.; WIMMERS, K.; SCHWERIN, M.; WIMMERS, K. Differential Expression of miRNAs and Their Target mRNAs in Endometria Prior to Maternal Recognition of Pregnancy Associates with Endometrial Receptivity for In Vivo- and In Vitro-Produced Bovine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 6, p. 135, 2014. Disponível em: <a href="http://www.biolreprod.org/content/91/6/135.abstract">http://www.biolreprod.org/content/91/6/135.abstract</a>.
- PUGLIESI, G.; SANTOS, F. B.; LOPES, E.; NOGUEIRA, É.; MAIO, J. R. G.; 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. 1239–1248, 2016. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15006792">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15006792</a>.
- RAMOS, R. D. S.; MESQUITA, F. S.; D'ALEXANDRI, F. L.; GONELLA-DIAZA, A. M.; PAPA, P. D. C.; BINELLI, M. Regulation of the polyamine metabolic pathway in the endometrium of cows during early diestrus. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 7, p. 584–594, 2014. Disponível em: <a href="http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.22323">http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.22323</a>.
- RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, M. L.; IZAGUIRRY, A. P.; VARGAS, L. M.; SOARES, M. B.; MESQUITA, F. S.; SANTOS, F. W.; BINELLI, M. The periovulatory endocrine milieu affects the uterine redox environment in beef cows. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 39, 2015. Disponível em: <a href="http://www.rbej.com/content/13/1/39">http://www.rbej.com/content/13/1/39</a>>.
- RENTHAL, N. E.; CHEN, C.; WILLIAMS, C.; GERARD, R. D.; PRANGE-KIEL, J. Uterine Quiescence and Contractility During Pregnancy and Labor. **Pnas**, v. 107, n. 48, p. 1–6, 2010. Disponível em: <a href="http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/107/48/20828">http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/107/48/20828</a>>.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, a. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems:

- implications for blastocyst quality. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 589–95, mar. 2002. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870062">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870062</a>.
- RODRIGUEZ, A.; GRIFFITHS-JONES, S.; ASHURST, J. L.; BRADLEY, A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. **Genome Research**, v. 14, n. 10a, p. 1902–1910, 2004. Disponível em: <a href="http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.2722704">http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.2722704</a>.
- SÁ FILHO, M. F.; BALDRIGHI, J. M.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; CARVALHO, J. B. P.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3-4, p. 132–139, 2011.
- SEO, H.; CHOI, Y.; SHIM, J.; CHOI, Y.; KA, H. Regulatory mechanism for expression of IL1B receptors in the uterine endometrium and effects of IL1B on prostaglandin synthetic enzymes during the implantation period in pigs. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 2, p. 31, 2012. Disponível em: <a href="http://www.biolreprod.org/content/87/2/31.long">http://www.biolreprod.org/content/87/2/31.long</a>.
- SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 2, p. 49, 5 jul. 2004. Disponível em: <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=471568&tool=pmcentre.gov/articlerender.fcgi?artid=471568&tool=pmcentre.gov/articlerender.fcgi?artid=471568&tool=pmcentre.gov/articlerender.fcgi?artid=471568&tool=pmcentre.gov/articlerender.fcgi?artid=471568&tool=pmcentre.gov/articlerender.gov/arti
- <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=471568&tool=pmcentrez">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=471568&tool=pmcentrez</a> &rendertype=abstract>. Acesso em: 3 set. 2014.
- SPENCER, T. E.; SANDRA, O.; WOLF, E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 135, n. 2, p. 165–79, fev. 2008. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239047">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239047</a>>. Acesso em: 15 jul. 2011.
- STEWART, J. a; BULMER, J. N.; MURDOCH, a P. Endometrial leucocytes: expression of steroid hormone receptors. **Journal of clinical pathology**, v. 51, n. 2, p. 121–6, 1998. Disponível em:
- <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=500506&tool=pmcentrez">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=500506&tool=pmcentrez</a> &rendertype=abstract>.
- SUN, Y.; CAI, J.; MA, F.; LÜ, P.; HUANG, H.; ZHOU, J. miR-155 mediates suppressive effect of progesterone on TLR3, TLR4-triggered immune response. **Immunology Letters**, p. 3–8, abr. 2012. Disponível em:
- <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247812001101">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247812001101</a>. Acesso em: 3 maio. 2012.
- SVENSSON, J.; JENMALM, M. C.; MATUSSEK, A.; GEFFERS, R.; BERG, G.; ERNERUDH, J. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), v. 187, n. 7, p. 3671–82, 1 out. 2011. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890660">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890660</a>. Acesso em: 13 ago. 2014.
- THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435–1450, 2001.

- TORRES, A.; TORRES, K.; PESCI, A.; CECCARONI, M.; PASZKOWSKI, T.; CASSANDRINI, P.; ZAMBONI, G.; MACIEJEWSKI, R. Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. **BMC cancer**, v. 12, p. 369, 2012. Disponível em:
- <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3495850&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3495850&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>.
- TSCHERNER, A.; GILCHRIST, G.; SMITH, N.; BLONDIN, P.; GILLIS, D.; LAMARRE, J. MicroRNA-34 family expression in bovine gametes and preimplantation embryos. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 12, n. 1, p. 85, 2014. Disponível em: <a href="http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84906931149&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-8490698&partnerID=tZOtx3y1>">http://www.scopus.com/inward/reco
- VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; LIU, J.; HANNON, G. J.; PARKER, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes and Development**, v. 20, n. 5, p. 515–524, 2006.
- VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 307–314, 2001.
- VENTURA, W.; KOIDE, K.; HORI, K.; YOTSUMOTO, J.; SEKIZAWA, A.; SAITO, H.; OKAI, T. Placental expression of microRNA-17 and -19b is down-regulated in early pregnancy loss. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 169, n. 1, p. 28–32, 2013. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.01.025">http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.01.025</a>.
- VILELLA, F.; MORENO-MOYA, J. M.; BALAGUER, N.; GRASSO, A.; HERRERO, M.; MARTINEZ, S.; MARCILLA, A.; SIMON, C. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. **Development**, v. 142, n. 18, p. 3210–3221, 2015. Disponível em: <a href="http://dev.biologists.org/content/142/18/3210.abstract">http://dev.biologists.org/content/142/18/3210.abstract</a>.
- WAHID, F.; SHEHZAD, A.; KHAN, T.; KIM, Y. Y. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 11, p. 1231–1243, 2010. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013">http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013</a>.
- WALKER, C. G.; MEIER, S.; LITTLEJOHN, M. D.; LEHNERT, K.; ROCHE, J. R.; MITCHELL, M. D. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. **BMC genomics**, v. 11, p. 474, jan. 2010. Disponível em: <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3091670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3091670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>.
- WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. v. 3, n. 105, p. 1–7, 2010.
- WENDLER, A.; KELLER, D.; ALBRECHT, C.; PELUSO, J. J.; WEHLING, M. Involvement of let-7/miR-98 microRNAs in the regulation of progesterone receptor membrane component 1 expression in ovarian cancer cells. **Oncology reports**, v. 25, n. 11, p. 273–279, 2011.
- WILSON, R. C.; TAMBE, A.; SCHNEIDER, C. P.; DOUDNA, J. A.; WILSON, R. C.;

- TAMBE, A.; KIDWELL, M. A.; NOLAND, C. L.; SCHNEIDER, C. P. Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Article Dicer-TRBP Complex Formation Ensures Accurate Mammalian MicroRNA Biogenesis. **Molecular Cell**, v. 57, n. 3, p. 397–407, 2015. Disponível em: <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.030">http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.030</a>.
- WILTBANK, M. C.; BAEZ, G. M.; GARCIA-GUERRA, A.; TOLEDO, M. Z.; MONTEIRO, P. L. J.; MELO, L. F.; OCHOA, J. C.; SANTOS, J. E. P.; SARTORI, R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 239–253, 2016. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16300760">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16300760</a>.
- WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I.; DIEDERICHS, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature cell biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009.
- XIA, J.; SINELNIKOV, I. V.; HAN, B.; WISHART, D. S. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W251–7, 2015. Disponível em:
- <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4489235&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4489235&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>.
- XIAO, C.; RAJEWSKY, K. MicroRNA Control in the Immune System: Basic Principles. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 26–36, 2009. Disponível em: <a href="http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408016334">http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867408016334</a>>.
- YANG, Z.; WANG, L. Regulation of microRNA expression and function by nuclear receptor signaling. **Cell & bioscience**, v. 1, n. 1, p. 31, 2011. Disponível em: <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>.
- ZHAO, J.-J.; LIN, J.; YANG, H.; KONG, W.; HE, L.; MA, X.; COPPOLA, D.; CHENG, J. Q. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 45, p. 31079–86, 2008. Disponível em: <a href="http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2576549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2576549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract</a>.
- ZHU, H.; NG, S. C.; SEGR, A. V.; SHINODA, G.; SHAH, S. P.; EINHORN, W. S.; TAKEUCHI, A.; ENGREITZ, J. M.; HAGAN, J. P.; KHARAS, M. G.; URBACH, A.; THORNTON, J. E.; TRIBOULET, R.; GREGORY, R. I.; ALTSHULER, D.; DALEY, G. Q. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. **Cell**, v. 147, n. 1, p. 81–94, 2011.
- ZIELAK-STECIWKO, A. E.; BROWNE, J. A.; MCGETTIGAN, P. A.; GAJEWSKA, M.; DZIECIOL, M.; SZULC, T.; EVANS, A. C. O. Expression of microRNAs and their target genes and pathways associated with ovarian follicle development in cattle. **Physiological genomics**, p. 735–745, 2014. Disponível em: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25096366">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25096366</a>>.

#### Manuscript Details

Manuscript number JRI\_2016\_119

Title Modulation of the Interieukin 1 system by periovulatory sex steroidal milieu in

bovine endometrium

Article type Full Length Article

#### Abstract

In cattle, pre-implantation conceptus development dependes on endometrial function, which is controlled by the periovulatory sex steroid milieu. Immune system modulation of endometrial receptivity to the embryo is critical. However, the cytokine network regulated by sex steroids and associated with receptivity is poorly characterized. Objective of the present study was to compare the effect of the peri-ovulatory endocrine milieu on modulation of the IL1/TLR system in the endometrium at day 7 after estrus. Growth of the pre-ovulatory follicle of cyclic, non-lactating, pluriparous Nellore cows was pharmacologically controlled to produce two groups of cows with distictly different periovulatory endocrine milieus, the large follicle, large CL group (LF-LCL, associated with greater receptivity to the embryo and subsequent fertility; n=8) and the small follicle, small CL group (SF-SCL; n=9). Intracaruncular endometrium from the uterine horn ipsilateral to the CL was dissected seven days after induction of ovulation by GnRH and used for qPCR and western bioting analysis of abundance of IL1/TLR system components. The relative abundance of transcripts of IL1R1, TAB1 and FOXP3, as well as IL1β and IL1R1 proteins were up-regulated in LF-LCL group, while bta-mir-155 microRNA was down-regulated in the same group. Such regulation resulted in greater IL1β production and signaling in the endometrium of receptive cows. We conclude that this phenotype is associated positively with uterine receptivity to the embryo.

Keywords Cattle; Receptivity; Endometrium; endocrine control; Interleukin 1ß

Manuscript category Animai Sciences

Corresponding Author Guilherme Pugliesi

Corresponding Author's

Institution

Order of Authors

University of São Paulo

Everton Lopes, Guilherme Pugliesi, Juliano Silveira, Mario Binelli

Suggested reviewers Trudee Fair, Peter Hansen, Lilian Oliveira, Niamh Forde, Marta Munoz, Isabelle

Hue, Ronaldo Cerri

### Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

cover letter\_JRI\_Lopes.doc [Cover Letter]

Highlights\_Lopes et al.docx [Highlights]

Manuscript\_Lopes et al\_reduced.docx [Manuscript File]

Figure 1\_Lopes et al.pdf [Figure]

Painel Western Blot densidade-2.tif [Figure]

Conflit of Interests\_Lopes et al.doc [Conflict of Interest]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE. Homepage, then click 'Download zip file'.

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO





#### Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

## DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL



June 16th, 2015

Editor-in-Chief Journal of Reproductive Immunology

Dear Editor

Please consider the attached manuscript "Modulation of the interleukin 1 system by periovulatory sex steroidal milieu in bovine endometrium" for publication in Journal of Reproductive Immunology. All authors are aware of this submission. This paper will not be submitted elsewhere until you have made a decision.

In this manuscript, regulation of the IL1/TLR system in the endometrium of two groups of cows with distinctly different periovulatory sex steroidal milieu, which are associated with low or high fertility in cattle. Cows were slaughtered on Day 7 of the estrous cycle and samples from intercaruncular endometrium were used for qPCR and western bloting analysis of abundance of IL1/TLR system components. The differently mRNA, microRNA and protein expression observed in the present results indicated a positive feedback regulation of IL1-β, promoting a modulation of the M2b pathway in the macrophage activation. Main implication is that the differences in the periovulatory sex steroid milieu lead to different modulation of IL1/TLR system in the endometrium at early diestrus that could modify the uterine environment and affect embryo survival and development. Therefore, for the first time in the uterus, we showed the regulation of the IL1/TLR system signaling system by periovulatory endocrine milieus associated with distinct endometrial receptivity phenotypes. The present results contribute with a novel assessment of the multiple potential mechanisms involved in regulation of endometrial receptivity to the embryo in ruminants.

My colleagues and I have nothing to disclose in terms of financial arrangements or conflicts of interest. We have included the names of six suggested reviewers.

Sincerely

Mario Binelli, PhD
Laboratório de Fisiología e Endocrinología Molecular
VRA-FMVZ-USP
Pirassununga, SP - Brasil
binelli@usp.br
+(55-19) 3565-4220

# Highlights

IL1 system in the endometrium is regulated by periovulatory endocrine milieu

IL1-β and IL1R1 is stimulated at early diestrus in the receptive bovine endometrium

mRNA and microRNA expressions indicate activation of M2b and Treg by endocrine

1Modulation of the interleukin 1 system by periovulatory sex steroidal milieu in 2bovine endometrium

3Everton Lopes<sup>4,1</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>4,2</sup>, Juliano Coelho da Silveira<sup>5,3</sup>, Mario Binelli<sup>4,4</sup>

4

5

6<sup>1</sup>mv.everton@gmail.com, <sup>2</sup>pugliesi@hotmail.com, <sup>3</sup>julianodasilveira@usp.br, 7<sup>4</sup>binelli@usp.br

8º Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, Departamento de Reprodução

- 9 Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Duque de Caxias
- 10 Norte, 225, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

11<sup>b</sup> Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, Departamento de 12Ciências Veterinárias, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Av. Duque 13de Caxias Norte, 225, Universidade de São Paulo, Pirassununga Brasil.

14Correspondence: Mario Binelli, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina 15Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, Avenida Duque de 16Caxias Norte, 225, 13635-900, Pirassununga, São Paulo, Brazil. E-mail: binelli@usp.br

#### 18ABSTRACT

19

20In cattle, pre-implantation conceptus development dependes on endometrial function, 21which is controlled by the periovulatory sex steroid milieu. Immune system modulation 220f endometrial receptivity to the embryo is critical. However, the cytokine network 23regulated by sex steroids and associated with receptivity is poorly characterized. 24Objective of the present study was to compare the effect of the peri-ovulatory endocrine 25milieu on modulation of the IL1/TLR system in the endometrium at day 7 after estrus. 26Growth of the pre-ovulatory follicle of cyclic, non-lactating, pluriparous Nellore cows 27was pharmacologically controlled to produce two groups of cows with distictly different 28periovulatory endocrine milieus, the large follicle, large CL group (LF-LCL, associated 29with greater receptivity to the embryo and subsequent fertility; n=8) and the small sofollicle, small CL group (SF-SCL; n=9). Intercaruncular endometrium from the uterine 31horn ipsilateral to the CL was dissected seven days after induction of ovulation and used 32for qPCR and western bloting analysis of abundance of IL1/TLR system components. 33The relative abundance of transcripts of IL1R1, TAB1 and FOXP3, as well as IL1B and 34IL1R1 protein were up-regulated in LF-LCL group, while bta-mir-155 microRNA was 33down-regulated in the same group. Such regulation resulted in greater IL1B production 36and signaling in the endometrium of receptive cows. We conclude that upregulation of 37the IL1 system is associated positively with uterine receptivity to the embryo.

38

39Key words: Cattle; Receptivity; Endometrium; endocrine control; Interleukin 1β; 40Immune System;

#### 421. Introduction

- In the bovine endometrium, expression of genes associated with receptivity is 45controlled by the combined temporal and spatial actions of the ovarian steroids estradiol 46(E2) and progesterone (P4) (Araujo et al., 2014; Forde et al., 2009; Mesquita et al., 472015). Specifically, plasma concentrations of proestrus/estrus E2 and early diestrus P4 48are associated positively with fertility (Meneghetti et al., 2009; Peres et al., 2009; 49Pugliesi et al., 2016). In the endometrium, the sex steroid milieu modulates transcription 500f endometrial genes related to proliferation, apoptosis (Mesquita et al., 2015) and 51redox system (Ramos et al., 2015). It is expected that periovulatory steroid milieu also 52modulates immune function in the endometrium, as several immune-mediated actions 53are controlled during pregnancy establishment in cattle (Bauersachs and Wolf, 2013; 54Groebner et al., 2011).
- Gestation controls genes and signaling pathways in the maternal immune system 56(Walker et al., 2010). Interleukin 1β (IL1β) is a key cytokine that regulates endocrine 57and paracrine responses in the reproductive tissues, including the endometrium 58(Bellehumeur et al., 2009). Expression of IL1β in the endometrium and embryos was 59described previously in the cow (Correia-Álvarez et al., 2015; Muñoz et al., 2012; 60Paula-Lopes et al., 1999), sow (Seo et al., 2012), women (Frank et al., 1995; Huang, 612006) and mice (Fouladi-Nashta et al., 2008). In cattle endometrium, IL1β was detected 62in luminal and glandular epithelia and to a lesser extent in the stroma, possibly 63associated with presence of macrophages (Correia-Álvarez et al., 2015; Paula-Lopes et 64al., 1999).
- 65 IL1 signaling occurs in response to binding of IL1α or IL1β to IL1 type I 66receptors (IL1R1) (Weber et al., 2010), that are present in the plasma membrane

67(Correia-Álvarez et al., 2015). After binding of IL1β to IL1R1, the complex is 68internalized, phosphorylates the TRAF6 kinase that subsequently phosphorylates 69kinases TAB1 e TAB2, resulting in *de novo* transcription of *IL1B* gene. This 70characterizes a positive feedback regulation of the IL1 system (Bellehumeur et al., 712009). Further regulation of IL1 system includes: 1) binding of the antagonist IL1RN to 72IL1R1 inhibits IL1 action by competitive binding (Weber et al., 2010); 2) binding of IL1 73to type II receptors (IL1R2) blocks signal transduction (Bellehumeur et al., 2009); or 3) 74regulation by specific microRNAs. In cultured isolated monocytes, mir-155 can inhibit 75*TAB2* transcription, resulting in reduction of IL1β transcription through the IL1/TLR 76pathway (Ceppi et al., 2009; O'Connell et al., 2007). Besides the embryotrophic effects, 77IL1β possibly acts in the endometrium to activate macrophages and T cells to favor 78receptivity (Walker et al., 2010).

Based on the multiple potential mechanisms involving IL1 that regulate 80endometrial receptivity to the embryo, hypothesis is that the periovulatory sex steroid 81milieu modulates production of and signaling through IL1β in the first week post estrus. 82Objectives were to evaluate the effects of the periovulatory endocrine milieu on (1) the 83abundance of mRNAs, microRNAs and proteins of the IL1/TLR system; (2) the 84abundance of mRNAs involved in macrophage activation and (3) the abundance of 85mRNAs that determine T cell differentiation in the endometrium 7 days after estrus.

#### Material and Methods

Animal procedures were approved by the Ethics and Animal Handling
89Committee of the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
90Paulo (CEUA-FMVZ/USP, No. 2287/2011). Experiments were carried out at the
91Universidade de São Paulo in Pirassununga, São Paulo, Brazil.

## 2.1. Animals and Reproductive Management

Endometrial samples were obtained as described and published previously 96 (Mesquita et al., 2014, 2015). Briefly, Nelore cows (Bos indicus; n= 17) at random 97 stages of the estrous cycle were pre-synchronized and on D-10, received a P4-releasing 98 device (Sincrogest; Ourofino Saúde Animal) and an injection of 2 mg of estradiol 99 benzoate (EB; Sincrodiol; Ourofino Saúde Animal). Then, cows received PGF (large 100 follicle-large corpus luteum group; LF LCL; n = 8) or nothing (small follicle-small 101 corpus luteum group; SF-SCL; n = 9). A PGF was injected and P4 devices were 102 removed between D-1.75 and D-2.5 from cows of LF-LCL and between D-1.25 and 103 D-1.5 for the SF-SCL group. On D0, all animals received an injection of gonadotropin-104 releasing hormone (GnRH; 0.01 mg of buserelin acetate; Sincroforte; Ourofino Saúde 105 Animal) to induce ovulation. Follicle and CL measurements were taken daily from D-2 106 to D7 by transrectal ultrasonography.

# 2.2. Collections of plasma, endometrial tissue

Blood samples were collected on D-1, D0, D2, D6 and D7 by jugular 111venipuncture and plasma was separated by centrifugation and stored at -20°C. On D7, 112intercaruncular endometrium was dissected from the uterine horn ipsilateral to the ovary 113containing a corpus luteum (CL) and stored at -80°C for subsequent analysis.

114

#### 2.3. Plasma concentrations of P4 and E2

116

115

Plasma E2 concentrations were measured using a commercial RIA kit (Double 118Antibody Estradiol, Siemens, Los Angeles, CA, USA), as reported previously (Siddiqui 119et al., 2009). P4 concentrations were measured using a commercial kit (coat-a-count, 120DPC, Siemens, Los Angeles, CA, USA), as validated previously (Garbarino et al., 1212004). The intra- and inter-assay CV and sensitivity for E2, respectively, were 1.7% and 1220.13 pg/mL. For P4, the intra-assay CV and sensitivity were 0.3%, 7.0% and 0.076 123ng/mL.

124

125

## 2.4. Transcript quantification

126

The qPCR procedures have been reported in detail previously by our group 128(Araujo et al., 2014; Mesquita et al., 2015, 2014). Briefly, approximately 30 mg of 129endometrial tissues were submitted to total RNA extraction, using the RNeasy Mini 130columns kit (Qiagen, Gaithersburg, MD, USA) according to the manufacturer's 131instructions. To complementary DNA synthesis 1 µg total RNA was treated with DNAse 132I followed by reverse transcription using a High Capacity cDNA Reverse Transcription 133Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Primers were designed based on GenBank 134Ref-Seq mRNA sequences of target genes, using the Primer Express software, version

136Chemistry was used for all the amplification reactions. PCR products of the primers 137designed were submitted for electrophoresis and sequencing. Details of primers and 138validation of the primers are provided (Table 1 and Supplementary Table).

For each individual sample, PCR efficiency and Cq (quantification cycle) values 140per sample were determined using Lin-RegPCR software (http://linregpcr.nl/) as 141described by Ramakers et al., (2003). For data normalization, Genorm software was 142used as described by Vandesompele et al., (2002). Three constitutive genes – 143cyclophilin (PPIA), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and beta-144actin (ACTB) – were used as inputs. The averaged amplification efficiency of the 145constitutive genes was used for calculation of the relative gene expression Pfaffl, 146(2002).

147

148

### 2.5. Quantification of MiRNA-155 levels

149

Thirty mg of endometrium (n=5, LF-LCL; n=4, SF-SCL) were macerated and 151total RNA isolated using Trizol Reagent (Life Technologies) as per manufacturer's 152instructions. DNAse treatment was performed in 1µg of RNA with DNAsel (Ambion, 153Life Tech). Reverse transcription of miRNAs was performed using the miScript PCR 154System (Qiagen® #218193, Venlo, Limburg, Netherlands) according to the 155manufacturer's instructions. Relative levels of miRNA-155 were examined by qPCR 156using miRNA-155 specific primers designed to target the mature miRNA sequence 157downloaded from mirBase database (www.mirbase.org). Raw Ct values were 158normalized to the geometric mean of RNT43snoRNA; Hm/Ms/Rt T1 RNA and bta-159miR-99b, previously used in reproductive tissues (da Silveira et al. 2014; da Silveira, et

160al. 2015) and invariably present in all samples. Bioinformatic analysis of miR-155 161targets were identified using DIANA TOOLS pathways package (Vlachos et al., 2012) 162and TargetScan to identify miR-155 targets specific to cattle.

163

164 2.6. Western blotting

165

Twenty µg endometrial whole tissue extracts were separated by 10% SDS/PAGE 166 167 and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in TBST (Tris-168buffered saline containing 0.1% of Tween-20) with 3% of bovine serum albumin (BSA) 169 for 1 hr, and subsequently incubated overnight in 3% of BSA in a 1:200 dilution of 170rabbit (polyclonal) anti-IL1\(\beta\) antibody (Imuny, RheaBiotech, Campinas, BR, IM-0619) 1710r anti-IL1R1 antibody (Abcam, Cambridge, UK; Ab106278). Subsequently, 172membranes were washed in TBST and incubated in secondary antibody anti-rabbit IgG 173(GE in a 1:1000 dilution). The same membrane was incubated in 1:200,000 dilution of 174monoclonal Anti-b-actin-antibody produced in mouse (code A3854, Sigma-Aldrich, St 175Louis, MO) for 1 h at room temperature. Membranes were washed in TBST and 176incubated with enhanced chemiluminescence (ECL) reagent. Bands were visualized 177utilizing the ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Amersham; RPN2232, 178GE Healthcare Life Sciences). Protein quantification was performed with Image Lab 179software version 5.02. For each sample, normalized abundance was calculated as the 180 ratio between optical density of the target band and the  $\beta$ -actin band.

181

182 2.7. Statistical Analyses

The data were tested for normality of residues using Shapiro-Wilk test. Data that 185were not normal were transformed to Rank. Single end-point data for ovarian, 186endocrine, and protein and transcript abundance variables were analyzed by one-way 187ANOVA using the PROC MIXED procedure of the SAS software (Version 9.2; SAS 188Institute) to test the effect of group (LF-LCL vs. SF-SCL).

189

190

### Results

191

192

#### 3.1. Animal model

193

Follicle diameter on D0 (10.31  $\pm$  0.23 vs. 13.88  $\pm$  0.29 mm), E2 plasma concentration on D-1 (0.98  $\pm$  0.12 vs. 3.09  $\pm$  0.43 pg/mL), CL volume on D7 (1.84  $\pm$  0.21 vs. 3.12  $\pm$  0.49 cm<sup>3</sup>) and P4 plasma concentration on D7 (2.13  $\pm$  0.24 vs. 3.76  $\pm$  0.28 ng/mL) were greater (P<0.05) for the LF-LCL group compared to the SF-SCL group.

199

200 3.2. Effect of sex steroidal milieu on endometrial mRNA microRNA abundance

202

The transcript abundance of 20 genes related to the immune system was 204evaluated by qPCR in the endometrial tissue. Furthermore, we used a previously 205published RNAseq database that analyzed some of the same samples used here 206(Mesquita et al., 2016), to compare the abundance of other immune-related genes 207between LF-LCL and SF-SCL groups. Abundance of transcripts is represented in Table 2082. Genes were divided according to the signaling pathway they stimulate and, within

209each pathway, classified according to their role as stimulus or as product. Presence or 210absence of transcripts of key signaling molecules was interpreted to establish whether a 211given pathway was present in the endometrium. Thus, absence of IFNG (M1), IL4 and 212IL13 (M2a), IL10 (M2c), IL2 (th1) and IL4 (th2) suggested lack of activation of specific 213pathways. In contrast, presence of TLRs and IL1 (M2b) and FOXP3 (Treg) suggested 214that these two pathways were stimulated in the endometrium. Next, we wanted to 215determine whether pathways were regulated by the experimental model. The abundance 2160f *IL1R1* and *TAB1* (IL1 system) and FOXP3 (Treg system) transcripts was greater 217(P<0.1) in the LF-LCL group than in the SF-SCL group (Table 2). For the remaining 17 218genes, transcript abundance was similar between treatments (P>0.1). The abundance of 219bta-mir-155 transcript was greater (P<0.05) in the LF-LCL group than in the SF-SCL 220group (Fig. 2).

221

3.3. Effect of sex steroidal milieu on protein abundance

223

The relative protein expression for IL1- $\beta$  and IL1R1 was evaluated by western-225blotting (Fig 2). For IL1- $\beta$  expression, an immunoreagent band with approximately 22635kDa molecular weight was observed, corresponding to the expected molecular weight 2270f the IL1- $\beta$  pro-form (Fig. 2; Panel A). The mature and active form (IL1- $\beta$ , 17kDa) was 228not detected in any sample analyzed. Therefore, considering only the inactive form, the 229abundance of IL1- $\beta$  in the D7 endometrial tissue was greater (P<0.1) in the LF-LCL 230group than in the SF-SCL group (Fig. 2; Panel B). For the IL1R1, the immune-reactive 231band was observed at approximately 65kDa (Fig. 2; Panel C), and also a greater (P<0.1) 232abundance of IL1R1 was observed in the LF-LCL group than in the SF-SCL group (Fig. 2332; Panel D).

#### 4. Discussion

236

235

Present results indicate that the innate immune system is modulated by different 238endocrine profiles on D7 of estrous cycle. Specifically, the greater circulating 239concentrations of sex steroid hormones during peri-ovulatory period observed in the LF-240LCL group increased the protein abundance of IL1β and its receptor IL1R1. 241Accordingly, mRNA abundance for IL1R1 was up-regulated in the endometrium. 242Considering the important production of interleukins and its receptors both by 243macrophages and in the epithelial and glandular cells (Correia-Álvarez et al., 2015; 244Paula-Lopes et al., 1999), the present results suggest that the greater concentrations of 245E2 at proestrus/estrus and P4 at diestrus modulate the production of IL1β in the bovine 246endometrium. In addition, we speculate that the better availability of IL1β may favor 247simultaneously the endometrium and the embryo, and consequently has a positive 248impact on pregnancy maintenance.

The complex regulation of the IL1 system is multifactorial and may be at the 250ligand, receptor and post-receptor levels. Regarding the ligand, the abundance of 251transcripts for the agonist IL1A and the antagonist IL1RN was similar between groups. 252Hence, an influence of E2 and P4 concentrations during peri-ovulatory period on this 253portion of the IL1 regulatory pathway is not supported. At the receptor level, the greater 254abundance of mRNA and protein for IL1R1 in the cows presenting greater 255concentrations of sex steroids (LF-LCL group) suggests the possibility of priority 256signaling in this group of cows. Complementary, the similar expression between groups 2570f IL1R2, the non-signaling receptor, suggests that no control of IL1 action was exerted 258at this level. In the endometrium, targets of IL1 signaling could be both epithelial cells 259and macrophages. In the later cell type, M2b type of activation through IL1R1 receptors

260stimulates IL1 transcription in an auto-regulatory manner. However, M2b activation 261may also be through LPS stimulus signaling via TLRs. Despite using the same 262intracellular machinery as IL1, TLR activation yields synthesis of TNFα. The lack of 263TNFα expression and the similar abundance of transcripts for TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, 264and TLR8 between groups indicate that, if M2b macrophages are involved in the 265differential production of IL1 between groups, they are using their intracellular 266machinery to produce IL1 and not TNFo. Regarding intracellular signaling, binding to 267IL1R1 activates TRAF6-mediated phosphorylation of the TAB1-TAB2 complex. This 268complex activates downstream kinases that trigger transcription of the IL1B gene. The 269periovulatory steroid milieu may have regulated IL1b transcription at this level, because 270abundance of TAB1 mRNA was increased in the LF-LCL group. Furthermore, protein 271expression of TAB2 may have been affected in the same direction. Specifically, post-272transcriptional control of the IL1/TLR signaling pathway can be regulated by bta-mir-273155. Indeed, TAB2 is a target mRNA of bta-mir-155 (www.targetscan.org). In this 274regard, TAB2 is regulated post-transcriptionally in monocyte-derived cells of mice 275(Ceppi et al., 2009). In the present study, expression of bta-mir-155 was reduced in the 276endometrium of cows with greater sex steroid concentrations during the peri-ovulatory 277period. Consistently, the expression of mir-155 is inhibited by P4 in cultured mice 278macrophages (Sun et al., 2012). We speculate that despite the similar abundance of 279mRNA for TAB2 between groups, the TAB2 protein expression may have increased in 28othe endometrium from LF-LCL in response to a lower suppression of TAB2 281 transduction. This is also in agreement with the greater stimulation of IL1 abundance in 282the endometrium of cows from LF-LCL group. In summary, the peri-ovulatory 283endocrine milieu modulates the IL1/TLR system, increasing the relative expression of 284mRNA of IL1R1 and the TAB1, and the protein expression of IL1B and IL1R1.

285Additionally, because of the potential inhibition of TAB2 translation, the bta-mir-155 is 286possibly involved in the modulation of IL1/TLR system in the bovine endometrium, 287stimulating the IL1β production.

In the present study, we investigated the presence of markers for several 289activation pathways of macrophages. The M1 classical pathway is pro-inflammatory 290and stimulates the Th1 response (Martinez and Gordon, 2014). In the presence of LPS, 291this pathway is induced by IFNγ or TNFα, and produces TNFα, IL1 and IL6, and 292modulates secretion of IL12 and IL10 (Mantovani et al., 2004). The absence of IFNγ, 293TNF, IL6 and IL10 expression by qPCR, and the low expression of IL12 observed in the 294RNASeq indicate that this pathway may be not modulated by the sex steroidal 295periovulatory milieu. The M2 alternative pathway may be stimulated by IL4 and IL13 296(M2a), TLR/IL1R (M2b) and IL10 (M2c) (Martinez and Gordon, 2014). In the present 297study, mRNA for IL4, IL13 and IL10 were not detected, suggesting an absence of 298stimulus for M2a and M2c activation pathways. Also, the main products of these two 299pathways were not detected (IL10 and IL1RII) or showed similar abundance between 300groups (IL1RN).

M2b activation stimulates recruitment of Treg cells and activation of Th2 cells 302(Mantovani et al., 2004). Typically, the presence of immune complexes for macrophage 303activation is crucial for M2b pathway (Mantovani et al., 2004), but Lu et al. (2015) 304reported that P4 stimulate its membrane receptors and stimulates IL1B expression in 305mice. This is possibly the main activation pathway presented in the endometrium that is 306stimulated by P4 during diestrus in our animal model. The components of TLR system 307were not abundant and did not differ between the treatment groups; whereas IL1β and 308its receptor IL1R1 were up-regulated in cows with greater concentrations of E2 at 309proestrus/estrus and P4 at diestrus. In the present report, there is no evidence for Treg

311LF-LCL group, corroborating with the alternative M2b activation pathway proposed by 312Mantovani et al., (2004). This stimulatory profile is also supported by studies reporting 313the M2 pathway activation in macrophages (Mansouri-Attia et al., 2012; Oliveira et al., 3142010) and T cells (Bauersachs and Wolf, 2013; Groebner et al., 2011; Walker et al., 3152010).

Collectively, we propose that the periovulatory endocrine milieu regulates 316 317endometrial receptivity to the embryo through changes in endometrial function. Here, 318we showed that endometrial changes include regulation of IL1 production and signaling. 319Events may involve endometrial epithelial cells and immune system cells. Regardless of 320the cellular source, excess IL1 may benefit embryo development both by direct effects 321in the embryo and indirect effects in the endometrium. Indeed, supplementation of IL18 322increased the proportion of fertilized oocytes which develop to the blastocyst stage 323(Paula-Lopes et al., 1998). Additionally, IL1ß protein expression in the caruncular areas 3240f the bovine endometrium is greater in the presence of embryos (Correia-Álvarez et al., 3252015). In humans, IL1B is involved in the implantation process (Huang, 2006). 326Consistently, a positive correlation between IL1B measured in the medium of human 327embryos cultured in vitro and pregnancy success is also reported (Sequeira et al., 2015). In conclusion, we showed for the first time the regulation of the IL1/TLR system 329signaling system by periovulatory endocrine milieus associated with distinct 330endometrial receptivity phenotypes. Specifically, greater circulating concentrations of 331E2 at proestrus/estrus and P4 at diestrus in cows ovulating large follicles resulted in 332greater protein abundance of IL1-β and IL1R1 in the endometrium 7 days after estrus. 333The relative abundance of transcripts of IL1R1 and TAB1 were also up-regulated in this 334group of cows, while bta-mir-155 microRNA was down-regulated. This indicated a 335positive feedback regulation of IL1-β, promoting a modulation of the M2b pathway of 336macrophage activation. In addition, abundance of mRNAs that determine T cell 337differentiation was only differently modulated by the sex steroidal milieu in the Treg 338pathway. Functional studies to determine the essentiality of such system for proper 339embryo development are warranted.

#### 340 References

- 341 Araujo, E., Sponchiado, M., Pugliesi, G., Van Hoeck, V., Mesquita, F.S., Membrive,
- 342 C.M.B., Binelli, M., 2014. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene
- 343 transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract.
- 344 Reprod. Fertil. Dev. doi:http://dx.doi.org/10.1071/RD14178
- 345Bauersachs, S., Wolf, E., 2013. Immune aspects of embryo-maternal cross-talk in the
- 346 bovine uterus. J. Reprod. Immunol. 97, 20–6. doi:10.1016/j.jri.2012.11.002
- 347Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Spencer, T.E., Wu, G., 2008. Interferons
- 348 and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions
- 349 among. Reprod. Biol. 8, 179-211.
- 350Bellehumeur, C., Blanchet, J., Fontaine, J.-Y., Bourcier, N., Akoum, a, 2009.
- 351 Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct
- 352 mechanisms. Hum. Reprod. 24, 2193–204. doi:10.1093/humrep/dep192
- 353Ceppi, M., Pereira, A.M., Dunand-Sauthier, I., Barras, E., Reith, W., Santos, M.A.,
- 354 Pierre, P., 2009. MicroRNA-155 modulates the interleukin-1 signaling pathway in
- 355 activated human monocyte-derived dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.
- 356 106, 2735-2740. doi:10.1073/pnas.0811073106
- 357 Correia-Álvarez, E., Gómez, E., Martín, D., Carrocera, S., Pérez, S., Otero, J., Peynot,
- 358 N., Giraud-Delville, C., Caamaño, J.N., Sandra, O., Duranthon, V., Muñoz, M.,
- 359 2015. Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor
- 360 (type I) in the bovine endometrium and embryo. J. Reprod. Immunol. 110, 1–13.
- 361 doi:10.1016/j.jri.2015.03.006
- 362da Silveira, J.C., Carnevale, E.M., Winger, Q. a, Bouma, G.J., 2014. Regulation of
- 363 ACVR1 and ID2 by cell-secreted exosomes during follicle maturation in the mare.
- 364 Reprod. Biol. Endocrinol. 12, 44. doi:10.1186/1477-7827-12-44

- 365da Silveira, J.C., Winger, Q.A., Bouma, G.J., Carnevale, E.M., 2015. Effects of age on
- 366 follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth
- 367 factor-? signalling during follicle development in the mare. Reprod. Fertil. Dev.
- 368 897-905. doi:10.1071/RD14452
- 369Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M. a, Evans, a C.O., Spencer, T.E., Bazer, F.W.,
- 370 McBride, R., Boland, M.P., O'Gaora, P., Lonergan, P., Roche, J.F., 2009.
- 371 Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to
- 372 advanced conceptus development in cattle. Biol. Reprod. 81, 784–94.
- 373 doi:10.1095/biolreprod.108.074336
- 374Fouladi-Nashta, a a, Mohamet, L., Heath, J.K., Kimber, S.J., 2008. Interleukin 1
- 375 signaling is regulated by leukemia inhibitory factor (LIF) and is aberrant in Lif-/-
- 376 mouse uterus. Biol. Reprod. 79, 142-53. doi:10.1095/biolreprod.107.065219
- 377Frank, G.R., Brar, a K., Jikihara, H., Cedars, M.I., Handwerger, S., 1995. Interleukin-1
- 378 beta and the endometrium: an inhibitor of stromal cell differentiation and possible
- 379 autoregulator of decidualization in humans. Biol. Reprod. 52, 184–191.
- 380 doi:10.1095/biolreprod52.1.184
- 381 Garbarino, E.J., Hernandez, J.A., Shearer, J.K., Risco, C.A., Thatcher, W.W., 2004.
- 382 Effect of Lameness on Ovarian Activity in Postpartum Holstein Cows\*. J. Dairy
- 383 Sci 87, 4123-4131. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73555-9
- 384Gonella-Diaza, A.M., da Silva Andrade, S.C., Sponchiado, M., Pugliesi, G., Mesquita,
- 385 F.S., Van Hoeck, V., de Francisco Strefezzi, R., Gasparin, G.R., Coutinho, L.L.,
- 386 Binelli, M., 2015. Size of the Ovulatory Follicle Dictates Spatial Differences in the
- 387 Oviductal Transcriptome in Cattle. PLoS One 10, e0145321.
- 388 doi:10.1371/journal.pone.0145321
- 389Groebner, a E., Schulke, K., Schefold, J.C., Fusch, G., Sinowatz, F., Reichenbach,

- 390 H.D., Wolf, E., Meyer, H.H.D., Ulbrich, S.E., 2011. Immunological mechanisms to
- 391 establish embryo tolerance in early bovine pregnancy. Reprod. Fertil. Dev. 23,
- 392 619-32. doi:10.1071/RD10230
- 393Huang, H.-Y., 2006. The cytokine network during embryo implantation. Chang Gung
- 394 Med. J. 29, 25–36.
- 395Lu, J., Reese, J., Zhou, Y., Hirsch, E., 2015. Progesterone-induced activation of
- 396 membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells. J.
- 397 Endocrinol. 224, 183–194. doi:10.1530/JOE-14-0470
- 398Mansouri-Attia, N., Oliveira, L.J., Forde, N., Fahey, A.G., Browne, J.A., Roche, J.F.,
- 399 Sandra, O., Reinaud, P., Lonergan, P., Fair, T., 2012. Pivotal role for
- 400 monocytes/macrophages and dendritic cells in maternal immune response to the
- 401 developing embryo in cattle. Biol. Reprod. 87, 123.
- 402 doi:10.1095/biolreprod.112.101121
- 403Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The
- 404 chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.
- 405 Trends Immunol. 25, 677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
- 406Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation:
- 407 time for reassessment. F1000Prime Rep. 6, 13. doi:10.12703/P6-13
- 408Meneghetti, M., Filho, O.G.S., Peres, R.F.G., Lamb, G.C., Vasconcelos, J.L.M., 2009.
- 409 Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus
- 410 cows I: Basis for development of protocols. Theriogenology 72, 179–189.
- 411 doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.010
- 412Mesquita, F.S., Pugliesi, G., Scolari, S.C., França, M.R., Ramos, R.S., Oliveira, M.,
- 413 Papa, P.C., Bressan, F.F., Meirelles, F.V., Silva, L.A., Nogueira, G.P., Membrive,
- 414 C.M.B., Binelli, M., 2014. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu

- 415 affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows.
- 416 Theriogenology 81, 861–869. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.12.022
- 417 Mesquita, F.S., Ramos, R.S., Pugliesi, G., Andrade, S.C.S., Van Hoeck, V., Langbeen,
- 418 A., Oliveira, M.L., Gonella-Diaza, A.M., Gasparin, G., Fukumasu, H., Pulz, L.H.,
- 419 Membrive, C.M., Coutinho, L.L., Binelli, M., 2016. Endometrial transcriptional
- 420 profiling of a bovine fertility model by Next-Generation Sequencing. Genomics
- 421 Data 7, 26–28. doi:10.1016/j.gdata.2015.11.008
- 422Mesquita, F.S., Ramos, R.S., Pugliesi, G., Andrade, S.C.S., Van Hoeck, V., Langbeen,
- 423 A., Oliveira, M.L., Gonella-Diaza, A.M., Gasparin, G., Fukumasu, H., Pulz, L.H.,
- 424 Membrive, C.M., Coutinho, L.L., Binelli, M., 2015. The receptive endometrial
- 425 transcriptomic signature indicates an earlier shift from proliferation to metabolism
- 426 at early diestrus in the cow. Biol. Reprod. 93. doi:10.1095/biolreprod.115.129031
- 427 Muñoz, M., Corrales, F.J., Caamaño, J.N., Díez, C., Trigal, B., Mora, M.I., Martín, D.,
- 428 Carrocera, S., Gómez, E., 2012. Proteome of the early embryo-maternal dialogue
- 429 in the cattle uterus. J. Proteome Res. 11, 751-66. doi:10.1021/pr200969a
- 430O'Connell, R.M., Taganov, K.D., Boldin, M.P., Cheng, G., Baltimore, D., 2007.
- 431 MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. Proc.
- 432 Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 1604–9. doi:10.1073/pnas.0610731104
- 433Oliveira, L.J., McClellan, S., Hansen, P.J., 2010. Differentiation of the endometrial
- 434 macrophage during pregnancy in the cow. PLoS One 5, e13213.
- 435 doi:10.1371/journal.pone.0013213
- 436 Paula-Lopes, F.F., de Moraes, a a, Edwards, J.L., Justice, J.E., Hansen, P.J., 1998.
- 437 Regulation of preimplantation development of bovine embryos by interleukin-
- 438 1beta. Biol. Reprod. 59, 1406-1412.
- 439 Paula-Lopes, F.F., S., M.A.A., Hansen, P.J., 1999. The Presence of Interleukin-1 b in the

- 440 Bovine Reproductive Tract. J. Interferon Cytokine Res. 19, 279–285.
- 441Peres, R.F.G., Júnior, I.C., Filho, O.G.S., Nogueira, G.P., Vasconcelos, J.L.M., 2009.
- 442 Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating
- 443 cows submitted to fixed-time artificial insemination. Theriogenology 72, 681–689.
- 444 doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.026
- 445Pfaffl, M.W., 2002. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise
- 446 comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.
- 447 Nucleic Acids Res. 30, 36e–36. doi:10.1093/nar/30.9.e36
- 448Pugliesi, G., Santos, F.B., Lopes, E., Nogueira, É., Maio, J.R.G., Binelli, M., 2016.
- 449 Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented
- 450 with long-acting progesterone after timed-AI. Theriogenology 85, 1239–1248.
- 451 doi:10.1016/j.theriogenology.2015.12.006
- 452 Ramakers, C., Ruijter, J.M., Lekanne Deprez, R.H., Moorman, A.F.M., 2003.
- 453 Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction
- 454 (PCR) data. Neurosci. Lett. 339, 62–66. doi:10.1016/S0304-3940(02)01423-4
- 455 Ramos, R.S., Oliveira, M.L., Izaguirry, A.P., Vargas, L.M., Soares, M.B., Mesquita, F.S.,
- 456 Santos, F.W., Binelli, M., 2015. The periovulatory endocrine milieu affects the
- 457 uterine redox environment in beef cows. Reprod. Biol. Endocrinol. 13, 39.
- 458 doi:10.1186/s12958-015-0036-x
- 459Seo, H., Choi, Y., Shim, J., Choi, Y., Ka, H., 2012. Regulatory mechanism for
- 460 expression of IL1B receptors in the uterine endometrium and effects of IL1B on
- 461 prostaglandin synthetic enzymes during the implantation period in pigs. Biol.
- 462 Reprod. 87, 31. doi:10.1095/biolreprod.112.099051
- 463Sequeira, K., Espejel-Núñez, A., Vega-Hernández, E., Molina-Hernández, A., Grether-
- 464 González, P., 2015. An increase in IL-1β concentrations in embryo culture-

- 465 conditioned media obtained by in vitro fertilization on day 3 is related to successful
- 466 implantation. J. Assist. Reprod. Genet. 32, 1623–1627. doi:10.1007/s10815-015-
- 467 0573-4
- 468Siddiqui, M.A.R., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Almamun, M., Beg, M.A., Ginther, O.J.,
- 469 2009. Relationship of vascular perfusion of the wall of the preovulatory follicle to
- 470 in vitro fertilisation and embryo development in heifers. Reproduction 137, 689-
- 471 697. doi:10.1530/REP-08-0403
- 472 Sun, Y., Cai, J., Ma, F., Lü, P., Huang, H., Zhou, J., 2012. miR-155 mediates suppressive
- 473 effect of progesterone on TLR3, TLR4-triggered immune response. Immunol. Lett.
- 474 3-8. doi:10.1016/j.imlet.2012.04.007
- 475 Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A.,
- 476 Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data
- 477 by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. 3,
- 478 RESEARCH0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- 479 Vlachos, I.S., Kostoulas, N., Vergoulis, T., Georgakilas, G., Reczko, M., Maragkakis,
- 480 M., Paraskevopoulou, M.D., Prionidis, K., Dalamagas, T., Hatzigeorgiou, A.G.,
- 481 2012. DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs
- 482 in pathways. Nucleic Acids Res. 40, W498-504. doi:10.1093/nar/gks494
- 483Walker, C.G., Meier, S., Littlejohn, M.D., Lehnert, K., Roche, J.R., Mitchell, M.D.,
- 484 2010. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo.
- 485 BMC Genomics 11, 474. doi:10.1186/1471-2164-11-474
- 486Weber, A., Wasiliew, P., Kracht, M., 2010. Interleukin-1 (IL-1) Pathway 3, 1-7.
- 487 doi:10.1126/scisignal.3105cm1

488

# 490 Table 1. Sequence of primers used for qPCR.

Gene	ш	Primer sequence	Primer sequence	
		forward (5'-3')	reverse (5'-3')	
B-Actin	NM_173979.3	GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA	TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	
GAPDH		GCCATCAATGACCCCTTCAT	TGCCGTGGGTGGAATCA	
FOXP3	NM_001045933.1	TGGTGCAATCTCTGGAGCAA	GTCAGATGATGCCGCAGATG	
<i>IFNG</i>	NM_174086.1	GGAGGACTTCAAAAAGCTGATTCA	CGGCCTCGAAAGAGATTCTG	
IFNGR	NM_001035063.1		TGGTTAGAAAGGACCCTGGAGTT	
ILIA	NM_174092.1	CACCTCTCTCTCAATCAGAAGTCCTT	GGATGTCTTAGAGGTTTCCGAGGTA	
ILIRI	NM_001206735.1	ACAGCACGACGCCTGTATCTAC	GCTGCACAAACTCTACCACTATTTTAA	
IL1R2	NM_001046210.2	CGAGTTAAGAAAAGAGACGAGGAGACT	<sup>T</sup> CAGCAGAGTGGTTGTGTGTATGC	
IL1RN	NM 174357.3	GCTCAAGTTAGAGGCCGTGAA	TGGTGGGCCCGTTGTC	
II.2	NM 180997.2	CAAACGGTGCACCTACTTCAAG	TGGGCACGTAAAAGTCAAATGT	
II.4	NM 173921.2	AAAACGCTGAACATCCTCACAA	GCACGTGTGGCTCCTGTAGA	
IL4R	NM 001075142.1	CCAGGATTCTCAGGTGTCACTGT	GCCCATTTCTAGCAGCCTTAGA	
IL6	NM 173923.2	TAAGCGCATGGTCGACAAAA	TTGAACCCAGATTGGAAGCAT	
IL6R	NM 001110785.1	ACCACCAAGGCCGTGTTACT	GGCGACACACAGGGACAATA	
IRAK4	NM 001075998.1	ACAAACCCATAACAGCATCAACA	AATGCTTCAAATCTCCTTATGTGAAA	
PPIA	BF230516.1	GCCATGGAGCGCTTTGG	CCACAGTCAGCAATGGTGATCT	
TAB1	NM 001102057.1	GACGCGCTGGCTGAGAAG	GCCTTGAGTCTTTCGAGGATCTT	
TAB2	NM 001192372.1	AATGCAGCAGTTGAGAAGTTGTAATAG	TGGCACAGGGCCTACAAATC	
TLR3	NM 001008664.1	AAAGATCCACTATGCAAAAGATTCAA	TTTAAACATCCCTCTTCGCAAAC	
TLR4	NM 174198.6	TGCGTACAGGTTGTTCCTAACATT	CTGGAGAAGTTATGGCTGCCTAA	
TLR7	NM 001033761.1	AGTGGAAATTGCCCTCGTTGT	GGGCACGTGCTGTAGAGAGTT	
TLR8	NM_001033937.1	CATGCACAATCTGAAGGTATTGG	TGGAGAGATATAAGCTTCGAGAAATT T	
TNFA	NM_173966.3	CCACGTTGTAGCCGACATCA	GCCTTGGCCCCTGAAGAG	
TNFR1	NM_174674.2	AGGACCCAGGCACTACAGTACTATTAC	CACCGCTGGTAGCGACATG	
TNFR2	NM 001040490.2	AGCTCCAAGCACCTTCTTCCT	AATCAGTTCAATGGGAAGAGAGATG	
492				

496 Table 2. Fold change of the abundance of mRNA for genes related to the immune
497 system in the Day 7 endometrium between cows presenting a small pre498 ovulatory follicle and small corpus luteum (SF-SCL group) and a large pre499 ovulatory follicle and large corpus luteum (LF-LCL group) determined by
500 qPCR and RNAseq analyses.

			PCR (n=8-9 cows/group)		RNASeq (n=3 cows/group)	
Signaling Pathway	Gene		Fold Change (SF-SCL/LF-LCL)	P-value	Fold Change P-vals (SF-SCL/LF-LCL)	10
IL1System	IL1A	5	0.98	0.80	ND	
-	IL1B	S	NA		1.38	0.74
	IL1RN	S S	0.96	0.87	ND	
	IL1R1	S	0.66	0.004	ND	
	IL1R2	S	ND		0.99	0.87
	IRAK4	S	1.16	0.31	1.74	0.01
	TAB1	S	0.83	0.07	0.70	0.03
	TAB2	S	1.05	0.65	0.84	0.31
M1	IFNG	S	ND		ND	
	IFNGR	S	0.97	0.72	1.12	0.44
	TNFa	S/P	ND		ND	
	TNFRI	S	1.01	0.81	ND	
	TNFR2	S	0.97	0.87	ND	
	IL1B	S P	NA		1.38	0.74
	II.12	P	NA		1.18	0.88
	IL6	P	ND		ND	
	IL23	P	NA		1.04	0.83
M2a	IL4	S	ND		ND	
	IL4R	S	1.00	0.99	1.22	0.34
	IL13	Š	NA	0.55	ND	
	ILIRN	S P	0.96	0.87	ND	
	IL10	P	NA		ND	
M2b	TLR1	5	NA.		1.45	0.11
	TLR3	5	0.83	0.22	ND	
	TLR4	S S	0.98	0.9	2.01	0.001
	TLR7	S	0.65	0.17	1.69	0.104
	TLRS	S	0.59	0.22	2.04	0.105
	IL1R1	S	0.66	0.004	ND	
	IL10	P	NA	0.004	ND	
	IL12	P	NA.		1.18	0.88
	IL1B	S/P	NA		1.38	0.74
	IL6	P	ND		ND	0.74
	TNFa	P	ND		ND	
M2c	IL.10	s	NA.		ND	
	TGFβ	P	NA.		1.22	0.61
Th1	11.2	P	ND		ND	
	IFNG	s	ND		ND	
Th2	IL4	S/P	ND		ND	
Treg	<b>FOXP3</b>	P	0.68	0.08	ND	

501S: stimulus; P: product; ND: not detected; NA: not analyzed

502 Supplementary table 1. Validation of primer sequences for bovine endometrial tissue analyzed by qPCR

Gene	Standard curve slope	r <sup>2</sup>	Standard curve efficiency (%)	Amplification efficiency (%)
B-actin	-3.195	0.994	105.65	96.8
GAPDH	-3.373	0.990	100.35	91.5
PPIA	-3.465	0.990	94.36	92.3
FOXP3	-3.31	0.996	100.47	91.5
IFNGR	-3.489	0.999	93.48	91.9
ILIA	-3.206	0.978	105.09	90.6
IL1R1	-3.182	0.992	106.19	87.3
ILIRN	-3.322	0.979	99.98	90.9
IL4R	-3.404	0.995	96.70	89.6
IL6R	-3.577	0.997	90.34	90.3
IRAK4	-3.317	0.992	100.21	90.6
TABI	-3.262	0.998	102.56	89.0
TAB2	-3.322	0.998	99.98	88.8
TLR3	-3.502	0.99	93.01	90.2
TLR4	-3.327	0.988	99.79	90.9
TLR7	-3.458	0.987	94.60	97.7
TLRS	-3,439	0.994	95.32	88.3
TNFR1	-3.329	0.999	99.71	90.4
TNFR2	-3.339	0.999	99.29	88.8

504Fig. 1. Relative abundance of bta-mir-155 microRNA in the D7 endometrium of cows 505presenting a small pre-ovulatory follicle and small corpus luteum (SF-SCL group; n=4 506cows) or a large pre-ovulatory follicle and large corpus luteum (LF-LCL group; n=5 507cows).

510Fig. 2. Relative abundance (optical density) of IL1-β (Panels A nd B) and IL1R1 (Panels 511C and D) in the D7 endometrium of cows (4-5 cows/group for IL1-β; and 8-9 512cows/group for IL1R1) presenting a large pre-ovulatory follicle and large corpus luteum 513(LF-LCL group) or a small pre-ovulatory follicle and small corpus luteum (SF-SCL 514group).

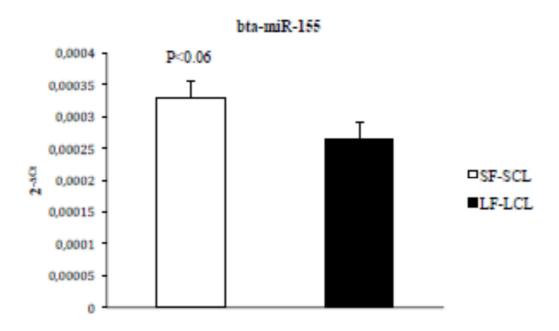
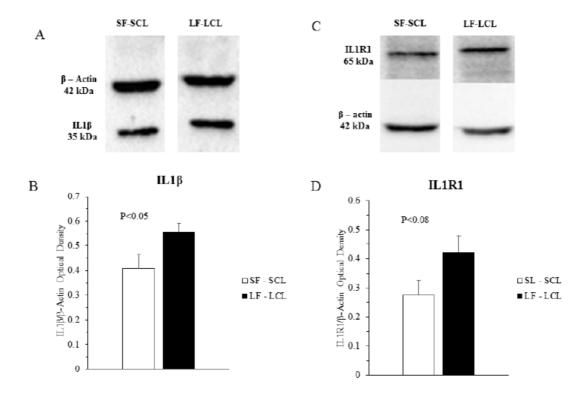


Figure 1



# Universidade de São Paulo





# FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

# DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL



June 16th, 2015

Editor-in-Chief Journal of Reproductive Immunology

Dear Editor

My colleagues and I have nothing to disclose in terms of financial arrangements or conflicts of interest.

Sincerely

Mario Binelli, PhD
Laboratório de Fisiología e Endocrinología Molecular
VRA-FMVZ-USP
Pirassununga, SP - Brasil
binelli@usp.br
+(55-19) 3565-4220