RAFAEL TEIXEIRA DE SOUSA

Estudo do mecanismo molecular da progesterona e do estradiol no desenvolvimento do endométrio de novilhas Nelore pré-púberes

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva

Pirassununga
2017

RAFAEL TEIXEIRA DE SOUSA

Estudo do mecanismo molecular da progesterona e do estradiol no desenvolvimento do endométrio de novilhas Nelore pré-púberes

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

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva

De acordo:_____
Orientador

Pirassununga
2017

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

VERSÃO CORRIGIDA

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. 3456
FMVZ

Sousa, Rafael Teixeira de
Estudo do mecanismo molecular da progesterona e do estradiol no desenvolvimento do endométrio de novilhas Nelore pré-púberes. / Rafael Teixeira de Sousa. -- 2017.
128 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

.

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva.

1. Fisiologia da reprodução 2. Expressão gênica. 3 Puberdade. 4. Tecido endometrial. I. Título.

Parecer da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do mecanismo molecular da progesterona e do estradiol no desenvolvimento do endométrio de novilhas nelore pré-púberes", protocolado sob o nº 3028/2013, utilizando 35 (trinta e cindo) úteros de bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, 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 15/5/2013.

We certify that the Research "Study of molecular mechanism of progesterone and estradiol in the development endometrium heifers Nelore pre pubertal", protocol number 3028/2013, utilizing 35 (thirty five) uterus bovine, under the responsibility Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, 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 5/15/2013.

São Paulo, 20 de maio de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUSA, Rafael Teixeira

Título: **Estudo do mecanismo molecular da progesterona e do estradiol no desenvolvimento do endométrio de novilhas Nelore pré-púberes**

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

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

À minha família e em especial aos meus pais Regina Cláudia e Luciano Barroso, aos meus irmãos Victor Yuri e Renata Aline, aos meus avós maternos Maria do Vale e Raimundo Nonato e minha avó paterna Francisca Barroso (in memoriam), que sempre me apoiaram e me deram forças, creditando em mim confiança.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pela benção de chegar até aqui e por manter em mim um desejo cada vez maior de não parar, como também por ter me dado a chance de encontrar pessoas sensacionais ao longo dessa caminhada em Pirassununga.

Aos meus pais e irmãos por todo o apoio, carinho e compressão, e por me fazerem acreditar em meus sonhos.

À Universidade de São Paulo, através do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor Luís Felipe Prada e Silva, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pela orientação e prontidão em ajudar na conclusão deste trabalho. Muito obrigado pela oportunidade Professor!!!

À Dra. Lígia Garcia Mesquita, por toda amizade paciência e dedicação que teve e tem comigo. Além das valiosas dicas científicas e profissionais, repassadas desde o primeiro ano de doutorado. Você é demais!

À Dra. Juliane Diniz Magalhães, pela amizade, troca de ideias, pela confiança, e por conduzir a parte in vivo desse estudo e ter cedido prontamente as amostras de endométrio para a etapa in vitro.

Ao Professor Mario Binelli, pela amizade, prontidão e por todas ajudas possíveis e imagináveis para a realização e conclusão dessa pesquisa.

À Angela Maria Gonella-Diaza e Mariana Sponchiado, pela amizade, ajuda com os primers e extrações de RNA total.

À Dra. Moana Rodrigues França pela amizade e profissionalismo durante a dissecação dos endométrios utilizados nesse estudo.

Ao Professor Ed Hoffmann Madureira pelas valorosas contribuições com este trabalho.

Ao Professor João Negrão e a Sandra Oliveira pela ajuda com as análises hormonais.

Aos amigos Tiago Del Valle, Rejane dos Santos Sousa e Viviane Borba Ferrari pelas valorosas contribuições na presente tese.

Aos demais membros do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte; Matheus Orlandin Frasseto, Marina Vieira de Carvalho, Andrea, Julia Marques, Edimarco Pansani, Joao Francisco Penso, Renan Augusto Pinheiro Maciel, Senhor Paulo, Senhor Schimdt, Dannylo de Oliveira e Cassiele de Oliveira, pela amizade e crescimento profissional proporcionado durante esses anos.

Aos irmãos; Vicente Buarque, Juliana Santos, Elmeson Ferreira, Alexandre Guizelini Silva e Marjorye Kaori Kametani, por fazerem da república Colmeia um lugar tão harmonioso e fraternal.

Aos meus amigos, Leonardo Barreira, Nara Consolo, Brenda Barcelos, Maíra Bianchi Rodrigues Alves, Melina Yasuoka, Bruna Gomes, Vanessa Storillo, Gabriela Gravina, Eduardo Cuelar Orlandi Cassiano, Julio Dadalt, Rodrigo Gardinal, Laís Rizotto, Gisele Dela Ricci, Thiago W. de Almeida, Priscila Silva Thiago Santin, Milena Oliveira, Caio Takiya, Gabriela Facholi Bomfim, Ricardo Galbiatti Nogueira, Gustavo Amorim, Maria Fernanda Burbarelli, Juliana Bombardelli, Carlos Junior, Carlos Granghelli, Marcella Tavares, Mari Cardoso, Wecksley Souza, Fernanda Ferreira, Wekisley Crispim, Juliana Silva, Vinícius Nogueira, Carolina Braghini, Vinicius Ramos, Danilo França, Sandra Lore Blandón Navarro, Daniel López A, Adrielle Ferrinho, Tarley Araujo Barros, Renata Lançoni, Renata Khodair, Samuel Oliveira, Vitor Hugo, Gabriela Alves Reis, João Padilha Gandara Mendes, Lenise Mueller, Natalia Minami, Flavio Perna Junior, Tamie Guibu, Geraldo Nunes, Bruna Aravéchia Furuta, Bruna Leonel Gonçalves, Gustavo Ferreira de Almeida, Milton Maturana Filho, Gustavo Gameiro, Priscila Silva, Henrique Hooper, Camylla Pedrosa, Leonardo Batissaco e Rodolfo Mingoti, por tornarem essa estadia em Pirassununga inesquecível.

Aos componentes da banca de defesa de doutorado.

E por fim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista,

Meu muito obrigado!!!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRATÉGIAS HORMONAIS E AVALIAÇÕES EXPERIMENTAIS. 40
FIGURA 2 -CONCUSSÃO MEDULAR, DISSECAÇÃO DO ÚTERO, COLHEITA E ARMAZENAMENTO DOS TECIDOS ENDOMETRIAIS 44
FIGURA 3 - RNA TOTAL EM GEL DESNATURANTE DE AGAROSE-FORMALDEÍDO 1,2%, ISOLADO DO TECIDO ENDOMETRIAL DA REGIÃO MÉDIA DO CORNO UTERINO DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 46
FIGURA 4 - EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 58
FIGURA 5 - EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE O DIÂMETRO DO FOLÍCULO DOMINANTE DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 58
FIGURA 6 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DA ISOFORMA α DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO (*ESR1*), NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 59
FIGURA 7 - EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DA ISOFORMA β DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO (*ESR2*), NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 60
FIGURA 8 - EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DE ESTRÓGENO ACOPLADO A PROTEÍNA G (*GPER*), NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 60
FIGURA 9 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *EGFR*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 61
FIGURA 10 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO *PGR1*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 62
FIGURA 11 - EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO *PGR2*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 63
FIGURA 12 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *PGR3*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 63

FIGURA 13 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE PGRMC1, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 64
FIGURA 14 – EFEITO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *PGRMC1*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 65
FIGURA 15 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *PGRMC2*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 65
FIGURA 16 EFEITO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *PGRMC2*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 66
FIGURA 17 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (*VEGFA*), EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 67
FIGURA 18 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE FGF2, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 67
FIGURA 19 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *FGFR2*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 68
FIGURA 20 EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP9*, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 69
FIGURA 21 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE AQP4, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 69
FIGURA 22 – EFEITO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *AQP4*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 70
FIGURA 23 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *MUC1*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 71
FIGURA 24– EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *WNT5A*, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 71
FIGURA 25- EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *LPL*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 72

FIGURA 26 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *SLC2A1*, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 73
FIGURA 27 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *SLC2A1*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 73
FIGURA 28 - EFEITO DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *SERPINA14*, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 74
FIGURA 29 - EFEITO DO CORNO UTERINO SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *SERPINA14*, EM NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO DO CORNO UTERINO 75
FIGURA 30 – EFEITO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *OXTR*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 75
FIGURA 31 - EFEITO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *IGF2R*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 76
FIGURA 32 - EFEITO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *LTF*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 76
FIGURA 33 - EFEITO DO DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA DE *MMP2*, NOS DIFERENTES CORNOS UTERINOS DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 77

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO, FILIAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS NOVILHAS ABATIDAS AO FINAL DAS ESTRATÉGIAS HORMONAIS 42
TABELA 2 -SEQUÊNCIAS DE PRIMERS DOS GENES ALVOS E NORMALIZADORES ANALISADOS POR QRT-PCR 51
TABELA 3 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE O DESEMPENHO PRODUTIVO E RENDIMENTO DE CARCAÇA DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES. 57
TABELA 4 – EFEITO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (AFTV) E DO IMPLANTE DE LIBERAÇÃO LENTA DE PROGESTERONA (DIB) SOBRE O PESO DO ÚTERO (PU) DE NOVILHAS NELORE PRÉ-PÚBERES 57

RESUMO

SOUSA, R. T. **Estudo do mecanismo molecular da progesterona e do estradiol no desenvolvimento do endométrio de novilhas Nelore pré-púberes** [Study of the molecular mechanism of progesterone and estradiol in the development of endometrial pre – pubertal Nellore heifers]. 2017 128f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A elucidação dos eventos fisiológicos, pelos quais os esteroides ovarianos atuam no desenvolvimento endometrial de novilhas pré-púberes, é fundamental para o emprego de ferramentas de manejo reprodutivo que reduzam a idade ao primeiro parto e aumentem a taxa de desfrute do rebanho Nelore. Objetivou-se com este estudo averiguar os efeitos de implante de liberação sustentada de progesterona (DIB) e da manipulação do crescimento folicular, através de aspiração folicular transvaginal (AFTV), sobre mecanismos moleculares de genes modulados pela progesterona (P4) e pelo estradiol (E2) no endométrio de novilhas Nelore pré-púberes. 60 novilhas com 13,9 $\pm$ 2,9 meses, peso de 273,6 $\pm$ 5,6 kg, escore de condição corporal 5,9 $\pm$ 0,7, em uma escala de 0 a 9, sem sinais de ovulação, foram aleatoriamente e equitativamente distribuídas em quatro estratégias hormonais: 1) AFTV1 sem DIB®: submetidas a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia um dia antes do abate (AFTV1), sem o emprego de DIB; 2) AFTV4 sem DIB: também sem DIB e submetidas a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia quatro dias antes do abate (AFTV4); 3) AFTV1 com DIB® submetidas a uso de dispositivo intravaginal de liberação sustentada de progesterona (DIB®, MSD Saúde Animal Brasil), usado previamente por duas vezes em vacas *Bos indicus* e AFTV1; Grupo 4; com DIB® e AFTV4. Ao final do experimento, 35 animais, que não apresentaram presença de corpo lúteo, foram abatidos e tiveram seus úteros dissecados no lado ipso e contralateral, levando-se em consideração o maior diâmetro de folículo um dia antes do abate. Para a extração do ácido ribonucleico (RNA) total foram selecionados tecidos intercarunculares, obtidos das porções do terço médio do corno uterino direito e esquerdo, de seis animais de cada tratamento, totalizando 48 amostras de RNA total. Após a extração do RNA total e síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), a abundância dos transcritos foi avaliada empregando PCR em tempo real. Para estudar a regulação endometrial dos receptores de esteroides, foi mensurada a expressão relativa do: receptor de estrógenos alpha (*ESR1*) e beta (*ESR2*), receptor de progesterona isoformas A (*PGR1*), B (*PGR2*) e C (*PGR3*), receptor componente de membrana

1 (*PGRMC1*) e 2 (*PGRMC2*). Assim como de genes envolvidos em vias de resposta a P4 e ao E2: *AQP4* (transporte de água), *EGFR*, *FGF2*, *FGF2R*, *VEGFA*, *WNT5A* (proliferação celular), *OXTR*, *LPL*, *LTF*, *SERPINA14*, *SLC2A1* (atividade secretória), *MMP2*, *MMP9* (remodelamento de matriz extracelular) e *MUC1* (adesão celular). O *GAPDH* foi utilizado como gene constitutivo para correção dos resultados de expressão gênica. Os dados foram submetidos a análise de variância, utilizando o PROC MIXED do SAS 9.3. Houve interação entre os efeitos de corno uterino, DIB e AFTV sobre a expressão relativa de *ESR1* (P = 0,05); *EGFR* (P = 0,05); *PGR1* (P = 0,02); *FGF2* (P = 0,01); *FGFR2* (P = 0,10) e *LPL* (P = 0,04). Também foi verificado interação AFTV x corno uterino sobre a expressão relativa de PGR3 (P = 0,07); *PGRMC1* e 2 (P = 0,02; P = 0,01), respectivamente; *AQP4* (P = 0,09); *MUC1* (P = 0,03); *SLC2A1* (P = 0,09). Ocorreu interação DIB x corno uterino sobre a expressão relativa de *PGRMC1* e 2 (P = 0,05; P = 0,03), respectivamente; *AQP4* (P = 0,09) e *OXTR* (P = 0,08). E interação AFTV x DIB sobre a expressão de *VEGFA* (P = 0,09); *MMP9* (P = 0,09); *WNT5A* (P = 0,01); *SLC2A1* (P = 0,01). Enquanto que a expressão relativa da *SERPINA14* foi influenciada pelo DIB (P = 0,02) e localização do corno uterino (P = 0,05). Estes resultados confirmam a complexa modulação dos receptores de esteroides ovarianos pela presença de DIB® e dia da AFTV, na alteração da ação biológica de genes alvos, no tecido endometrial de novilhas Nelore pré-púberes. Baixos diâmetros foliculares próximo ao abate, aumentaram a expressão relativa de *MUC1* no corno contralateral, sugerindo uma menor receptividade neste. Ademais, o aumento do peso uterino em função da inclusão do DIB, possivelmente seja uma consequência da maior abundância de transcritos de *SERPINA14* e *AQP4*, mediados principalmente pelo *PGRMC1* e *PGRMC2*.

Palavras-chave: Fisiologia da reprodução. Expressão gênica. Puberdade, Tecido endometrial

ABSTRACT

SOUSA, R. T. Study of the molecular mechanism of progesterone and estradiol in the development of endometrial pre–pubertal Nellore heifers [Estudo do mecanismo molecular da progesterona e do estradiol no desenvolvimento do endométrio de novilhas Nelore pré-púberes] 2017. 128f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The elucidation of the physiological events by which ovarian steroids act on endometrial development of pre-pubertal Nellore heifers, is critical for the for the use of reproductive management tools that reduce the age of first calving and increase the slaughter rate of the Nellore herd. The objective of this study was to investigate the effects of progesterone sustained release implant (DIB) and manipulation of follicular growth, through transvaginal follicular aspiration (TFA), on molecular mechanisms of genes modulated by progesterone (P4) and estradiol (E2) in the molecular mechanisms involved in the endometrial development of pre-pubertal Nellore heifers. Sixty heifers with 13.9 ± 2.9 months of age, weight of 273.6 ± 5.6 kg, body condition score 5.9 ± 0.7, on a scale from 0 to 9, without signs of ovulation, were randomly and evenly distributed into four hormonal strategies: 1) TFA1 without DIB®: submitted to transvaginal follicular aspiration guided by ultrasonography one day before slaughter (TFA1), without the use of DIB; 2) TFA4 without DIB®: also without DIB and submitted to transvaginal follicular aspiration guided by ultrasound four days before slaughter (TFA4); 3) TFA1 with DIB®: Submitted to the use of intravaginal progesterone sustained release device (DIB®, MSD Animal Health Brazil), previously used twice in *Bos indicus* cows and TFA1; Group 4; with DIB® and TFA4. At the end of the experiment, 35 animals, which did not present a corpus luteum, were slaughtered and had their uterus dissected on the ipso and contralateral sides, taking into account the largest follicle diameter one day before slaughter. For the extraction of total ribonucleic acid (RNA), intercaruncular tissues were obtained from the middle third of the right and left uterine horns of six animals from each treatment, totaling 48 samples of total RNA. After extraction of total RNA and complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) synthesis, abundance of the transcripts was assessed using real-time PCR. To study the endometrial regulation of steroid receptors, the relative expression of: alpha (*ESR1*) and beta (*ESR2*) estrogen receptor, progesterone receptor isoforms A (*PGR1*), B (*PGR2*) and C (*PGR3*), membrane component receptor 1 (*PGRMC1*) and 2 (*PGRMC2*). As well as genes involved in P4 and E2 response pathways: AQP4 (water

transport), *EGFR*, *FGF2*, *FGF2R*, *VEGFA*, *WNT5A* (cell proliferation), *OXTR*, *LPL*, *LTF*, *SERPINA14*, *SLC2A1* (secretory activity), *MMP2*, *MMP9* (extracellular matrix remodeling) and *MUC1* (cell adhesion). *GAPDH* was used as a constitutive gene for the correction of gene expression results. The data were submitted to analysis of variance, using PROC MIXED of SAS 9.3. There was interaction between the effects of uterine horn, DIB and TFA on the relative expression of *ESR1* (P = 0.05); *EGFR* (P = 0.05); *PGR1* (P = 0.02); *FGF2* (P = 0.01); *FGFR2* (P = 0.10) and *LPL* (P = 0.04). It was also verified the TFA x uterine interaction on the relative expression of *PGR3* (P = 0.07); *PGRMC1* and *2* (P = 0.02, P = 0.01, respectively); *AQP4* (P = 0.09); *MUC1* (P = 0.03); *SLC2A1* (P = 0.09). DIB x uterine interaction occurred on the relative expression of *PGRMC1* and *2* (P = 0.05; P = 0.03, respectively); AQP4 (P = 0.09) and *OXTR* (P = 0.08). And TFA x DIB interaction on *VEGFA* expression (P = 0.09); *MMP9* (P = 0.09); *WNT5A* (P = 0.01); *SLC2A1* (P = 0.01). While the relative expression of *SERPINA14* was influenced by DIB (P = 0.02) and location of the uterine horn (P = 0.05). These results confirm the complex modulation of ovarian steroid receptors by the presence of DIB® and TFA day in the alteration of the biological action of target genes in the endometrial tissue of prepubertal Nellore heifers. Low follicular diameters close to slaughter, increased the relative expression of *MUC1* in the contralateral horn, suggesting a lower receptivity. In addition, increased uterine weight as a function of the DIB® inclusion is possibly a consequence of the greater abundance of *SERPINA14* and *AQP4* transcripts, mainly mediated by *PGRMC1* and *PGRMC2.*

Keywords: Physiology of reproduction. Gene expression. Puberty. Endometrial tissue

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17

2. REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1 IDADE AO PRIMEIRO PARTO 20

2.2 NEUROENDOCRINOLOGIA DA PUBERDADE 21

2.3 RELAÇÃO ENTRE PESO VIVO, NUTRIÇÃO E PUBERDADE 23

2.4 HORMONIOTERAPIA E PUBERDADE 26

2.5 RELAÇÃO ENTRE FATORES MORFOLÓGICOS DO TRATO REPRODUTIVO E A PUBERDADE 28

2.6 ANATOMIA E HISTOLOGIA DO ENDOMÉTRIO BOVINO 30

2.7 ESTRUTURA E FUNÇÃO MOLECULAR DOS RECEPTORES DE PROGESTERONA E ESTRADIOL NA RECEPTIVIDADE DO ENDOMÉTRIO 31

3. MATERIAL E MÉTODOS 39

3.1 INSTALAÇÕES, ANIMAIS, AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS E ESTRATÉGIAS HORMONAIS 39

3.2 COLHEITA DE SANGUE E ANÁLISES HORMONAIS 43

3.3 COLHEITA E PROCESSAMENTO DO ENDOMÉTRIO E RENDIMENTO DE CARCAÇA 43

3.4 EXTRAÇÃO E AVALIAÇÃO DO ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA) TOTAL E SÍNTESE DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO COMPLEMENTAR (CDNA) 44

3.5 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (QRT-PCR) 50

3.6 SEQUENCIAMENTO DE PRODUTOS DE QRT-PCR 54

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 54

4. RESULTADOS 57

5. DISCUSSÃO 78

6. CONCLUSÕES 95

7. REFERÊNCIAS 96

1. INTRODUÇÃO

A raça Nelore ocupa lugar de destaque entre as raças zebuínas *Bos taurus indicus* utilizadas nos sistemas de produção de carne do Brasil, principalmente pela adaptação ao clima tropical. Entretanto, animais deste grupo genético, costumam ser sexualmente mais tardios que os de raças taurinas *Bos taurus taurus*, mesmo quando criados em condições semelhantes (RODRIGUES et al., 2002).

O atraso na vida reprodutiva das matrizes tem como consequências o aumento do rebanho não produtivo na propriedade, redução na taxa de desfrute e eficiência de produção de bezerros, diminuindo o lucro da atividade e atrasando o processo de seleção genética (RESTLE et al., 1999). A melhoria no desempenho reprodutivo, através da redução na idade ao primeiro parto (IPP) das fêmeas exerceria impacto significativo sobre os indicadores produtivos do rebanho.

Sabendo-se da estrita relação entre os índices reprodutivos e produtivos do rebanho zebuíno nacional, fazem-se necessários estudos básicos que permitam conhecimento mais profundo e conciso da fisiologia envolvida na puberdade e na maturidade sexual de novilhas Nelore e sua relação com estágios reprodutivos posteriores a exemplo da gestação e parto.

Em bovinos, o desenvolvimento do sistema reprodutivo pós-natal é marcado primeiramente por um aumento no crescimento de todo o trato reprodutivo entre 3 e 4 meses de idade, seguido por um período de platô, ou crescimento lento, e por uma fase de crescimento acelerado próxima a primeira ovulação. Estas diferenças no crescimento e desenvolvimento são consequências da variação na concentração de gonadotrofinas que aceleram a proliferação folicular e a produção de estradiol determinando a diferença na velocidade de crescimento dos órgãos reprodutivos em diferentes períodos (HONARAMOOZ et al., 2004).

Durante os estágios finais da maturação sexual em novilhas, a progesterona e o estradiol induzem mudanças significativas no endométrio capacitando as fêmeas à reprodução, por promover um ambiente uterino mais adequado ao desenvolvimento do embrião (BERGFELD et al., 1994).

O endométrio bovino é caracterizado por ser um tecido altamente sensível aos hormônios esteroides ovarianos, por conter receptores para a progesterona e estradiol (WATHES; HAMON, 1993; BOOS et al., 1996). Em fêmeas bovinas cíclicas o número desses receptores é modulado de acordo com a concentração circulante destes hormônios ao longo do ciclo estral (ROBINSON et al., 2001; MARTIN et al., 2008).

As ações do estradiol no endométrio, são moduladas principalmente através das duas formas da proteína receptora, uma denominada de receptor de estradiol α (ERα) e outra de β (ER β), que são expressas por diferentes genes (ENMARK et al., 1997) e do receptor de estrógeno acoplado *à* proteína G (GPER) (LEVIN, 2011; CHENG et al., 2011; SANDEN et al., 2011). Enquanto que as modulações genômicas da progesterona ocorre por meio de três isoformas de proteínas específicas e intercelulares do receptor de progesterona (PGR); receptor de progesterona A (PGR1, 86kDa), B (PGR2, 100kDa) e C (PGR3, 76kDa) (MOTE et al., 2006; GRAHAM; CLARKE, 1997; WEI et al., 1990; WEI et al., 1996; CONDON et al., 2003).

Além das vias de modulação clássica, a progesterona pode desencadear seus efeitos biológicos por meio de seus receptores acoplado a proteína G, sendo referenciados como receptores de progesterona componentes de membrana 1 (PGRMC1) e 2 (PGRMC2), esses receptores são responsáveis pelos efeitos rápidos da progesterona em diferentes células do endométrio, (LÖSEL et al., 2008; GELLERSEN; FERNANDES; BROSENS, 2009). Em fêmeas cíclicas, após a ligação da progesterona e do estradiol aos seus receptores no endométrio, ocorre um padrão específico de transcrição gênica nas células do lúmen, das glândulas e estroma endometrial (SPENCER; BAZER, 1995; STEWART et al., 2000; ULBRICH et al., 2009).

Apesar da existência de literatura sobre o efeito da progesterona e do estradiol, na modulação das vias gênicas relacionadas, com o desenvolvimento uterino de fêmeas bovinas cíclicas (WATHES; HAMON, 1993; BOOS et al, 1996; ROBINSON et al.,2001; MARTIN et al., 2008), os estudos sobre ação dos hormônios esteroides sobre o endométrio de novilhas pré-púberes, são escassos. Este contexto evidencia a necessidade do entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento endometrial e na modulação dos receptores de estradiol e de progesterona, no endométrio de novilhas Nelore pré-púberes. A elucidação dos eventos fisiológicos que atuam no desenvolvimento endometrial de novilhas pré-púberes será de grande importância para o desenvolvimento de estratégias reprodutivas, que propiciem um ambiente uterino mais adequado.

Visando o preenchimento das lacunas de conhecimento dos mecanismos moleculares ligados a maturidade sexual em fêmeas Nelore, o Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte-LPCG, onde o presente estudo foi conduzido, desenvolveu um modelo experimental executado por DINIZ-MAGALHÃES (2015), visando entender os mecanismos moleculares da progesterona e do estradiol em diferentes áreas do hipotálamo em novilhas Nelore pré-púberes. As estratégias hormonais aqui avaliadas modulou a expressão gênica hipotalâmica.

Contudo além do hipotálamo, supõe-se que o útero, especificamente o endométrio também tenha o seu padrão de expressão gênica modificado, pelas diferentes concentrações dos hormônios sexuais. O estudo apresentado nesta tese possui ampla relevância no entendimento das vias de sinalização gênica dentro do contexto fisiológico do endométrio de novilhas Nelore pré-púberes.

Formulou-se, portanto, a hipótese geral que ambientes hormonais distintos modulam diferentemente a expressão de RNAm, no endométrio de novilhas Nelore pré-púberes.

Os objetivos específicos deste trabalho foram comparar, em diferentes estratégias hormonais de indução de puberdade, a influência da inserção do dispositivo de liberação lenta de progesterona, associada com a aspiração folicular transvaginal realizada em diferentes dias em relação ao abate, no: (1) peso do útero (2) abundância dos transcritos dos receptores de progesterona e estradiol, (3) abundância de transcritos de genes alvos da progesterona e estradiol, que regulam a função endometrial, visando melhor entendimento da modulação molecular da progesterona e do estradiol sobre o desenvolvimento do endométrio uterino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura serão abordados temas relacionados à idade ao primeiro parto de novilhas, fisiologia da puberdade, características anatômicas e histológicas do útero, assim como a regulação do ambiente uterino pela progesterona e estradiol.

2.1 Idade ao primeiro parto

A idade ao primeiro parto (IPP) é um dos aspectos que refletem diretamente na determinação da eficiência reprodutiva dos rebanhos, tendo grande influência no número de bezerros produzidos durante toda a vida produtiva da futura vaca (BAGLEY, 1993; ENDECOTT et al., 2013; SHORT et al., 1990; STYGAR; KRISTENSEN; MAKULSA, 2014; MACHADO et al., 2001). E partindo desse pressuposto, a inclusão de novilhas em idades mais jovens a reprodução, pode reduzir as categorias improdutivas na propriedade (ZERVOUDAKIS et al., 2002).

Resultados encontrados para a raça Nelore têm demostrado altos coeficientes de herdabilidade (h^2) que variam de 0,57 (ELER et al., 2002), a 0,73 (SILVA et al., 2003) para prenhez aos 14 meses; 0,52 para prenhez aos 16 meses (DIAS, 2004). Esse alto coeficiente de herdabilidade para início da prenhez aos 14 meses de idade sugere uma falha na seleção para esta característica nessa raça (ELER et al., 2002). Em uma pesquisa realizada por Lúcia et al. (2002) para acompanhar a dinâmica folicular de novilhas da raça Nelore, do oitavo ao décimo sexto mês de idade, foi observado que a taxa de crescimento folicular (mm/dia), permaneceu constante, entretanto o folículo dominante apresentou maior diâmetro final com o decorrer da idade. Eles observaram ainda que 32% das novilhas tornaram-se gestantes aos 15 meses de idade (consideradas precoces), e o diâmetro folicular foi maior dos 12 aos 14 meses de idade.

Em países com pecuária mais produtiva, o manejo seletivo visa à entrada das novilhas em estação de monta aos 15 meses, resultando em IPP de 24 meses e produtividade máxima (WOLFE et al., 1990; PATTERSON et al., 1992). Teixeira (1997) reportou que a antecipação do primeiro parto em novilhas Nelore aumentou em 45% a receita bruta da atividade. Colocar novilhas em reprodução em idades tardias em torno de dois ou três anos de idade, por exemplo, leva a necessidade de manter um rebanho 24 e 48%, respectivamente, maior que rebanhos com novilhas cobertas com 15 meses (FRANCO, 2005). Novilhas que atingem a puberdade em idades mais precoces, permitindo as mesmas parir um bezerro aos 24 meses de

idade, possuem maiores chances de apresentarem um maior desempenho durante a sua vida produtiva (FUNSTON et al., 2012; LESMEISTER; BURFENING; BLACKWELL, 1973). Ao se reduzir o custo com a exclusão de um ano de recria aumenta-se 0,5 a 0,8 bezerros por vaca durante a sua vida produtiva (ELER et al., 2010).

2.2 Neuroendocrinologia da puberdade

A puberdade é considerada um importante indicador econômico na pecuária de corte. Dentro da fisiologia reprodutiva de fêmeas, a puberdade pode ser definida como a aquisição da capacidade reprodutiva, que é marcada por alterações na concentração de gonadotrofinas e pelo aumento dos hormônios esteroides sexuais circulantes, envolvendo um complexo processo fisiológico e molecular (LEE, 1995; HONARAMOOZ et al., 1999).

O período correspondente aos 40-60 dias prévios a primeira ovulação é designado como pré-puberdade (DAY; NOGUEIRA, 2013). Esta fase envolve a transição de um período de inatividade ovarina para outro, no qual ocorre o estágio final da maturação do eixo hipotalâmico-hipófise-gonadal, onde as ovulações ocorrem regularmente (MORAN et al., 1989). Contudo a puberdade não deve ser interpretada como um evento isolado, mais sim como uma etapa final de uma série de alterações fisiológicas e morfológicas que culminam com o primeiro estro e ovulação (WILTBANK et al., 1969), acompanhado de desenvolvimento de um corpo lúteo funcional (KINDER et al.,1987).

Enquanto a puberdade pode ser denominada como um marco, a maturidade sexual é um fenômeno que se segue à puberdade, completando-se após três ou quatro ciclos estrais (GOTTSCHALL, 2011). E devido a isto, o acasalamento logo após o primeiro estro seguido de ovulação não é aconselhado, já que a fertilidade nesse período tem sido reportada como baixa principalmente pela ocorrência de um ciclo estral curto associado a uma luteólise prematura do corpo lúteo entre o 8º e 12º dias (YAVAS; WALTON, 2000) resultando em uma concentração sérica de progesterona menor que 1,0 ng/ml no dia 9 do ciclo (SÁ FILHO et al., 2007), o que impede a manutenção da prenhez, já que o período crítico para o reconhecimento materno da prenhez ocorre do 15º ao 19º dias (GIASSETTI et al., 2008).

Outro ponto importante, está relacionado com a maturação final do trato reprodutivo da futura matriz, resultante da exposição aos esteroides ovarianos, dos ciclos estrais posteriores a obtenção da puberdade (SÁ FILHO et al., 2007).

Diferentes mecanismos evitam que o sistema endócrino reprodutivo da bezerra seja ativado antes do tempo adequado, permitindo a continuidade do crescimento e

desenvolvimento do animal. Existem basicamente dois padrões de supressão da atividade gonadal pós-natal que assume maior ou menor importância nas diferentes espécies estudadas. Em primatas e equinos, por exemplo, a supressão da atividade gonadal é de origem central, ou seja, independente das gônadas, a secreção de gonadotrofinas é suprimida, por inibição direta do Sistema Nervoso Central (SNC), em consequência do aumento da atividade neurotransmissora gabaérgica, sobre a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (TERASAWA; FERNANDEZ, 2001; NOGUEIRA; GINTHER, 2000). Já em camundongos e na espécie bovina a inibição da atividade reprodutiva acontece por uma sensibilidade excessiva do hipotálamo ao estradiol, ocorrendo uma exacerbação da retroalimentação negativa deste hormônio sobre o hipotálamo (RAMIREZ; MCCANN, 1963; DAY et al., 1987).

Em bezerras, a pequena quantidade de estradiol secretada pelos folículos ovarianos após o nascimento é suficiente para desencadear uma supressão na secreção pulsátil do hormônio luteinizante (LH) (RODRIGUEZ; WISE, 1991). Dentre os hormônios envolvidos com a fisiologia da puberdade o LH é considerado o fator endócrino primário para que a novilha se torne púbere. E isso só é possível a partir da redução do *feedback* negativo exercido pelo estradiol (DAY et al., 1987; COUSE; KORACH, 1999; DAY et al., 2010), o que é observado na fase pré-púbere. A secreção pulsátil de LH é estabelecida nas bezerras por volta de 1 a 2 meses de idade (ANDERSON et al., 1996) e aumenta por volta do 3º e 5º meses de idade (SCHAMS et al., 1981). Subsequentemente, a secreção de LH diminui (SCHAMS et al., 1981) e mantem-se relativamente baixa (fase estática) até um novo aumento da secreção de LH (fase pré-púbere) culminando em puberdade (DAY et al., 2010).

Como já relatado, uma das causas do aumento na frequência de pulsos de LH na fase pré-púbere é consequência da menor sensibilidade do hipotálamo a retroalimentação negativa exercida pelo estradiol (HONARAMOOZ, 1999) e esse aumento resulta em crescimento dos folículos antrais e aumento da produção de estradiol, seguido por um aumento transitório da secreção de LH (Day et al., 1987; Day et al., 2010).

Em novilhas, a concentração plasmática de estradiol permanece relativamente baixa até um mês antes da puberdade, quando aumenta gradualmente até o momento da primeira ovulação (NAKADA et al., 2000). Já a concentração sérica de FSH permanece relativamente estável no período que antecede a primeira ovulação (EVANS et al., 1994).

No período pré-puberal os pulsos de LH ocorrem em uma frequência de um a quatro a cada 24 horas, contra uma frequência de um pulso por hora de animais cíclicos. Durante as três semanas que precedem a puberdade, as concentrações séricas de progesterona poucas

vezes ultrapassam o valor de 0,5ng/ml. A transição para o desencadeamento da puberdade é caracterizada por um aumento nas frequências dos pulsos de LH, seguido de ovulação e aumento significativo da concentração sanguínea de progesterona. Estes aumentos de progesterona precedidos por pulsos de LH tem origem na luteinização de folículos ovarianos (DAY; ANDERSON, 1998). O primeiro pico de LH pré-ovulatório ocorre somente após o aumento da progesterona necessária para a sensibilização dos centros nervosos e desencadeamento de comportamento de estro (ANDERSON et al., 1996). O pico de LH induzido pelo estradiol produzido pelos folículos em crescimento reprograma a função das células da granulosa provocando luteinização, ruptura da parede do folículo e liberação do oócito (HILIER, 2001).

Além das mudanças observadas no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal durante o período que antecede a maturidade sexual, os órgãos sexuais também passam por alterações morfofisiológicas, propiciando condições adequadas para o estabelecimento da prenhez, dentre as alterações fenotípicas relatadas, estão: o aumento no peso do útero, cérvix e vagina, onde as novilhas pré-púberes geralmente apresentam diâmetro do útero inferior em relação as novilhas púberes (DESJARDINS; HAFS, 1969; HONARAMOOZ et al., 2004).

2.3 Relação entre peso vivo, nutrição e puberdade

Os mecanismos da atuação dos fatores nutricionais sobre o desencadeamento da puberdade são multifatoriais, podendo ocorrer várias interações entre a disponibilidade dos nutrientes, com o genótipo, peso, escore de condição corporal, idade e composição corporal dos animais (COLLIER et al., 2006; PETROVIC et al., 2012; ROBINSON et al., 2006). O conhecimento do peso vivo e composição corporal das novilhas a puberdade é fundamental para a definição do sistema de criação das mesmas, uma vez que determinam o ganho de peso necessário durante a fase pré-púbere. E apesar da importância do peso vivo e composição corporal à puberdade, existe uma escassez de literatura referente os efeitos dessas características na raça Nelore (SILVA et al., 2009).

Em uma metanálise de dados brasileiros realizada por Silva et al., (2009) onde foram utilizados dados de novilhas Nelore criadas em condições brasileiras, foi verificado que as novilhas dessa raça atingiram a puberdade com 312 kg de peso vivo (PV) e 22 meses de idade, enquanto que novilhas cruzadas atingiram a puberdade com 289 kg e 14 meses de idade. Foi reportado também uma tendência de aumento no PV à puberdade das novilhas, Nelore ou cruzadas com Nelore, com maior ganho de peso na fase pré-puberdade (P=0,07).

Novilhas com baixo ganho de peso (média de 481 g/d) atingiram a puberdade com 296 kg de PV, enquanto que as novilhas com maior ganho de peso (média de 688 g/d) atingiram a puberdade com 311 kg de PV.

Novilhas *Bos taurus taurus* alimentadas com alta inclusão de concentrado obtiveram uma taxa média de 84% de puberdade precoce aos 262 dias de idade. Enquanto que o tratamento controle dessa série de quatro estudos (GASSER et al. 2006a; 2006b; 2006c, 2006 d), obteve uma taxa de 19% de puberdade aos 348 dias de idade. Esses achados além de evidenciarem o efeito da nutrição na obtenção da puberdade, também nos permite verificar a disparidade no âmbito genético entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, no quesito puberdade, já que em *Bos taurus indicus* admite-se puberdade precoce aos 420 dias ou seja aos 14 meses (NOGUEIRA, 2004).

Embora os dados de literatura tenham dado pouca ênfase, o ganho de peso logo após o desmame tem se demonstrado como um relevante fator no desencadeamento da puberdade em novilhas, onde maiores ganhos de peso nessa fase resultam em menores idades à puberdade (WILTBANK et al., 1966). O fornecimento de dietas com alta densidade energética após o desmame aos 73 ± 3 dias de idade, ativou precocemente o eixo reprodutivo de bezerras cruzadas Aberdeen Angus x Simental, resultando em puberdade antes dos 300 dias de idade (GASSER et al., 2006).

Inúmeras teorias foram desenvolvidas na tentativa de explicar como o status nutricional influencia o desencadeamento da puberdade. Em 1974, Frisch; McArthur propuseram, então, a hipótese de que uma quantidade mínima de gordura corporal seria necessária para a ocorrência normal da menarca em adolescentes e da menstruação normal nas mulheres. Entretanto a teoria da “porcentagem mínima de gordura’’, ainda é controversa (SILVA et al., 2014). Estudos realizados com ratos (BRONSON, 1987) e com novilhas (BROOKS et al., 1985) demostraram que a puberdade não está relacionada com uma porcentagem constante de gordura corporal. Desta forma é improvável que o tecido adiposo, por si só, seja o elo entre o status nutricional e secreção de LH (SILVA et al., 2014). O mais provável é que numerosos mecanismos estejam envolvidos e que alterações metabólicas decorrentes das flutuações nutricionais, com consequente alteração na gordura corporal, regulem a liberação pulsátil de LH.

Os mecanismos pelos quais os estímulos nutricionais e sinais metabólicos afetam o sistema nervoso central e modulam a frequência da liberação dos pulsos de LH pela hipófise anterior têm sido extensivamente estudados. E a relação entre a nutrição e o LH pode ocorrer através de sinais sanguíneos específicos, como metabólitos e hormônios metabólicos

(STEINER et al., 1983), dentre eles pode-se citar o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-1), a insulina, o hormônio do crescimento (GH), a glicose, a leptina e o neuropeptídio Y. As concentrações do IGF-1 produzido pelo fígado e pelas células da granulosa possuem uma alta correlação com as suas concentrações intrafoliculares (WEBB et al., 2003; 2004). O aumento deste metabólito no período peripuberal tem a capacidade de acelerar a puberdade, por promover uma elevação nas concentrações intrafoliculares de estradiol (JONES et al., 1991; YELICH et al., 1996).

Além da conhecida ação do IGF-1 a nível de células foliculares, foi demostrado em um estudo realizado com ratos por Hiney et al (1996) que o IGF-1 também acelera a puberdade via sistema nervoso central (eminência média), promovendo o aumento da liberação de GnRH que por sua vez estimula o aumento da frequência dos pulsos de LH. Segundo os autores, a ação do IGF-1 não é diretamente sobre os neurônios produtores de GnRH, mais sim sobre as células da glia, que por sua vez, estimulam liberação de GnRH de forma indireta.

A glicose também tem a sua importância como mediador dos efeitos nutricionais no início e na manutenção da reprodução em diversas espécies, inclusive na secreção de LH. Ovelhas submetidas à indução de hipoglicemia mediante a administração de insulina apresentaram um atraso na onda de LH, porém quando receberam uma infusão de glicose associada à insulina, os níveis glicêmicos e a secreção de LH foram normalizados (MEDINA et al., 1998).

Outro metabólito reportado em diversos estudos associado com a puberdade e maturidade sexual de novilhas é a leptina (PROLO et al., 1998), cuja a produção é regulada por alterações induzidas pela insulina e pelos glicocorticoides nos adipócitos, e suas concentrações se correlacionam com a quantidade de reserva corporal (COSTA; DUARTE, 2006). A concentração de leptina sérica é um reflexo direto da quantidade de tecido adiposo (reserva energética) e do consumo alimentar, sendo que a subnutrição determina o bloqueio do eixo reprodutivo (SILVA et al., 2014). A ação da leptina sobre a reprodução pode ocorrer de duas maneiras: uma direta, quando age sobre as gônadas promovendo o aumento na produção de esteroides sexuais, o que foi evidenciado pelo aumento no tamanho uterino, em razão da maior proliferação glandular no epitélio e endométrio uterino; e de forma indireta, por meio da sua ação sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, cuja função é informativa sobre o estado nutricional, permitindo que os mecanismos reprodutivos sigam em frente quando houver reservas energéticas suficientes para reprodução, caso contrário, este fenômeno é temporariamente bloqueado (BARASH et al., 1996).

Vaiciunas et al. (2008) demostraram que novilhas que entram em puberdade mais cedo, apresentam maior expressão de leptina pelos tecidos adiposos e subcutâneo e omental quando comparadas as novilhas não púberes. Além da maior expressão de leptina no tecido adiposo esses pesquisadores reportaram uma menor expressão de genes hipotalâmicos que codificam receptores do neuropeptídeo-Y.

2.4 Hormonioterapia e puberdade

A hormonioterapia quando bem aplicada, pode melhorar substancialmente a eficiência reprodutiva de novilhas. Atualmente existe uma infinidade de protocolos utilizados na obtenção de diferentes respostas dentro da fisiologia reprodutiva de fêmeas. No que tange a indução de puberdade em novilhas, a administração de progesterona ou progestágenos em associação ou não a outros hormônios tem sido bastante utilizada (LAMB et al., 2006; TAUCK et al., 2007). DINIZ-MAGALHÃES, (2015) utilizando o tecido hipotalâmico das novilhas Nelore pré-púberes, avaliadas nessa tese, reportou a modulação de genes relacionados a puberdade em função do implante de liberação sustentada de progesterona e da aspiração folicular transvaginal em áreas específicas do hipotálamo.

A habilidade dos progestagenos na indução da puberdade está relacionada primariamente à maturidade do sistema neuroendócrino e a via de regulação da secreção de LH. Esse mecanismo se dá através da redução da expressão dos receptores hipotalâmicos de estradiol e do *feedback* negativo exercido pelo o mesmo nos neurônios secretores de GnRH (DAY; ANDERSON, 1998). Desse modo, a gradativa redução da sensibilidade do hipotálamo aos efeitos inibitórios do estradiol, propicia um aumento na frequência de liberação dos pulsos de LH (MARSON et al., 2004). Essa redução da sensibilidade ao estradiol, ocorre através da diminuição na concentração de seus receptores citoplasmáticos na porção anterior do hipotálamo, no hipotálamo médiobasal e na hipófise anterior (DAY et al., 1987; KINDER et al., 1987; KINDER et al., 1995). Todavia essas mudanças não foram detectadas na área pré-optica e eminência média do hipotálamo (KINDER et al., 1987), o que sugere que essas duas áreas hipotalâmicas estejam envolvidas com o controle da cascata de eventos que ocorram durante o ciclo estral no período pós-puberdade (EMERICK et al., 2009).

A presença de estradiol modula genes relacionados ao controle metabólico do hipotálamo anterior, afetando direta ou indiretamente os neurônios GnRH. Contudo, a eficácia da hormonioterapia é dependente de outros fatores como o manejo nutricional, genótipo, idade e peso da novilha no momento da aplicação dos fármacos (AZEREDO et al., 1997).

Outro viés importante na indução de puberdade por progesterona está relacionado ao efeito dose e tempo de exposição ao hormônio, principalmente no caso de novilhas zebuínas, já que esses animais apresentam uma menor taxa metabólica quando comparados a animais taurinos, assim o emprego de altas doses de progesterona nessas novilhas pode levar a uma diminuição da pulsatilidade de LH, comprometendo o crescimento folicular, a ovulação (BARUSELLI, 2007; PRADO et al., 2009), o estro e o pico pré-ovulatório de LH (RAWLINGS et al., 2003).

Vale ressaltar que os dispositivos de progesterona utilizados na indução de puberdade devem ser previamente utilizados em vacas adultas, já que altas doses desse hormônio podem bloquear o crescimento dos folículos, comprometendo a ovulação. Nesse sentido, Sá Filho et al. (2015) dosaram a concentração circulante de P4 em novilhas Nelore pré-púberes submetidas ao avaliando a eficácia de CIDRs novos CIDR1 ou usados CIDR4 previamente utilizado por 3 vezes durante 8 dias (24 dias de uso) implantados intravaginalmente por 10 dias, verificaram que ambos os dispositivos foram capazes de sustentar o nível de P4 acima de 1,0 ng/ml por no mínimo 7 dias, mas o grupo que recebeu os dispositivos novos obteve maior concentração plasmática de P4.

Outro viés importante para o sucesso reprodutivo em fêmeas *Bos taurus indicus* jovens é a taxa de crescimento folicular, nessa categoria animal os folículos atingem capacidade ovulatória com no mínimo 7,0 mm de diâmetro (GIMENES et al., 2008), todavia a responsividade ao pico de LH aumenta significativamente quando o diâmetro folicular ultrapassa os 8,5 mm (SÁ FILHO et al., 2008).

Anderson et al (1996), verificaram que a aplicação de implante de progesterona durante nove dias foi suficiente para desencadear a puberdade em 81% das novilhas. Este fato foi associado ao aumento subsequente na liberação de LH em decorrência da aplicação de progesterona (BERARDINELLI et al., 1979; ANDERSON et al., 1996), promovendo um maior desenvolvimento folicular, que consequentemente, aumentou a produção de estradiol, proporcionando um maior desenvolvimento uterino confirmado pelo aumento do seu peso.

Durante o período de aplicação da progesterona foi reportado que ocorreu inibição da liberação de LH de forma semelhante ao que ocorre no ciclo estral de fêmeas maduras, evidenciando que, os mecanismos relacionados a essa inibição já estão presentes em novilhas pré-púberes (ANDERSON et al., 1996).

Pfeifer et al. (2009) avaliaram o efeito do programa curto de sincronização com CIDR por 5 dias, com ou sem prostaglandina 2α (PGF2α;500 mg de cloprostenol, i.m.) em novilhas *Bos taurus taurus*, na retirada dos CIDRs, foi observado que os animais pertencentes ao grupo

CIDR + PGF2α apresentaram uma maior taxa de ovulação (72,7%) em comparação aos animais tratados apenas com CIDR (30,8%) e com o grupo controle (7,1%). Associado a esses resultados nenhuma das novilhas tratadas com CIDR apresentaram ciclo curto após a ovulação. Claro Júnior et al. (2010) avaliando a eficácia de CIDRs novos CIDR1 ou usados CIDR4 previamente utilizado por 3 vezes durante 9 dias (27 dias de uso) implantados intravaginalmente por 12 dias, para induzir a puberdade em 589 novilhas Nelore. Foi verificado aos 7 dias após a retirada do implante, as novilhas tratadas com CIDR, sejam eles novos ou usados, apresentaram maior incidência de estro (42,6% para o CIDR1 e 39,3% para o CIDR4) em relação a taxa de 19,5% do grupo controle. Enquanto que a taxa de prenhez aos 90 dias (final da estação de monta) foi maior no CIDR1 (83,5%) e CIDR4 (83,7%), que o grupo sem CIDR (72,6%). Estes resultados demonstraram que a utilização do CIDR, previamente utilizado ou não, foi eficaz para acelerar a puberdade e maiores taxas de prenhez.

Rodrigues et al. (2014), conduziram um experimento com o intuito de avaliar a eficácia de um protocolo de indução de puberdade em novilhas Nelore, constituído de CIDR previamente utilizado por 3 vezes durante 9 dias (27 dias de uso) implantados intravaginalmente por 12 dias, seguido de um protocolo de indução de estro com permanência do CIDR a previamente utilizado implantados durante 9 dias, em três períodos após o protocolo de indução (10, 12 e 14 dias após). Observaram uma menor taxa de concepção (P=0.04) no grupo 10 dias (38,2%), quando comparadas aos grupos 12 e 14 (50,4% e 45,6%, respectivamente).

2.5 Relação entre fatores morfológicos do trato reprodutivo e a puberdade

Nos últimos anos, alguns estudos têm sido realizados, com o intuito de desenvolver técnicas e procedimento que favoreçam a entrada precoce de novilhas na reprodução. Dentre eles, os relacionados à organização morfológica dos tecidos do sistema reprodutor, e sua relação com as funções orgânicas, metabolismo e comportamento sexual da novilha tem merecido atenção especial.

Os tecidos crescem e se desenvolvem cronologicamente em ondas de crescimento específicos e esses mesmos preceitos são aplicados para a maturidade. A onda de crescimento tecidual é iniciada com o tecido nervoso, seguido pelo tecido muscular e tecido adiposo. O desenvolvimento tecidual precoce, médio ou tardio varia de acordo com o tecido estudado e sua localização no corpo do animal (OWENS et al., 1993).

Como já mencionado, durante o período pós-natal, mecanismos endócrinos garantem que a bezerra não ative o sistema reprodutivo até que possua um desenvolvimento somático compatível com a reprodução, próximo de 65-70% do peso adulto. Ao atingir essa faixa de peso, ocorre uma sinalização do metabolismo energético do animal, que informa que o gasto energético com o crescimento e desenvolvimento estão diminuindo, tornando permissiva a utilização energia pelos mecanismos relacionados à reprodução (SEMMELMANN et al., 2001). Paulatinamente, ocorre uma substituição da ação dos hormônios de crescimento pelos sexuais (SILVEIRA et al., 2011). E ao atingir a puberdade, o trato reprodutivo da novilha, passa por uma série de modificações no âmbito morfológico e fisiológico que irão permitir o estabelecimento de uma futura gestação e lactação. Também foi reportado que o tamanho e peso do útero, cérvix e vagina aumentam rapidamente após a puberdade (DESJARDINS; HALFS, 1969).

Sá Filho et al. (2008) relacionaram o desenvolvimento uterino de novilhas Nelore com a puberdade, e reportaram que este efeito sobre o desenvolvimento do trato reprodutivo foi decorrente da estimulação exercida pelo aumento das concentrações de estradiol e progesterona durante o período pós-púbere. O escore do trato reprodutivo tem sido uma das metodologias aplicadas na avaliação do estágio de desenvolvimento do trato reprodutivo de novilhas a campo, auxiliando na seleção de fêmeas destinadas a reprodução, e na projeção do desempenho das mesmas em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (ANDERSEN et al., 1991).

Esse sistema utiliza uma escala de 1 a 5, permitindo estimar a maturidade sexual com base na avaliação das estruturas ovarianas e desenvolvimento uterino, a nota um é dada a animais que apresentam trato reprodutivo infantil, caracterizado pela ausência de tônus uterino, ovários pequenos e sem estruturas palpáveis. Já as novilhas com escore de trato reprodutivo dois apresentam um maior diâmetro dos cornos uterinos e estruturas ovarianas em relação aos animais com a nota um. Novilhas com escore três estão bastante próximas de entrarem em puberdade, por apresentarem um bom tônus e desenvolvimento uterino e folículos ovarianos palpáveis. Animais com escore quatro apesar de não apresentarem tecido luteal facilmente perceptível, possuem indicativo de ciclicidade, que pode ser verificada pela observação do diâmetro uterino. Novilhas com escore do trato reprodutivo cinco apresentam características semelhantes aos animais com escore quatro, porém evidenciam a presença de um corpo lúteo (ANDERSEN et al., 1991). As novilhas com escore um são consideradas impúberes, com escore dois e três pré-púberes, e com o escore quatro e cinco púberes (PATTERSON, et al., 1999). Em um estudo realizado por Holm et al. (2008), foi reportado

uma taxa de prenhez de 31, 40, 53, 70 e 80%, respectivamente para escores de trato reprodutivo 1, 2, 3, 4 e 5. Como visto nesse tópico, coletivamente supõe se os efeitos da progesterona e do estradiol no desenvolvimento do trato reprodutivo bovino, entretanto a fisiologia básica envolvida nessas diferentes taxas de desenvolvimento em novilhas Nelore pré-púberes, por esses hormônios ainda é desconhecida.

2.6 Anatomia e histologia do endométrio bovino

O útero bovino é constituído por dois cornos uterinos, um corpo e um cérvix, sendo classificado como do tipo bipartido (*uterus bipartidus*), por apresentar um septo que separa os dois cornos uterinos (HAFEZ; JAINUDEEN, 2000). Em vacas adultas esse órgão situa-se quase que completamente na cavidade abdominal, apresentando um corpo de 3 a 4 cm de comprimento. E cornos extensos que possuem um comprimento médio de aproximadamente 35 a 40 cm, afunilando-se gradativamente no sentido da extremidade livre (SISSON, 1986). Enquanto que em novilhas Nelore, o comprimento médio dos cornos uterinos é de 14,72 cm (MONTEIRO et al., 2001). Já o cérvix na vaca se apresenta de forma transversa com saliências fixas conhecidas como anéis anulares (HAFEZ; HAFEZ, 2000), tendo 10 cm de comprimento, apresentando uma parede densa que pode chegar a três cm de espessura no animal adulto.

A parede uterina é dividida em três distintas regiões: a serosa ou perimétrio, a muscular ou miométrio e por fim a mucosa ou endométrio. Sendo esta última região constituída por duas zonas que diferem em estrutura e função (PRIEDKALNS; LEISER, 1998). O endométrio de ruminantes apresenta projeções não glandulares, denominadas carúnculas uterinas, essas estruturas apresentam criptas carunculares em sua superfície, que fornecem ao conjunto um aspecto de “favo-de-colméia” (sítio de interdigitação com os vilos coriônicos), formando a zona de contato entre a mãe e o feto. As carúnculas são ricas em fibroblastos e possuem um extenso suprimento sanguíneo, sem, no entanto, possuírem glândulas uterinas. Entre as carúnculas uterinas existe uma região pregueada, denominada intercaruncular (SHARMA et al., 1983). Excetuando-se as carúnculas, glândulas uterinas tubulares, simples, enoveladas e ramificadas estão presentes em todo o endométrio (PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

A camada mais superficial do endométrio também denominada de zona funcional ou estrato compacto é responsável pela proliferação, secreção e degeneração tecidual, sendo composta por diferentes compartimentos celulares: o epitélio luminal e glandular, estroma e

compartimento vascular. O epitélio é composto por células situadas na superfície ou ao redor das glândulas. O epitélio superficial é pseudo-estratificado e/ou colunar simples, podendo apresentar-se em algumas áreas, como cúbico simples (DELLMANN; BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS; LEISER, 1998). As células colunares epitelias possuem em seus bordos inúmeras microvilosidades, que variam em altura de acordo com a atividade secretora do epitélio, apresentando-se mais longas na fase lútea em relação à fase folicular (STINSON et al., 1962).

Enquanto que o tecido sub-epitelial ou estroma é constituído de tecido conjuntivo frouxo, possui uma alta vascularização é rico em fibrócitos. A camada mais profunda, zona basal ou estrato esponjoso, possui capacidade regenerativa (DIEDRICH et al., 2007). Sendo este constituído também por tecido conjuntivo frouxo, só que menos celularizado. Em ruminantes, durante a fase mais estrogênica do ciclo estral, uma grande quantidade de fluido deposita-se nos espaços teciduais do endométrio, dando origem ao edema endometrial (PRIEDKALNS; LEISER, 1998).

Em vacas cíclicas, o útero passa por uma complexa reorganização para atender as necessidades relacionadas a sobrevivência e desenvolvimento do concepto. Entre elas estão a síntese e secreção glandular de histotrofo, composto por citocinas, fatores de crescimento, proteínas e inúmeros outros elementos que estão associados a nutrição. E a comunicação concepto maternal, que ocorre através de trocas de moléculas de sinalização e fatores de crescimento (SPENCER et al., 2004; HUGENTOBLER et al., 2008).

A transcrição gênica nas diferentes células do endométrio é modulada primariamente pelo estradiol (E2) e progesterona (P4), resultando em alterações cíclicas essenciais ao sucesso gestacional (FORDE et al., 2011). Onde a transcrição de genes relacionados a receptividade uterina é aumentada ou diminuída de acordo com a variação das concentrações circulantes dos hormônios esteroides, sendo a progesterona (P4) a principal responsável pela preparação do endométrio para implantação embrionária e manutenção da prenhez (BAZER et al., 2008).

2.7 Estrutura e função molecular dos receptores de progesterona e estradiol na receptividade do endométrio

O endométrio receptivo é caracterizado pela transcrição gênica relacionada a resposta do endométrio ao embrião, permitindo o reconhecimento, implantação e desenvolvimento deste (SHARKEY; SMITH, 2003). O entendimento das alterações moleculares ligados a

receptividade endometrial em novilhas Nelore pré-púberes, pode ajudar no melhor entendimento da fisiologia da receptividade endometrial e posterior sucesso gestacional em animais dessa categoria, possibilitando a inclusão de animais jovens, com maiores chances de prenhez a primeira estação de monta.

É importante mais uma vez salientar, que o arcabouço molecular, relacionado a receptividade uterina, está sob a constante influência das concentrações plasmáticas de progesterona (P4) e estradiol (E2). Estes hormônios atingem as células alvo do endométrio via circulação sanguínea, ligados a proteínas carreadoras, e devido à natureza lipofílica, atravessam a membrana por difusão simples. Ao chegarem ao interior das células alvo, liga-se a receptores localizados em sua maioria no núcleo celular (BEATO; KLUG, 2000). Ao serem sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos, as proteínas constituintes dos receptores migram para o núcleo, mediante a sinalização de localização nuclear, situado próximo ao domínio de ligação ao DNA. E devido à existência deste sinal de localização nuclear, a maioria dos receptores nucleares já se encontram no próprio núcleo, mesmo na ausência de ligação hormônio-específica (YUDT; CIDLOWSI, 2001). Os receptores de esteroides reconhecem de forma geral, os elementos responsivos hormonais (HREs) (RIBEIRO et al, 1995).

Todos os membros desta família possuem a mesma organização modular, com um domínio N-terminal, um domínio central de interação com o DNA (DBD), um domínio curto de conexão (hinge ou dobradiça) e por fim o domínio de ligação ao ligante (LBD), que está responsável pelo reconhecimento e interação com o ligante (NEBERT et al., 1987; PONGLIKITMONGKOL et al., 1988; LOOSFELT et al., 1986).

O domínio N-terminal dos diferentes receptores nucleares varia bastante em tamanho e possuem sua sequência aminoacídica pouco conservada (McEWAN, 2004). É reportado ainda que cada domínio N-terminal dos receptores nucleares de hormônios esteroides contém uma região de ativação autônoma, denominada AF-1 (McEWAN, 2004). O domínio central, comumente denominado de DBD ou domínio central de interação com o DNA é curto, e possui sua sequência de aminoácidos bastante conservada, quando comparado aos demais membros da família dos receptores nucleares (GELMANN, 2002). A funcionalidade desse domínio ocorre graças a sua estrutura na forma de dois dedos de zinco, que são capazes de reconhecer sequencias específicas de DNA, os HERs (LAUDET; GRONEMEYER, 2002). Estas sequências estão localizadas em regiões reguladoras dos genes alvos de esteroides sexuais e fornecem ao receptor uma região para ligação possibilitando atividade de transativação. Os HERS são formados por duas sequencias de hexanucleotídeos orientados

como palíndromos espaçados por três nucleotídeos (MAGOFFIN, 2002; LI; O'MALLEY, 2003).

Como mencionado anteriormente, o domínio de ligação ao DNA é altamente conservado sendo composto por dois dedos de zinco e uma extensão do domínio de ligação ao ligante (LBD). Cada dedo de zinco é composto por quatro resíduos de cisteína, que são responsáveis pela quelação do íon de zinco, sendo este último fundamental para garantir a estabilidade deste tipo de domínio. Além dos resíduos de cisteína, os dedos de zinco possuem outros resíduos de alanina, arginina, aspartato, glicina, histidina, isoleucina e lisina. A (hélice 1) do primeiro dedo de zinco contém um grupo de resíduos de aminoácidos, no denominado P BOX, que são responsáveis pela especificidade de reconhecimento da sequência de hexanucleotídeos, dos elementos responsivos ao hormônio. Já os resíduos de aminoácidos do segundo dedo de zinco (hélice 2) no denominado D BOX, auxiliam na estabilidade da ligação da proteína ao DNA. A modificação das estruturas do domínio de ligação ao DNA, ocorre através do rearranjo das hélices 1 e 2 que formam o núcleo de ligação do domínio a fita de DNA, permitindo a identificação do sítio de ligação aos HERs (ARANDA; PASCUAL, 2001).

O próximo domínio conhecido como dobradiça ou *hinge* serve primariamente para conectar o domínio DBD ao LBD **(**LAUDET; GRONEMEYER, 2002), postula-se ainda que o mesmo tenha a função de reduzir qualquer impedimento estérico entre esses domínios, permitindo assim uma infinidade de posicionamentos entre eles e diferentes ações do receptor nuclear (LAUDET; GRONEMEYER, 2002). Este domínio também abriga um sinal de localização nuclear que influencia a compartimentação celular do receptor (FU et al., 2000; FU et al., 2003; McEWAN, 2004). Já o domínio LBD é uma região altamente estruturada e multifuncional, e sua função primária é ligar o receptor ao ligante (hormônio), proporcionando a atividade de transcrição ligante dependente (LAUDET; GRONEMEYER, 2002). Essa região também abriga uma forte interface de dimerização do receptor e sítios de interação com proteínas de choque térmico e sinais de localização nuclear (LAUDET; GRONEMEYER, 2002). Por ser um receptor nuclear, esse domínio apresenta uma baixa conservação na sua sequência primária de aminoácidos, porém estudos de cristalografia indicam um arranjo estrutural altamente conservado **(**MATIAS et al., 2000; SACK et al., 2001; LAUDET; GRONEMEYER, 2002).

Esses estudos também reportaram que esse domínio possui um enovelamento "sanduíche'' composto por 12 hélices, identificadas de H1 a H12, e no centro desse enovelamento encontra-se a cavidade do ligante, que, em conjunto com as hélices, H5, H6,

H9 e H10, formam uma espécie de cavidade central do sanduíche. Já as hélices H1, H2, H3, e H4 formam uma face externa do enovelamento, enquanto que, na outra face, as hélices H7, H8, H11 e H12 complementam a estrutura (WAGNER et al., 1995). Essa cavidade é constituída por um grande número de resíduos hidrofóbicos que agem na orientação dos ligantes (LAUDET; GRONEMEYER, 2002). Esse domínio é idêntico nos receptores A e B de progesterona e demostram uma alta afinidade de ligação com este hormônio (LAUDET; GRONEMEYER, 2002). Já os receptores α e β de estradiol exibem menos que 60% de homologia, entretanto possuem uma afinidade similar com o estradiol (LAUDET; GRONEMEYER, 2002).

Na ausência do ligante os receptores de hormônios esteroides ficam associados a um complexo de proteína de choque térmico (HSPs). Ao ocorrer à ligação do ligante o receptor, o mesmo é desvinculado das HSPs. Após a ligação, muitos tipos de receptores de esteroides dimerizam, ou seja, duas subunidades de receptores ligam-se entre si para formar uma unidade funcional de ligação ao DNA, que se dirigem ao núcleo para ligar-se aos HERs. Após ligar-se aos HERs o complexo hormônio-receptor, passa a interagir com proteínas que estão ligadas diretamente ao DNA, como por exemplo, o complexo AP-1 (composto pelo dímero c-fos e c-jun). E a partir de então se torna capaz de recrutar proteínas co ativadoras que relaxam a cromatina na região promotora.

O fator de transcrição TATA binding protein (TBP) se liga especificamente a uma sequência do DNA denominada de caixa TATA e juntamente com outros fatores iniciadores de transcrição (TAFs), vão fazer parte do complexo de pré iniciação da RNA polimerase II, ajudando no posicionamento da mesma sobre o sítio de início de transcrição do gene alvo, dando início a modulação da síntese de RNA mensageiro e consequentemente de proteínas, responsáveis pelos efeitos finais dos hormônios esteroides (KATZENELLENBOGEN et al., 2000).

No que diz respeito ao estradiol, suas ações são mediadas principalmente através das duas formas da proteína receptora, uma denominada de receptor de estradiol α (ESR1) e outra de β (ESR2), que são expressas por diferentes genes (ENMARK et al., 1997). Essas duas isoformas foram clonadas e caracterizadas em várias espécies (GREEN et al., 1986; KRUST et al., 1986; MOORE et al., 1998), e podem ter diferentes ações na expressão gênica (PAECH et al., 1997). O isoforma ESR2, tem a capacidade de modular o ESR1, efetuando um efeito anti-proliferativo no endométrio. Entretanto a ausência do ESR2 no útero de camundongos causou a diminuição da fertilidade (WEIHUA et al., 2000). O ESR1 está presente no trato

reprodutivo feminino de roedores do desenvolvimento neonatal a vida adulta (GRECO et al., 1993).

Em fêmeas adultas de camundongos, foi reportado que os transcritos de receptores α de estradiol, estão altamente expressos em células epiteliais uterinas momentos antes da ovulação (KURITA et al., 2000), diminuindo durante a prenhez, sendo que no estroma uterino essa expressão comportou-se de forma continua (TAN et al., 1999). Em contraste a isso, foi verificada uma baixa expressão para o ESR2 no útero de fêmeas de camundongos prenhe ou não (COUSE et al., 1997; KURITA et al., 2001).

No útero neonatal de ovinos, os níveis de RNAm, e expressão proteica do ESR1, estão elevadas nas estruturas relacionadas ao desenvolvimento glandular endometrial, e são detectadas em baixos níveis nas células epiteliais, do estroma e do endotélio vascular, estando ausentes no miométrio (TAYLOR et al., 2000; SPENCER; BAZER., 2002). Em ovelhas adultas foi detectada uma expressão para o ESR1, em todos os tipos de células uterinas, e essa expressão aumentou concomitantemente com a elevação do estradiol no plasma durante o ciclo estral **(**SPENCER; BAZER, 1995, SPENCER; BAZER, 2002). Foi observado também que com a ascensão das concentrações de progesterona e com o declínio de estradiol, a expressão dos transcritos para essa isoforma começam a declinar até meados do dia 15 do ciclo (SPENCER; BAZER, 2002, SPENCER; BAZER, 1995). Alguns estudos têm demonstrado mecanismos de ações rápidas de estrógenos de cunho não genético, associados a proliferação em diferentes células do endométrio mediadas pelo receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER), diferentes dos mecanismos moleculares dos já consolidados do ESR1 e ESR2 (FILARDO et al., 2000; PIETRAS; SZEGO, 1975). E isso tem aumentado a especulação sobre o papel do receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER) nestes processos (LEVIN, 2011; CHENG et al., 2011; SANDEN et al., 2011) Estudos realizados em câncer de mama humano, sugerem que a esfingosina quinase e a integrina $\alpha_5\beta_1$ (QUINN et al., 2009), são intermediários na transativação do GPER mediada pelo E2, sugerindo ainda o importante papel do GPER na montagem da fibronectina, que é uma proteína importante na aderência celular (QUINN et al., 2009).

Em vacas cíclicas a progesterona (P4) é o principal hormônio regulador das funções endometriais nas fases mais precoces da prenhez, antes mesmo do período de reconhecimento materno, através da regulação de uma série de genes (BAZER et al., 1979; HUMBLOT, 2001; SPENCER et al., 2004; SPENCER et al., 2007). Maiores concentrações de progesterona (P4) entre os dias 2 e 5 do ciclo estral intensificam o tamanho e desenvolvimento do concepto em vacas de corte (GARRET et al., 1988), entretanto vacas com menores concentrações de

progesterona (P4) na fase luteínica inicial apresentam um desenvolvimento embrionário comprometido (NEPHEW et al., 1991; MANN; LAMMING, 2001).

Dentro deste contexto, a suplementação exógena de progesterona (P4), melhora a receptividade uterina e o sucesso gestacional, de vacas submetidas a transferência de embrião, sendo também grandes os relatos entre os níveis de progesterona e vacas submetidas a inseminação artificial (HENRICKS et al., 1971; LAMMING; DARWASH, 1998). Em ovelhas foi demonstrado que o tratamento precoce com progesterona (P4) exógena, aumenta o crescimento do blastocisto entre os dias 9 e 12 acompanhado por alterações na expressão de genes envolvidos com a via de sinalização intracelular WNT no endométrio (SATTERFIELD et al., 2008). Ovelhas suplementadas ou não com progesterona (P4) apresentaram vias metabólicas diferencialmente reguladas no dia 9 e 12 de gestação, sendo as vias de maior importância as relacionadas à atividade de transporte de solutos e fatores de proliferação, migração e adesão celular (SATTERFIELD et al., 2009).

A progesterona exerce suas funções genômicas principalmente por meio de três isoformas de proteínas específicas e intercelulares do receptor de progesterona (PGR); receptor de progesterona A (PGR1, 86kDa), B (PGR2, 100kDa) e C (PGR3, 76kDa) sendo está última mais restrita à fração citosólica, não possuindo capacidade ligar-se ao DNA, entretanto tem a capacidade de complexar-se com a progesterona ou com a PGR2, diminuindo os efeitos proliferativos desse hormônio (CONDON et al., 2006; MOTE et al., 2006; WEI et al., 1997; WEI et al., 1990), ambas isoformas são expressas por um único gene, entretanto são reguladas por promotores distintos (LESSEY; ALEXANDER; HORWITZ, 1983).

Estruturalmente a PGR1 é constituído por dois fatores de ativação, com um domínio para se ligar a progesterona, situado na extremidade e junto ao fator de ativação 2 e um domínio ligado ao DNA, localizado entre o fator 1 e 2. Enquanto que a PGR2, possui a mesma estrutura, mas com um fator de ligação adicional, denominado de fator 3, situado mais perifericamente, somando-se a isso a PGR2 possui uma maior quantidade de aminoácidos localizado no terminal amino, em relação a PGR1, podendo variar de 128 a 165, dependendo da espécie (GIANGRANDE; MCDONNELL, 1999; O' MALLEY; CONNEELY, 1992; LESSEY; ALEXANDER; HORWITZ, 1983; KASTER et al., 1990; GRONEMEYER, 1991; DEMARZO et al., 1991; HORWITZ, 1992; KRAUS et al., 1993; HORWITZ, 1992). É importante ressaltar, que essas isoformas possuem ações biológicas distintas frente a progesterona, estudos realizados em diversos tipos celulares, demonstraram diferentes propriedades de transativação para cada tipo celular (TORA et al., 1988; MEYER et al., 1992; GIANGRANDE; MCDONNELL, 1999; VEGETO al., 1993).

No endométrio, ambas as isoformas são expressas, entretanto os efeitos antiproliferativos da progesterona são mediados através da PGR1 e PGR3. A ativação da PGR2 na presença de menores concentrações de PGR1 leva um aumento na proliferação do epitélio endometrial, sendo que maiores concentrações de PGR1 ou PGR3 reduzem as taxas proliferativas da progesterona sobre o epitélio endometrial (CONDON et al., 2003). Adicionalmente o *PGR3* pode inibir a função do PGR sequestrando a progesterona disponível tanto na fração citosólica quanto a complexada com a PGR2, além disso a PGR3 tem a capacidade de ligar-se a PGR2, reduzindo assim a capacidade desta isoforma ligar-se aos elementos de resposta (CONDON et al., 2003). E devido a existência de diferenças funcionais específicas das isoformas nas células alvo, as ações da progesterona sobre estas podem ser grandemente afetadas pelas alterações nas relações de expressão *PGR1*: *PGR2*: *PGR3* (GRAHAM; CLARKE, 1997; WEI et al., 1990; WEI et al., 1996; CONDON et al., 2003).

Além das ações da progesterona mediadas pelos receptores anteriormente citados, há relatos dos efeitos biológicos da progesterona intermediados por receptores de progesterona acoplado a proteína G, sendo referenciados como receptores de progesterona componentes de membrana 1 (PGRMC1) e 2 (PGRMC2), esses receptores são responsáveis pelos efeitos rápidos da progesterona em diferentes células do endométrio, (LOSEL et al., 2008; GELLERSEN; FERNANDES; BROSENS, 2009), e estão presentes nas membranas de diferentes organelas, possuindo um domínio transmembrana simples de ligação a proteína quinase (PELUSO et al., 2010; PELUSO; LODDE; LIU et al., 2012). A expressão de RNA mensageiro para esses receptores componentes de membrana de progesterona, foram identificadas em diferentes regiões do trato reprodutivo de vacas Nelore cíclicas (LUCIANO et al., 2011; SPONCHIADO, 2015; GONELLA-DIAZA et al., 2016).

As flutuações nas concentrações hormonais em função das fases do ciclo estral e início de prenhez em diversas espécies de ruminantes domésticos, acarretam mudanças morfológicas e funcionais no endométrio, associadas a distribuição dos receptores de esteroides sexuais, desencadeando as mais variadas respostas nas diferentes células (SPENCER; BAZER, 1995; KIMMINS; MACLAREN, 2001). A fase proliferativa do endométrio ocorre antes da ovulação, sob influência do estrógeno, que tem suas concentrações aumentadas pelo folículo dominante em crescimento, com rápida proliferação das células do estroma e do epitélio endometrial, nessa fase existe uma grande abundancia dos receptores ESR1 e das isoformas de PGR no endométrio bovino (ROBINSON et al., 2001). Na fase secretória que ocorre logo após a ovulação, o estrógeno continua desempenhando funções proliferativas, enquanto ocorre o aumento nas concentrações de progesterona pelo corpo lúteo em formação.

No útero de camundongos, a expressão dos transcritos para os receptores de progesterona é baixa no primeiro e segundo dia de gestação, apresentando-se um pouco mais alta no epitélio e estroma subepitelial (TAN et al., 1999), começando a aumentar entre o terceiro e quarto dia de prenhes até a implantação (TAN et al., 1999).

A ovarectomia de fêmeas de camundongos levou a um aumento na expressão nos receptores de progesterona no epitélio luminal uterino, e quando tratadas com estradiol exógeno, houve redução dessa expressão, indicando o potencial do estradiol em reprimir essa expressão nesse compartimento (TIBBETTS et al., 1998; KURITA et al., 2001).

Em vacas e ovelhas adultas, a expressões dos receptores de progesterona é maior nas fases proliferativas precoces, em todos os tipos de células uterinas, sendo mais abundante no estroma e no miométrio. E esses níveis começam a diminuir inicialmente, nas células do estroma e do epitélio à medida que a atividade secretora progride (SPENCER; BAZER, 2002; SPENCER; BAZER, 1995; KIMMINS; MACLAREN, 2001).

Em estudos realizados por Meikle et al. (2001) em cordeiras da raça Corriedale de dois meses, com o objetivo de avaliar os efeitos do estradiol e da progesterona na distribuição de seus receptores e no desenvolvimento do trato reprodutivo, foi relatado que os animais submetidos ao tratamento com estradiol tiveram concentrações deste hormônio no soro semelhante a fase folicular de ovelhas. Foi observado também um aumento no peso do aparelho reprodutor como um todo, inclusive útero. As cordeiras tratadas com progesterona e com concentrações semelhantes à fase luteal de animais adultos tiveram aumento de peso apenas do útero. Foi relatado ainda a existência de receptores funcionais no útero das cordeiras, indicando que seu funcionamento depende mais do ambiente hormonal, que da fase cronológica.

Altas doses séricas de progesterona reduzem a expressão de seus receptores no epitélio luminal, tanto em animais ciclando quanto em início de prenhez, interferindo negativamente na modulação da influenciada pela progesterona em vários genes no endométrio, diretamente relacionados à receptividade uterina (CARTER et al., 2008; OKUMU et al., 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações, animais, avaliações ultrassonográficas e estratégias hormonais

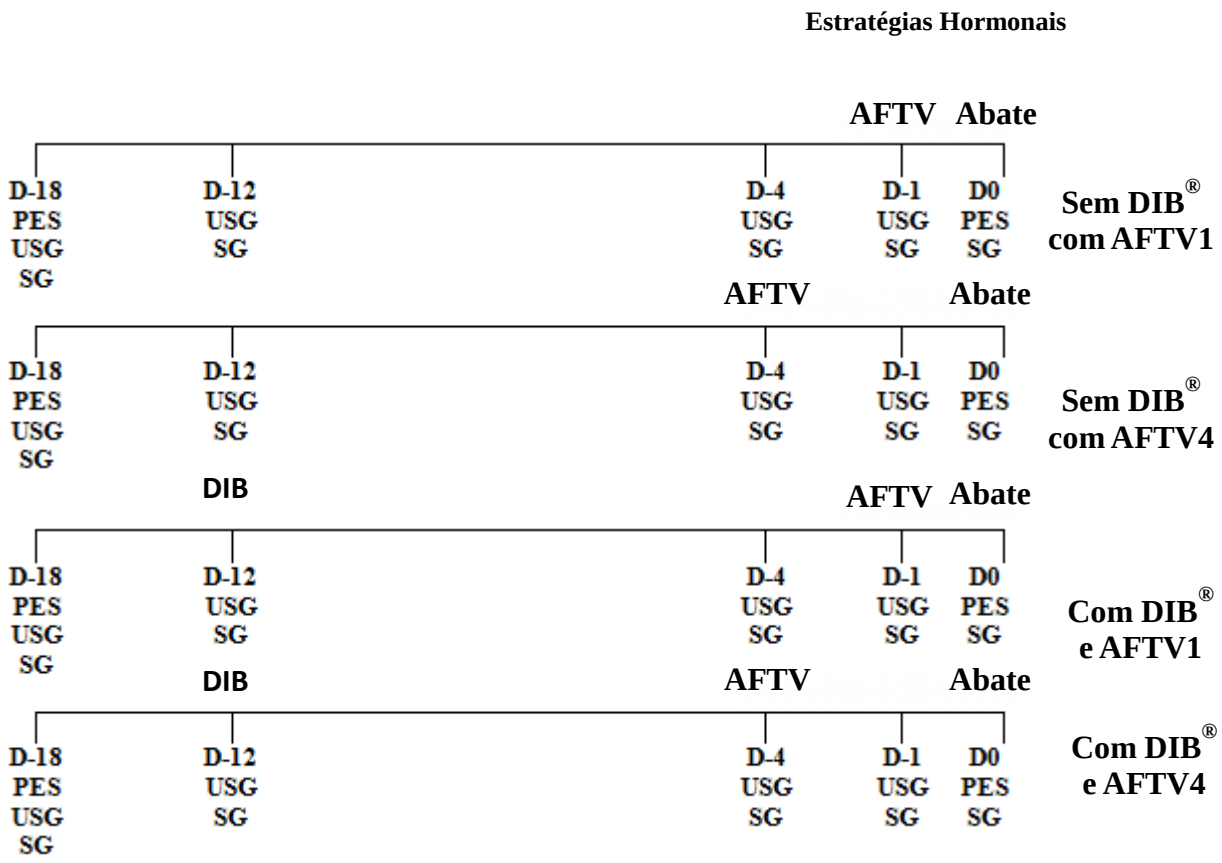
O experimento a campo foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte do departamento de Nutrição e Produção da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus Fernando Costa, de acordo com os princípios éticos com a aprovação do comitê de ética em experimentação animal dessa instituição (CEUA-FMVZ/USP, n° 3028/2013). Nesse estudo utilizou-se novilhas da raça Nelore provenientes do rebanho da Prefeitura Administrativa (PUSP-P), filhas de vacas controladas pelo programa de melhoramento genético desta instituição, inseminadas com sêmen proveniente de touros de alto padrão genético, monitorados pelo programa de seleção genética da Agro-Pecuária CFM.

Inicialmente noventa bezerras recém desmamadas aos 8,9 $\pm$ 2,9 meses de idade com peso de 181,6 $\pm$ 1,8 kg, receberam durante um período de cinco meses, e ao longo dos 18 dias das estratégias hormonais, uma dieta constituída por 79,9% de silagem de milho e concentrado composto por 17,8% de farelo de soja, 0,5% de ureia e 1,8% de núcleo mineral na matéria seca (MS), *ad libitum* em cochos coletivos formulada para promover um ganho de peso médio diário de 0,9 kg (NRC, 2000). Deste montante, sessenta novilhas pré-púberes, apresentando 13,9 $\pm$ 2,9 meses, peso de 273,6 $\pm$ 5,6 kg, escore de condição corporal (ECC) 5,9 $\pm$ 0,7 em uma escala de 0 a 9, e ovários com folículos em crescimento, sem sinais de ovulação avaliados semanalmente, durante um mês anterior ao início do experimento por ultrassonografia transretal com sonda linear de frequência 5,0 MHz (Mindray® DP 2200), foram consideradas aptas a serem utilizadas nas estratégias hormonais de indução de puberdade avaliadas nesse estudo.

Após a seleção, de acordo com os critérios anteriormente citados, as novilhas consideradas pré-púberes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos de 15 animais, nas seguintes estratégias hormonais: 1) AFTV1 sem DIB: submetidas a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia um dia antes do abate (AFTV1), sem o emprego de dispositivo intravaginal bovino de liberação sustentada de progesterona ; 2) AFTV4 sem DIB: também sem implante de progesterona, submetidas a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia quatro dias antes do abate (AFTV4); 3) AFTV1 com DIB® submetidas a uso de dispositivo intravaginal de liberação sustentada de progesterona (DIB®, MSD Saúde

Animal Brasil), usado previamente por duas vezes em vacas *Bos indicus* (durante 8 dias, totalizando 16 dias de uso prévio) e AFTV1; Grupo 4; com DIB® e AFTV4 (Figura 1).

Figura 1- Representação esquemática das estratégias hormonais e avaliações experimentais.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: PES: Pesagem; USG: Ultrassonografia; SG: Colheita de sangue; AFTV: Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia; Sem DIB® com AFTV1, Sem DIB® com AFTV4, Com DIB® e AFTV1 e Com DIB® e AFTV4, siglas correspondentes as estratégias hormonais, onde: DIB® = dispositivo intravaginal bovino de liberação sustentada de progesterona, (DIB®, MSD Saúde Animal Brasil), usado previamente por duas vezes em vacas *Bos indicus*; AFTV1 e AFTV4 = Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia um e quatro dias antes do abate, respectivamente.

Durante as estratégias hormonais, foram realizadas um total de quatro avaliações ultrassonográficas, nos dias 18 (D-18), 12 (D-12), 4 (D-4) e 1 (D-1) (Figura 1), em relação a data do abate, para avaliar a saúde do trato reprodutivo, mapear os ovários e averiguar possível presença de corpo lúteo. A primeira ultrassonografia foi realizada seis dias antes da inserção do DIB® no D-18, seguido de outra no D-12, e as demais no D-4 e D-1. A administração da progesterona exógena, nos grupos que a receberam o DIB®, usado previamente por duas vezes em vacas (durante 8 dias, totalizando 16 dias de uso prévio) teve como objetivo aumentar e manter as concentrações plasmáticas de progesterona a partir de 1 ng por ml, sem comprometer o crescimento folicular. Após o uso do DIB®, os implantes

foram inseridos no D-12, sendo removidos no (D-0), data do abate. Por já terem sidos utilizados previamente em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo de vacas adultas, antes de serem utilizados neste experimento, os dispositivos foram lavados com água e imersos em solução de cloreto de alquil dimetil benzil amônio (CB 30 Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil) por aproximadamente 10 minutos, sendo posteriormente secados com papel absorvente, acondicionados em sacolas plásticas e mantidos em local limpo, seco e ao abrigo do sol até a sua utilização nas novilhas.

Com o intuito de diminuir ao máximo concentrações plasmáticas e consequentemente a ação do 17 beta estradiol de origem ovariana, sobre os tecidos estudados nos grupos (sem DIB® com AFTV1) e (com DIB® e AFTV1), foi realizada uma AFTV1 de todos os folículos com diâmetro a partir de 3 mm. Enquanto que nos demais grupos (sem DIB® com AFTV4) e (com DIB® e AFTV4), foi realizada a AFTV4, objetivando-se favorecer a nova onda de crescimento folicular e aumentar as concentrações plasmáticas e ações deste hormônio nos tecidos no D-0.

Para a realização das aspirações foliculares transvaginais (AFTV) as novilhas foram contidas e submetidos à anestesia epidural (espaço sacrococcígeo) utilizando lidocaína a 2% sem vaso constritor na dose de 7mg/kg de peso vivo. (Lidovet®, Bravet). Após a anestesia, foi feita a higienização da região perineal e, em seguida, uma probe microconvexa com frequência 6,5 MHz (Mindray –DP2200) foi introduzida até o fundo de saco vaginal com o auxílio de uma guia de aspiração folicular. As aspirações foram realizadas utilizando-se um sistema com agulha descartável (20 G; 0.9 x 50 mm; Terumo Europe NV, Belgium), acoplado à linha de aspiração de Teflon de 1,7mm de diâmetro e 110 cm de comprimento.

Ao final das estratégias hormonais, trinta e cinco novilhas (Tabela 1), que não apresentaram presença de corpo lúteo, foram abatidas e tiveram seus úteros dissecados no lado ipso e contralateral ao folículo dominante (FD) levando-se em consideração o maior diâmetro de folículo, mediante o mapeamento ovariano, realizado um dia antes do abate (D-1) como referência.

Tabela 1 - Identificação, filiação e distribuição das novilhas abatidas ao final das estratégias hormonais

N°	Novilha	Vaca	Touro	Estratégia hormonal
1	5075	UP181308	Paint Gurka	Sem DIB® com AFTV1
2	5093	UP395911	Lítio AJ	Sem DIB® com AFTV1
3	5103	UP142907	Níquel AJ	Sem DIB® com AFTV1
4	5112	UP202708	Paint Impacto	Sem DIB® com AFTV1
5	5116	UP368110	Paint Código	Sem DIB® com AFTV1
6	5126	UP381011	Níquel AJ	Sem DIB® com AFTV1
7	5227	UP295709	1476AJ, 1477ALQ	Sem DIB® com AFTV1
8	5232	UP345810	Paint Código	Sem DIB® com AFTV1
9	5239	UP158807	Paint Código	Sem DIB® com AFTV1
1	5087	UP297809	Níquel AJ	Sem DIB® com AFTV4
2	5088	UP270901	CFM5677, 1573ALQ	Sem DIB® com AFTV4
3	5089	UP291709	Paint Código	Sem DIB® com AFTV4
4	5097	UP295809	Paint Código	Sem DIB® com AFTV4
5	5106	UP412411	Lítio AJ	Sem DIB® com AFTV4
6	5149	UP303609	Paint Impacto	Sem DIB® com AFTV4
7	5162	UP326409	Paint Impacto	Sem DIB® com AFTV4
8	5214	UP386311	1624ALQ, 1594ALQ	Sem DIB® com AFTV4
1	5071	UP312409	Níquel AJ	Com DIB® e AFTV1
2	5086	UP379811	Níquel AJ	Com DIB® e AFTV1
3	5100	UP383411	Paint Impacto	Com DIB® e AFTV1
4	5118	UP210499	CFM Lithos	Com DIB® e AFTV1
5	5119	UP096305	Níquel AJ	Com DIB® e AFTV1
6	5154	UP368910	554AJ, 1594ALQ	Com DIB® e AFTV1
7	5161	UP295309	CFM Intelecto	Com DIB® e AFTV1
8	5228	UP344710	Paint Impacto	Com DIB® e AFTV1
9	5231	UP344711	CFM Intelecto	Com DIB® e AFTV1
1	5077	UP316309	CFM Lithos	Com DIB® e AFTV4
2	5094	UP089805	Níquel AJ	Com DIB® e AFTV4
3	5098	UP406911	Níquel AJ	Com DIB® e AFTV4
4	5110	UP318609	CFM4013, 1624ALQ	Com DIB® e AFTV4
5	5125	UP410311	1477ALQ, 1414ALQ	Com DIB® e AFTV4
6	5133	UP359610	Paint Código	Com DIB® e AFTV4
7	5137	UP124806	Níquel AJ	Com DIB® e AFTV4
8	5170	UP394011	1477ALQ, 1414ALQ	Com DIB® e AFTV4
9	5233	UP219299	CFM5677, 1573ALQ	Com DIB® e AFTV4

Fonte: (SOUSA, R. T, 2017).

Legendas: (DIB®, MSD Saúde Animal Brasil), usado previamente por duas vezes em vacas *Bos indicus* (durante 8 dias, totalizando 16 dias de uso prévio): AFTV1 e AFTV4 = Aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia um e quatro dias antes do abate, respectivamente.

3.2 Colheita de sangue e análises hormonais

Amostras de sangue foram colhidas em tubos secos e heparinizados por venopunção da jugular utilizando sistema à vácuo (Vacutainer®) nos dias -18, -12, -4, -1 e zero (imediatamente antes da retirada do implante) (Figura 1). O sangue foi mantido em gelo e levado ao laboratório para centrifugação a 1.500 x g por 15 minutos a 4 ºC, sendo o plasma armazenado à -20 ºC para a dosagem de progesterona. A concentração de progesterona foi determinada por radioimunoensaio utilizando-se *kit Coat-A-Count* (Diagnostic Product Corporation, USA) no Laboratório de Endocrinologia da FMV-UNESP (Araçatuba, SP).

3.3 Colheita e processamento do endométrio e rendimento de carcaça

Os abates foram realizados no Abatedouro Escola da PUSP-P, a insensibilização foi feita por concussão medular. Após o abate os ovários e os úteros foram separados, sendo este último dissecado, mantendo apenas corpo e cornos uterinos, sendo posteriormente pesado. Cada corno uterino foi incisado longitudinalmente na sua porção antimesometrial, para dissecação do tecido endometrial da região intercaruncular. As amostras intercarunculares foram colhidas na região média em ambos os cornos, onde posteriormente foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido, e mantidas à -80°C até a extração do RNA total (Figura 2). O rendimento de carcaça foi calculado a partir do peso da carcaça quente, dividido pelo peso vivo final das novilhas.

Figura 2 -Concussão medular, dissecação do útero, colheita e armazenamento dos tecidos endometriais

Fonte: (FRANÇA, M. R., 2011)

3.4 Extração e avaliação do ácido ribonucleico (RNA) total e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)

Para a extração do RNA total foram selecionados tecidos intercarunculares obtidos das porções do terço médio do corno uterino direito e esquerdo de seis animais de cada tratamento totalizando 48 amostras de RNA total (Figura 3). Essa seleção foi baseada nas concentrações plasmáticas de progesterona, sendo selecionadas as amostras de novilhas que apresentaram concentrações plasmáticas inferior a 0,5 ng/mL de progesterona em todas as avaliações feitas ao longo das estratégias hormonais, quando pertencentes aos grupos sem DIB e AFTV1 e sem DIB e AFTV4, enquanto que para o grupo de novilhas com DIB e AFTV1 e com DIB e AFTV4 foi considerada uma concentração inferior a 0,5 ng/mL no D-18, D-12 e a partir de 1,0 ng/mL de progesterona no D-4, D-1 e D-0.

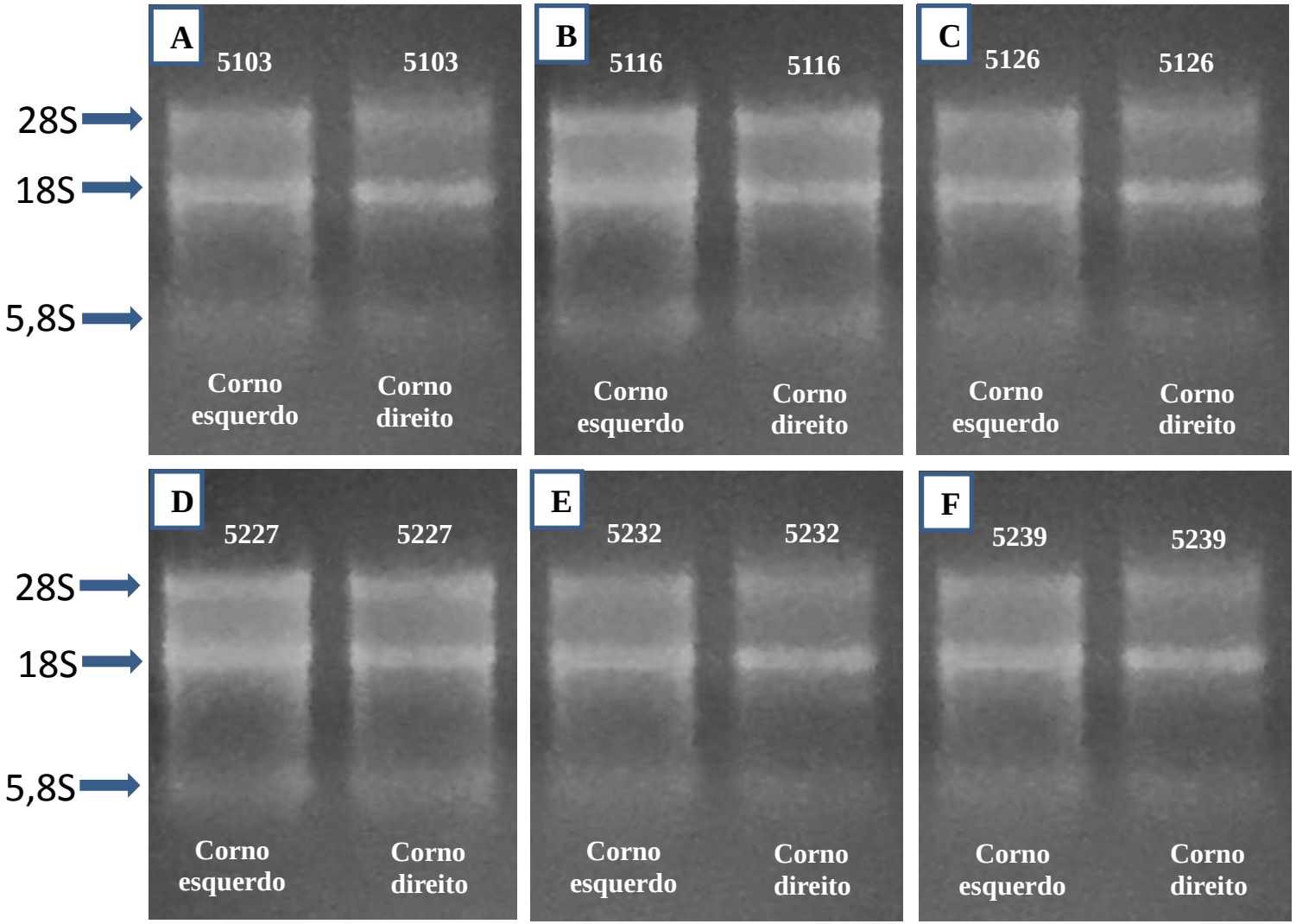
Aproximadamente 30 mg de tecido endometrial foram submersos em nitrogênio líquido e macerados em aparato de aço inoxidável pela aplicação de pressão, resultando na pulverização do tecido endometrial. Em seguida, foi realizada a extração de RNA utilizando-se o kit AllPrep®DNA/RNA/Protein Mini kit (N°80004, Quiagen Laboratories, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA foram estimadas por NanoDrop (http://nanodrop.com/) utilizando absorbância 260 nm e pelas razões 260/28 (≥1,8) e 260/230 (≥1,8) conforme (SAMBROOK et al., 1989).

Com o intuito de verificar a integridade das bandas estruturais de RNA ribossomal (28 S, 18 S e 5.8 S) das amostras de RNA total extraído, realizou-se uma eletroforese em gel desnaturante de agarose-formaldeído 1,2%. Para isso, em um Erlenmeyer foram adicionados 0,6g de agarose em 45 ml de água tratada com pirocarbonato de dietila (DEPC) e 5,0 ml de tampão para o gel 10X (composto de 10,47g de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) a 20 mM pH 7.0, 1,7g de acetato de sódio a 50 mM e 5 ml de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 1 mM diluídos em 180 ml de água tratada com DEPC. A solução foi aquecida seguidas vezes em forno micro-ondas em potência máxima até iniciar a fervura. Entre um aquecimento e outro, a solução foi homogeneizada até que agarose estivesse totalmente diluída. Ao atingir uma temperatura de 65°C em banho-maria, adicionou-se 0,9 de ml de 37% formaldeído (12,3 M) e 1µl de uma solução estoque de brometo de etídio (10mg/ml).

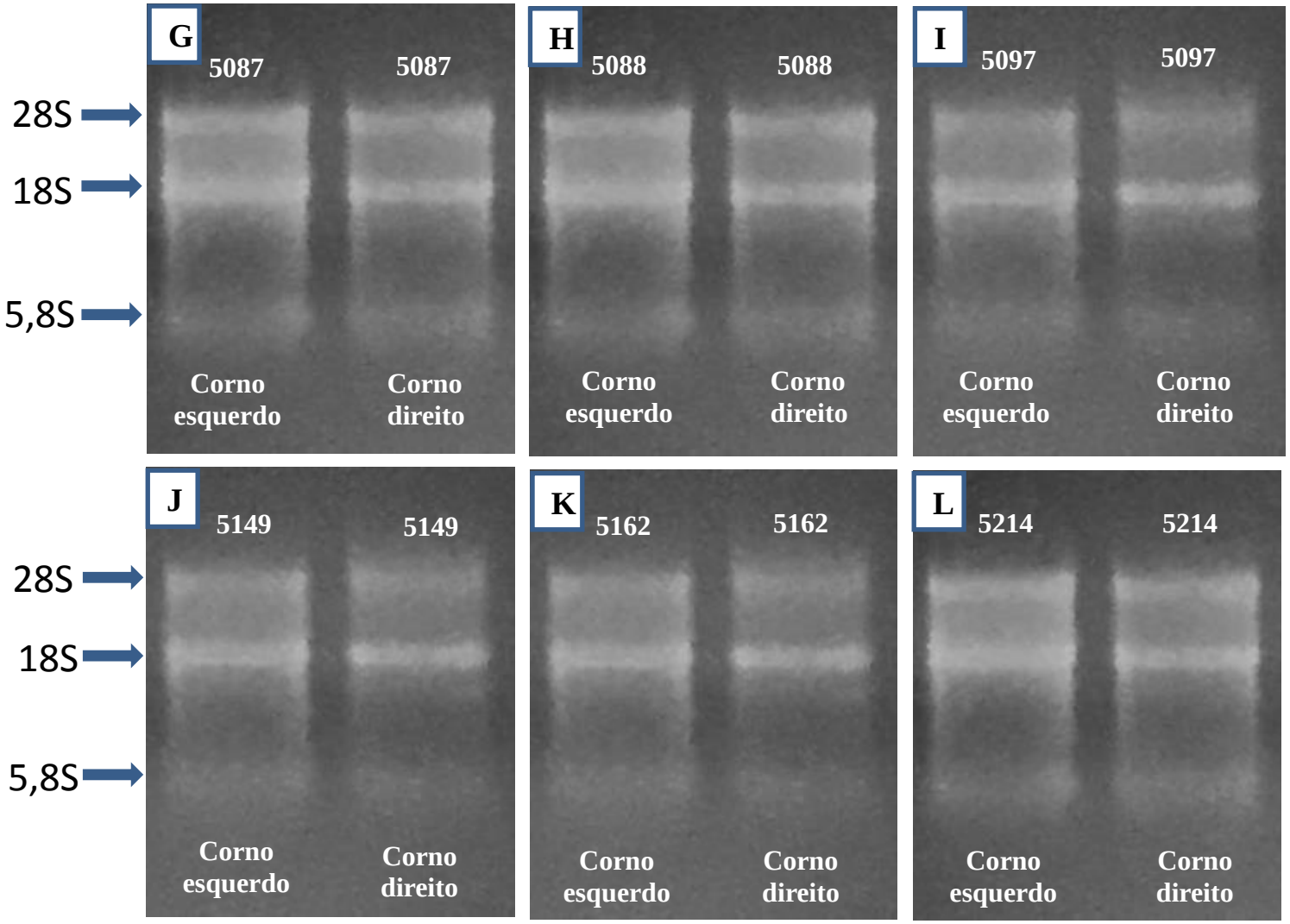
Antes da corrida, o gel foi equilibrado no tampão de corrida 1X (composto por 50 ml do tampão para gel 10X, 10 ml de formaldeído 37% (12,3 M) e 440 ml de água tratada com DEPC) durante 30 minutos. Foram adicionados um microlitro de tampão de aplicação de RNA 5x (composto de 25 mg de azul bromofenol, 80µl de 0,5 M EDTA, pH 8,0, 750 µl de formaldeído 37% (12,3 M), 2ml de glicerol, 3,084 ml de formamida e 4ml do tampão para gel 10X) e 4µl de RNA total. Posteriormente, essa solução foi colocada no poço do gel. A corrida foi feita a 70V por 50 minutos. O gel foi exposto a uma luz ultravioleta em transluminador por sistema de foto documentação. Após a confirmação da qualidade das amostras de RNA total pelos métodos descritos (Figura 3), as mesmas foram submetidas a síntese do cDNA utilizando o kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen – Life Technologies do Brasil) conforme instruções do fabricante, a partir de 1000ng de RNA total.

Figura 3 - RNA total em gel desnaturante de agarose-formaldeído 1,2%, isolado do tecido endometrial da região média do corno uterino de novilhas Nelore pré-púberes

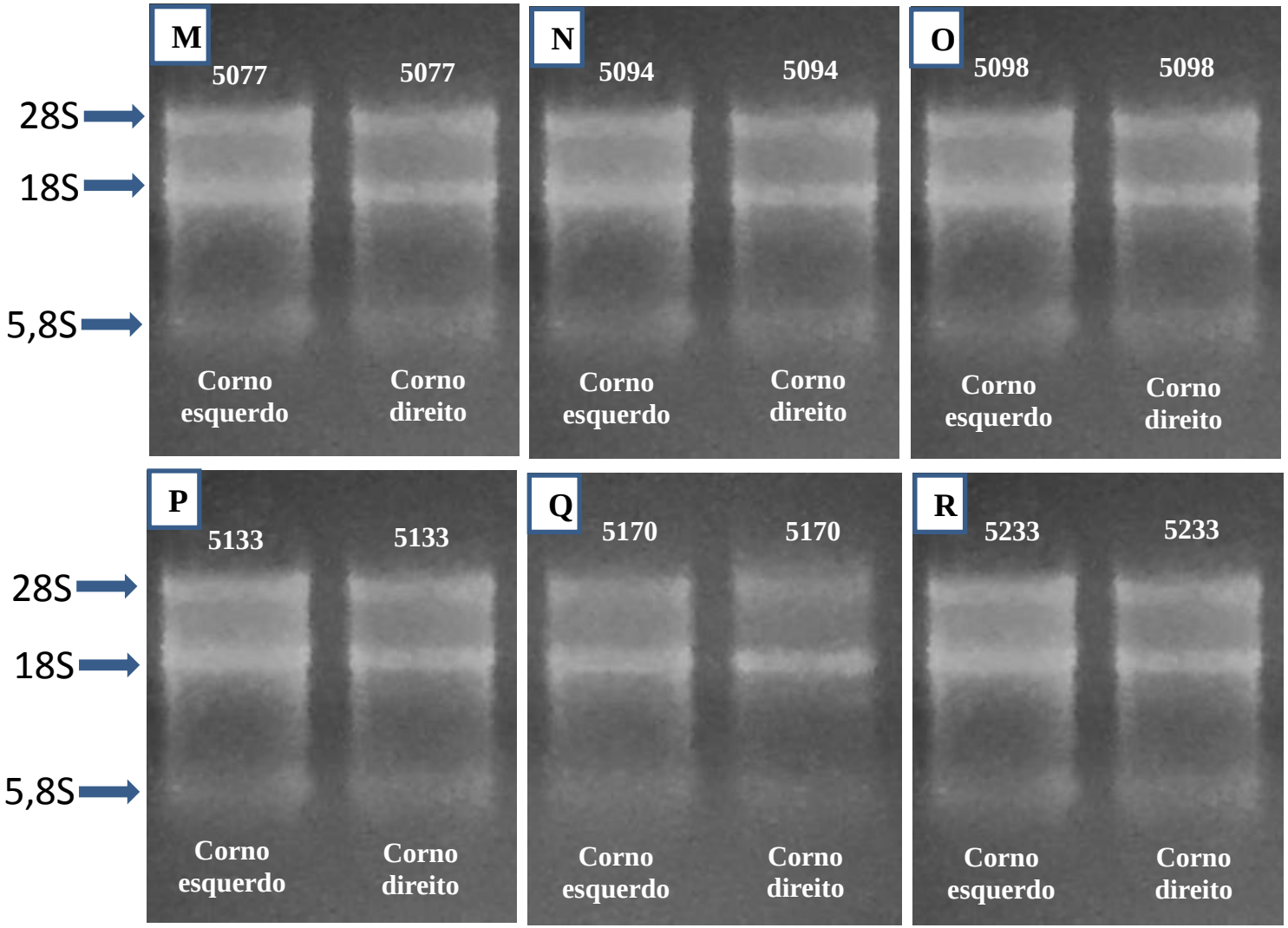
(Continua)



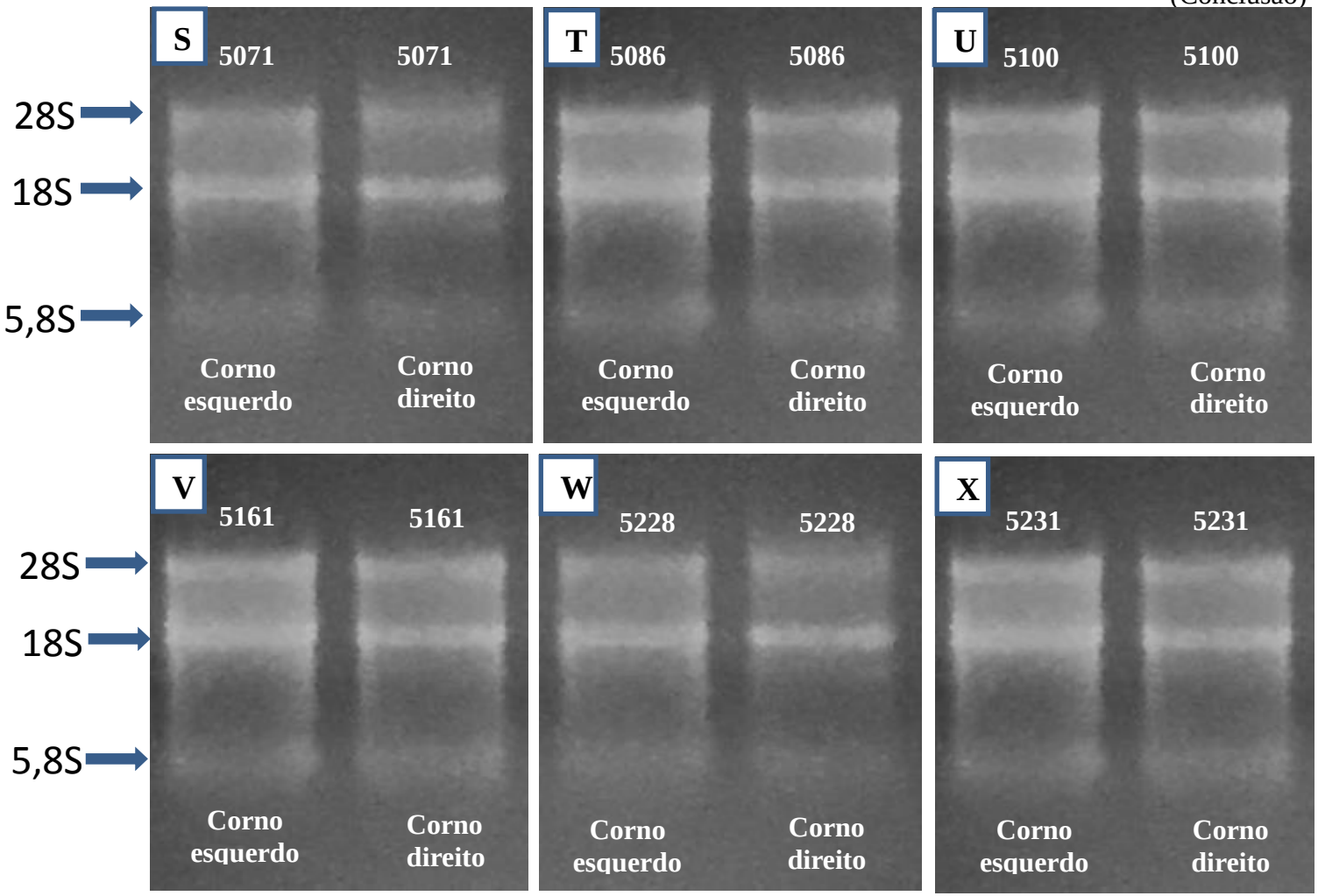
(Continua)


G
5087
5087
28S
18S
5,8S
Corno esquerdo
Corno direito
H
5088
5088
Corno esquerdo
Corno direito
I
5097
5097
Corno esquerdo
Corno direito
J
5149
5149
28S
18S
5,8S
Corno esquerdo
Corno direito
K
5162
5162
Corno esquerdo
Corno direito
L
5214
5214
Corno esquerdo
Corno direito

(Continua)


M
5077
5077
28S
18S
5,8S
Corno esquerdo
Corno direito
N
5094
5094
Corno esquerdo
Corno direito
O
5098
5098
Corno esquerdo
Corno direito
P
5133
5133
28S
18S
5,8S
Corno esquerdo
Corno direito
Q
5170
5170
Corno esquerdo
Corno direito
R
5233
5233
Corno esquerdo
Corno direito

(Conclusão)



Fonte (SOUSA, R. T., 2017)

Bandas específicas indicam a integridade do RNA total através da visualização das bandas ribossomais 28S, 18S e 5,8S, onde as amostras ilustrações A-F; G-L; M-R; S-X; são oriundos dos animais pertencentes às estratégias hormonais: Sem DIB® com AFTV1, Sem DIB® com AFTV4, Com DIB® e AFTV1 e Com DIB® e AFTV4, respectivamente.

3.5 Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real *(qRT-PCR)*

Os primers utilizados nesse estudo foram desenhados, preparados para sequenciamento e gentilmente cedidos pela equipe do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular-LFEM-FMVZ-USP. A abundância de transcritos específicos de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) foi determinada por qRT-PCR, utilizando-se 7500 Real-Time PCR System® Applied Biosystem. Os primers senso e anti-senso foram obtidos com base no GenBank, utilizando como referência as sequências de RNAm dos genes estudados. As sequências de RNAm de cada gene foram avaliadas no software RepeatMasker (http://www.repeatmasker.org/), com o objetivo de remover eventuais repetições nas mesmas, conforme Smit; Hubley; Green, 1996-2010. Posteriormente, as sequências selecionadas foram submetidas ao software PrimerQuest^QM (IDT®; http://idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest), para a obtenção dos primers. Cada par de primer foi avaliado quanto a probabilidade de formação de hairpins, homodímeros e heterodímeros de primers utilizando o programa Oligo Analyzer 3.1 (IDT®; http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/). Tais sequências foram testadas quanto a sua especificidade usando o software “Basic Local Alignment Search Tool” (Blast; http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Os primers foram sintetizados pela Invitrogen (Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil), os detalhes dos mesmos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 -Sequências de primers dos genes alvos e normalizadores analisados por qRT-PCR

(Continua)

Gene	Acesso GenBank	Sequências dos primers	Tamanho do produto (pb)	Referências
ESR1	NM_001001443.1	F: 5´ CAGGCACATGAGCAACAAAG R: 3´ TCCAGCAGCAGGTCGTAGAG	84	Primer Quest
ESR2	NM_174051.3	F:5´ GTAGAGAGCCGCCATGAATAC R:3´ CAATGGATGGCTAAAGGAGAGA	161	Primer Quest
GPER	XM_002698169.3	F:5´ CCTGTACACCATCTTCCTCTTC R:3´ CGATGTCATAGTACTGCTCGTC	191	Primer Quest
PGR1	NM_001202474.3	F:5´ ACTACCTGAGGCCGGATT R:3´ CCCTTCCATTGCCCTCTTAAA	164	Primer Quest
PGR2	NM_000926.4	F:5´ CTACCCGCCCTATCTCAACTA R:3´ TTGTGCTGCCCTTCCATT	189	Primer Quest
PGR3	NM_001271161.2	F:5´ CTACCCGCCCTATCTCAACTA R:3´ TGTGCTGCCCTTCCATT	188	Primer Quest
PGRMC1	NM_001075133.1	F:5´ AGGGGCCGTATGGAGTCTTT R:3´ CCACATGATGGTACTTGAAAGTGAA	174	Primer Quest
PGRMC2	NM_001202474.3	F:5´ CAGGGGAAGAACCGTCAGAA R:3´ ATGAAGCCCCACCAGACATT	287	Primer Quest
AQP4	NM_181003.2	F:5´ GTGTCTGTTGCAGTGAGAT R:3´ CAAAGGGACCTGGGATTTAG	157	Primer Quest
EGFR	XM_592211	F:5´ ATGCTCTATGACCCTACCAC R:3´ TTCCGTTACAAACTTTGCCA	237	YAMAKOSHI et al.(2012)
FGF2	NM_001205310.1	F:5´ TTGACGTTGTTGAGCGATCAC R:3´ GGCTGGGCATCGCTGTAC	141	Primer Quest
FGFR2	NM_001205310.1	F:5´ TTGACGTTGTTGAGCGATCAC R:3´ GGCTGGGCATCGCTGTAC	125	Primer Quest
IGF2R	NM_174352.2	F:5´ CGCCTACAGCGAGAAGGGGTTAGTC R:3´ AGAAAAGCGTGCACGTGCGCTTGTC	293	YASEEN et al.(2001)
LPL	NM_001075120	F:5´ CAGGTCGAAGTATCGGAATCCA R:3´ GAAAGTGCCTCCGTTAGGGTAAA	68	FORDE et al.(2010)
LTF	NM_180998	F:5´ GAAGGTAGATTCGGCGCTGTA R:3´ CAGTTTCCCTGAGGTTCTTCAAG	68	Primer Quest
MMP2	NM_174745	F:5´ CCCAGACAGTGGATGATGC R:3´ TTGTCCTTCCTCCCAGGGTC	248	Primer Quest

(Conclusão)

Gene	Acesso GenBank	Sequências dos primers	Tamanho do produto (pb)	Referências
MMP9	NM_174744.2	F:5´ CTTCTGCCAGGATCACTTCTAC R:3´ CAGACTGGCTCATTCCCTATTG	183	Primer Quest
MUC1	NM_174115.2	F:5´ CAACCAGGGCAATGAGATAG R:3´ ACCATCAGCGGAGTTAGT	143	Primer Quest
OXTR	NM_174134.2	F:5´ AAGATGACCTTCATCGTCGTG R:3´ CGTGAAGAGCATGTAGATCCAG	177	KRISHNASWAWY et al(2009)
SERPINA 14	NM_174797.3	F:5´ ATATCATCTTCTCCCCCATGG R:3´ GTGCACATCCAACAGTTTGG	126	ULBRICH et al.(2009)
SLC2A1	NM_174602.2	F:5´ ATCATCTTTCACCGTGCTCCTGGTT R:3´ TGTCACTTTGACTTGCTCCTCCCT	127	Primer Quest
VEGFA	NM_174216.1	F:5´ CCCAGATGAGATTGAGTTCATTTT R:3´ GCCTCGGCTTGTCACCTTTT	245	SHIRASUNA et al.(2010)
WNT5A	NM_001205971.1	F:5´ TTCTGAGGAGTCTGGAAGG R:3´ GTGAGCAGAGGAAACAGAA	184	Primer Quest
ACTB	NM_173979.3	F:5´ GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA R:3´ TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	78	BETTEGOWDA et al.(2006)
GAPDH	NM_001034034.2	F:5´ GCCATCAATGACCCCTTCAT R:3´ TGCCGTGGGTGGAATCA	70	BETTEGOWDA et al.(2006)
PPIA	NM_178320.2	F:5´ GCCATGGAGCGCTTTGG R:3´ GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA	69	BETTEGOWDA et al.(2006)

Para a determinação da melhor concentração de cDNA para cada gene, foram feitas diluições do pool de cDNA do endométrio das novilhas considerando-se seis pontos, sendo que o primeiro ponto era constituído pela amostra pura e os demais por 60, 30, 15, 5 e 2,5% da amostra pura respectivamente.

Após a determinação da melhor concentração de cDNA, iniciou-se os testes de (qRT-PCR) para a comparação da abundância de cada transcrito entre os grupos. Para todos os genes foi estabelecida o mesmo limiar de detecção "*threshold*" no ponto médio da amplificação exponencial. Os genes normalizadores foram selecionados de acordo com a ordem de estabilidade de expressão conforme (VANDESOMPELE et al., 2002), na qual foi obtida através do software qBasePLUS v.2.3 (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium), baseado na aplicação do geNorm. Os valores de ciclo "*threshold*" (Ct) dos genes referentes a *Beta Actina* (*ACTB*), *Ciclofilina A* (*PPIA*) e *Gliceradeído-3-Fosfato Desidrogenase* (*GAPDH*) foram convertidos em quantidade escalar de expressão usando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ de acordo com (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), e esses valores submetidos ao geNorm. Os genes foram ranqueados com base na ordem de estabilidade de expressão (M), onde os genes com maior estabilidade apresentam os menores valores de M. Dos três genes analisados, o *GAPDH* foi o mais estável, sendo este utilizado como gene constitutivo para correção dos resultados de expressão gênica.

Para as reações de PCR foi utilizado uma placa de 96 poços, selada com fita adesiva transparente MicroAmp (Life Tecnhologies). Cada reação teve o volume final de 20µl usando 10 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Tecnhologies), 1ul de cDNA, 1,2ul de oligonucleotideos iniciadores (primers) senso e anti-senso (diluição 1:80) e 7,8µl de água tratada com DEPC. Para cada gene estudado, as amostras foram avaliadas em duplicata. A reação de qRT-PCR teve início com a etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 44 ciclos de 15 segundos a uma temperatura de 95°C, anelamento de 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos.

Os produtos de qRT-PCR de todos os genes avaliados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 2% com intuito de confirmar o tamanho do fragmento em pares de base (tabela 2). Para a visualização dos produtos de qRT-PCR em eletroforese, diluiu-se 3g de agarose em 150 ml de Tris/ Borato/EDTA (TBE) 0,5 X. A solução foi aquecida seguidas vezes em forno micro-ondas em potência máxima até iniciar a fervura, entre um aquecimento e outro a solução foi homogeneizada até que agarose estivesse totalmente diluída. Ao atingir uma temperatura de 50°C, adicionou-se 2µl de uma solução

estoque de brometo de etídio (10mg/ml). Após isso, a solução foi despejada no suporte para gel e pente. Após a solidificação do gel, o pente foi retirado lentamente e o suporte foi alocado adequadamente na cuba para eletroforese. A cuba foi preenchida com TBE 0,5x até cobrir o gel. Oito microlitros do produto de qRT-PCR foram adicionados a dois microlitros de tampão de corrida 5x (loading buffer) e dez microlitros dessa solução foi colocado no poço do gel. A corrida foi feita a 70V durante 80 minutos e posteriormente, o gel foi exposto a uma luz ultravioleta em transluminador.

3.6 Sequenciamento de produtos de QRT-PCR

Para o sequenciamento os produtos de qRT-PCR, foram purificados utilizando QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen Laboratories). Os produtos de qRT-PCR foram quantificados por Nano Vue (GE Life Sciences). As amostras foram diluídas e acrescidas das soluções dos respectivos primers senso e encaminhadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. As sequencias dos resultados foram acessadas pelo software Chomas (http://techelysium.com.au/) e testadas quanto a especificidade usando o software "*Basic Local Alignment Search Tool*" (Blast;http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3.7 Análises estatísticas

Os dados produtivos e aqueles relacionados ao peso do útero foram submetidos a análise de variância, utilizando o PROC MIXED do SAS 9.3, considerando o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + AFTV_i + DIB_j + AFTV \times DIB_{ij} + e_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado para a repetição (animal) k, que recebeu o nível j de DIB e submetido à AFTV no dia i; μ é a média geral; $AFTV_i$ é o efeito fixo do dia de realização da aspiração folicular transvaginal; DIB_j é o efeito fixo do dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona; $AFTV \times DIB_{ij}$ é o efeito fixo da interação entre AFTV e DIB; e e_{ijk} é o erro experimental. Foi utilizado o método de correção de graus de liberdade de Satterth e as médias apresentadas foram obtidas pela ajustadas pela função LSMEANS.

Os dados de concentração plasmática de progesterona e diâmetro do folículo dominante foram submetidos a análise de variância, utilizando o PROC MIXED do SAS 9.3, considerando o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + AFTV_i + DIB_j + AFTV\times DIB_{ij} + \omega_{ijk} + T_l + AFTV\times T_{il} + DIB\times T_{jl}$$
$$AFTV\times DIB\times T_{ijl} + e_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} é o valor observado para a repetição (animal) k, que recebeu o nível j de DIB e submetido à AFTV no dia i, no l-ésimo dia de avaliação; μ é a média geral; $AFTV_i$ é o efeito fixo do dia de realização da aspiração folicular transvaginal; DIB_j é o efeito fixo do dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona; $AFTV\times DIB_{ij}$ é o efeito fixo da interação entre AFTV e DIB; ω_{ijk} é o erro experimental associado a parcela (definido como animal dentro de tratamento); T_l é o efeito fixo de tempo; $AFTV\times T_{il}$ é o efeito fixo da interação entre AFTV e tempo; $DIB\times T_{jl}$ é o efeito da interação entre DIB e tempo; $AFTV\times DIB\times T_{ijl}$ é o efeito fixo da interação entre AFTV, DIB e tempo; e e_{ijkl} é o erro experimental associado a subparcela (repetição no tempo). Foi utilizado o método de correção de graus de liberdade de Satterthwaite. Foram avaliadas as matrizes de covariância CS, CSH, ANTE(1), FA(1), TOEP, TOEPH, AR(1), ARH(1) e UN. O critério bayesiano foi utilizado para a escolha da matriz de covariância a ser utilizada. Quando houve interação entre tempo e um fator isolado, o efeito do fator foi estudado utilizando a função SLICE. As médias apresentadas foram obtidas pela ajustadas pela função LSMEANS.

Os dados de expressão gênica relativa foram submetidos a análise de variância, utilizando o PROC MIXED do SAS 9.3, considerando o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + AFTV_i + DIB_j + AFTV\times DIB_{ij} + \omega_{ijk} + C_l + AFTV\times C_{il} + DIB\times C_{jl}$$
$$AFTV\times DIB\times C_{ijl} + e_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} é o valor observado para o l-ésimo corno do animal (repetição) k, que recebeu o nível j de DIB e foi submetido à AFTV no dia i; μ é a média geral; $AFTV_i$ é o efeito fixo do dia de realização da aspiração folicular transvaginal; DIB_j é o efeito fixo do dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona; $AFTV\times DIB_{ij}$ é o efeito fixo da interação entre AFTV e DIB; ω_{ijk} é o erro experimental associado à parcela (definido como animal dentro de tratamento); C_l é o efeito fixo de corno; $AFTV\times C_{il}$ é o efeito fixo da interação entre AFTV e corno; $DIB\times C_{jl}$ é o efeito da interação entre DIB e corno; $AFTV\times DIB\times C_{ijl}$ é o efeito fixo da interação entre AFTV, DIB e corno; e e_{ijkl} é o erro experimental associado a subparcela. Foi utilizado o método de correção de graus de liberdade de Satterthwaite. Foram avaliadas as matrizes de covariância CS, CSH, ANTE(1), FA(1), TOEP, TOEPH, AR(1), ARH(1) e UN. O critério bayesiano foi utilizado para a escolha da matriz de covariância a ser utilizada. Quando houve interação entre os fatores, esta

foi estudada utilizando o teste de média de PDIFF. Para a interação tripla, o teste de médias foi dividido entre as médias de cada útero: para o corno contralateral foram utilizadas letras minúsculas, enquanto que para o corno ipsolateral foram utilizadas letras maiúsculas. As médias obtidas pela função LSMEANS do SAS foram corrigidas considerando a expressão no corno contralateral, dos animais que receberam DIB e foram submetidos à AFTV4 (ou a médias que a envolvem) como padrão, utilizando a seguinte equação: $2^{(\text{média-padrão})}$. Os erros padrões apresentados nos gráficos foram calculados a partir da relação entre média e EPM obtidos da função LSMEANS. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 0,05. Valores de probabilidades entre 0,05 e 0,10 foram considerados como tendência e discutidos como efeito.

4. RESULTADOS

Não houve efeito do dia da AFTV e do DIB sobre as variáveis de peso e rendimento de carcaça ($P > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre o desempenho produtivo e rendimento de carcaça de novilhas Nelore pré-púberes.

Variável	AFTV1[1]		AFTV4[2]		EPM[5]	Probabilidades (*P*)[6]		
	Sem DIB[3]	Com DIB[4]	Sem DIB[3]	Com DIB[4]		AFTV	DIB	INT
Peso vivo (kg)	287	288	285	282	2,03	0,33	0,79	0,64
Peso metabólico ($kg^{0,75}$)	69,8	69,9	69,4	68,8	0,37	0,32	0,79	0,64
PCQ[7] (kg)	159	159	160	158	0,98	0,99	0,53	0,51
PCF[8] (kg)	156	156	158	155	0,96	0,99	0,53	0,51
RC[9] (%)	54,5	54,3	55,4	55,1	0,24	0,10	0,66	0,88

Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)

Legenda:[1]Aspiração folicular transvaginal no dia -1 em relação ao abate; [2]Aspiração folicular transvaginal no dia -4 em relação ao abate; [3]Sem dispositivo intravaginal bovino de liberação lenta de progesterona; [4]Com dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona; [5]EPM: erro padrão da média; [6]Probabilidades: AFTV: efeito do dia da aspiração folicular transvaginal; DIB: efeito do dispositivo intravaginal bovino de liberação lenta de progesterona; INT: interação entre os efeitos de DIB e AFTV (DIB×AFTV); [7]Peso de carcaça quente; [8]Peso de carcaça fria; [9]Rendimento de carcaça.

Não houve interação entre AFTV e DIB sobre as variáveis relacionadas ao peso do útero ($P > 0,05$; Tabela 4). O uso do DIB aumentou o peso dos úteros ($P < 0,01$). Da mesma forma, o DIB aumentou as relações entre peso do útero e PV, PM, PCQ e PCF ($P < 0,01$). Não houve efeito do dia da AFTV sobre nenhuma destas variáveis ($P > 0,05$).

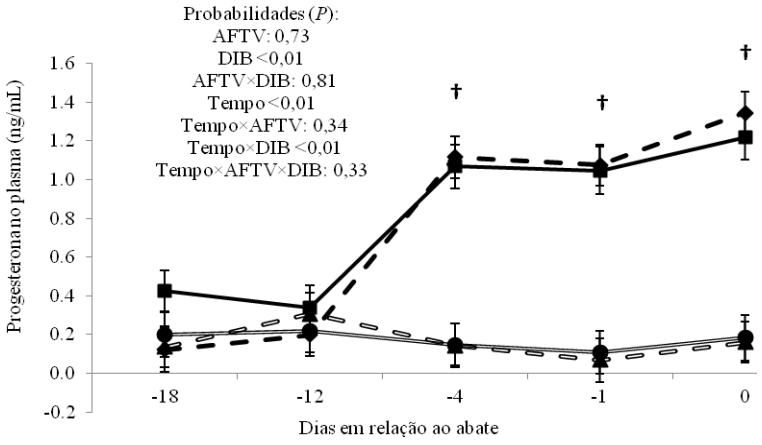
Tabela 4 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre o peso do útero (PU) de novilhas Nelore pré-púberes

Variável	AFTV1[1]		AFTV4[2]		EPM[5]	Probabilidades (*P*)[6]		
	Sem DIB[3]	Com DIB[4]	Sem DIB[3]	Com DIB[4]		AFTV	DIB	INT
Peso do útero (g)	36,6	69,2	48,7	63,7	3,49	0,64	<0,01	0,22
Relações								
PU:PV[7] (g/kg)	0,128	0,240	0,170	0,226	0,012	0,57	<0,01	0,26
PU:PM[8] ($g/kg^{0,75}$)	0,525	0,990	0,700	0,926	0,051	0,59	<0,01	0,25
PU:PCQ[9] (g/kg)	0,230	0,434	0,303	0,405	0,022	0,63	<0,01	0,26
PU:PCF[10] (g/kg)	0,234	0,441	0,308	0,412	0,022	0,63	<0,01	0,26

Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)

Legenda:[1]Aspiração folicular transvaginal no dia -1 em relação ao abate; [2]Aspiração folicular transvaginal no dia -4 em relação ao abate; [3]Sem dispositivo intravaginal bovino de liberação lenta de progesterona; [4]Com dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona; [5]EPM: erro padrão da média; [6]Probabilidades: AFTV: efeito do dia da aspiração folicular transvaginal; DIB: efeito do dispositivo intravaginal bovino de liberação lenta de progesterona; INT: interação entre os efeitos de DIB e AFTV (DIB×AFTV); [7]Relação entre o peso do útero e o peso vivo; [8]Relação entre o peso do útero e o peso metabólico; [9]Relação entre o peso do útero e o peso de carcaça quente; [10]Relação entre o peso do útero e o peso de carcaça fria.

Figura 4 - Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre as concentrações plasmáticas de progesterona em novilhas Nelore pré-púberes

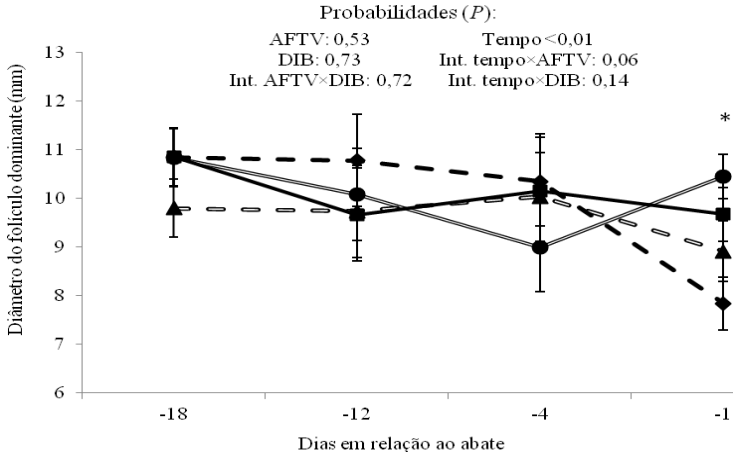


Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)

Legenda: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (—●—); sem e AFTV4 (—▲—); com DIB e AFTV1 (—■—) e, com DIB e AFTV4 (—◆—). † Efeito de DIB ($P < 0,05$).

Independentemente do tempo de avaliação e do DIB, a concentração plasmática de progesterona não foi afetada pela AFTV (P = 0,73). Contudo, o DIB aumentou as concentrações plasmáticas de progesterona ($P < 0,01$), nos dias -4, -1 e 0 ($P \leq 0,05$), em relação ao abate.

Figura 5 - Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre o diâmetro do folículo dominante de novilhas Nelore pré-púberes

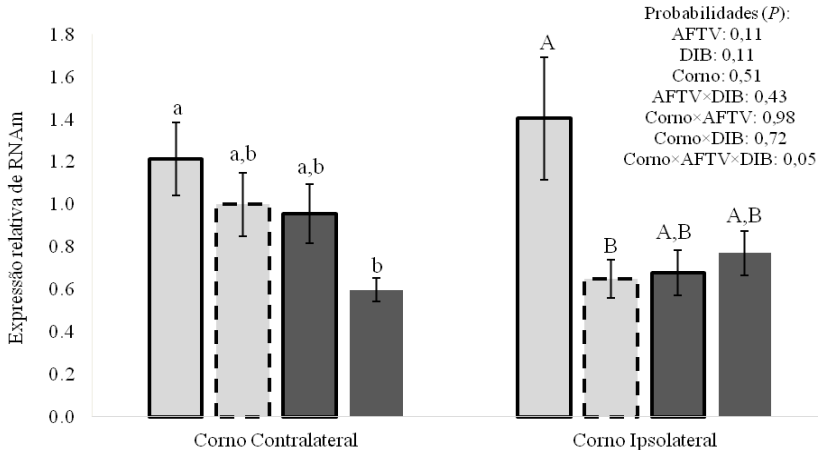


Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)

Legenda: Tratamentos: sem DIB e AFTV1 (—●—); sem DIB e AFTV4 (—▲—); com DIB e AFTV1 (—■—) e, com DIB e AFTV4 (—◆—). * Efeito de AFTV ($P < 0,05$).

Não houve interação entre os efeitos de tempo, DIB e AFTV (*P* = 0,64). Houve uma tendência (*P* = 0,06) de uma interação entre os efeitos de tempo e AFTV. Nos tempos -18, -12 e -4 a AFTV não afetou o diâmetro do folículo dominante (*P* > 0,05), enquanto que no dia -1 em relação ao abate, as novilhas dos grupos com AFTV1 apresentaram folículos dominantes maiores que AFTV4 (*P* ≤ 0,05). O tempo da avaliação afetou o diâmetro do folículo dominante (*P* < 0,01). Independentemente do tempo de avaliação e do dia de realização da AFTV, o DIB não afetou o diâmetro do folículo dominante (*P* = 0,73).

Figura 6 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica da isoforma α do receptor de estrógeno (*ESR1*), nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes

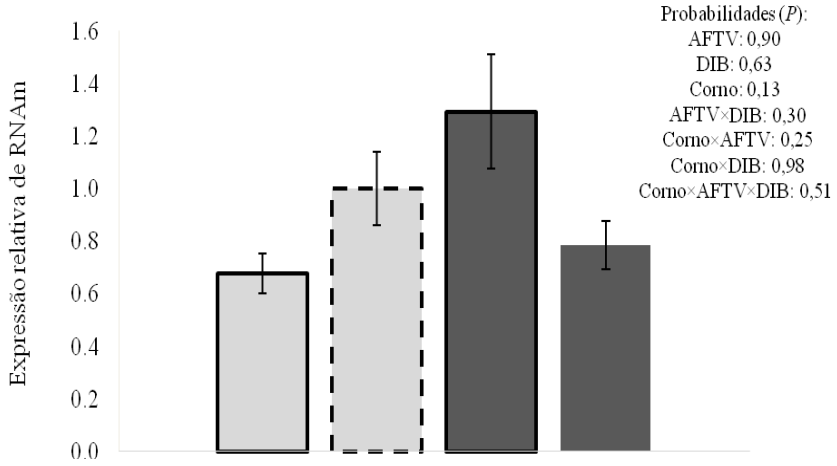


Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)

Legenda: Estratégias hormonais: sem DIB e com AFTV1 (□); sem DIB e com AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 do corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas e maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre o as estratégias hormonais nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente (*P* ≤ 0,05).

Houve interação entre os efeitos de corno uterino, DIB e AFTV sobre a expressão de *ESR1* (*P* = 0,05). No corno contralateral, a ausência do DIB associado a AFTV1 aumentou a expressão do *ESR1* em relação ao grupo com DIB e AFTV4 (*P* > 0,05). Enquanto que no corno ipsolateral a expressão relativa deste gene aumentou na ausência do DIB e presença de AFTV1 em relação à AFTV4 (*P* ≤ 0,05). No entanto, na presença do DIB em associação com AFTV não afetou a expressão deste gene, no corno ipsolateral (*P* > 0,05).

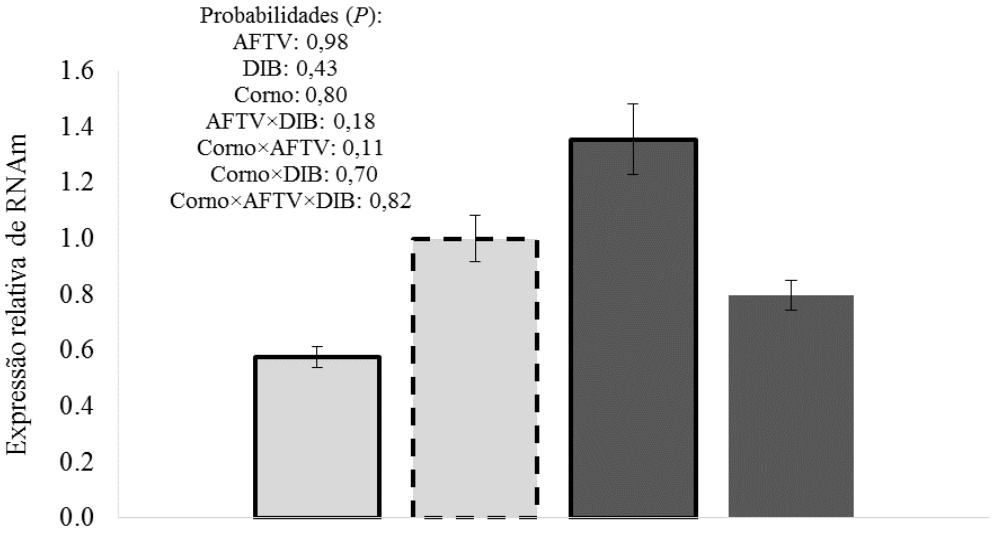
Figura 7 - Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica da isoforma β do receptor de estrógeno (*ESR2*), nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV-4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1).

Não houve efeito significativo nas variáveis estudadas sobe a expressão relativa do *ESR2* ($P > 0,05$).

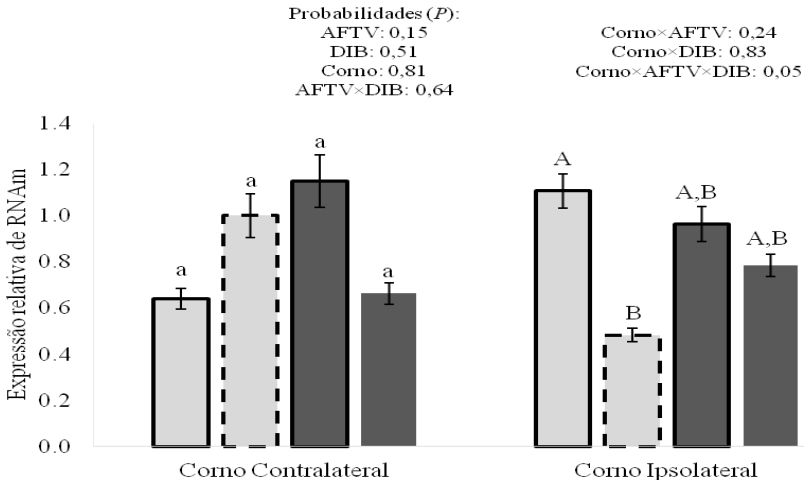
Figura 8 - Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica do receptor de estrógeno acoplado a proteína G (*GPER*), nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1).

Não houve efeito significativo nas variáveis estudadas na expressão relativa do GPER (P> 0,05).

Figura 9 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *EGFR*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes

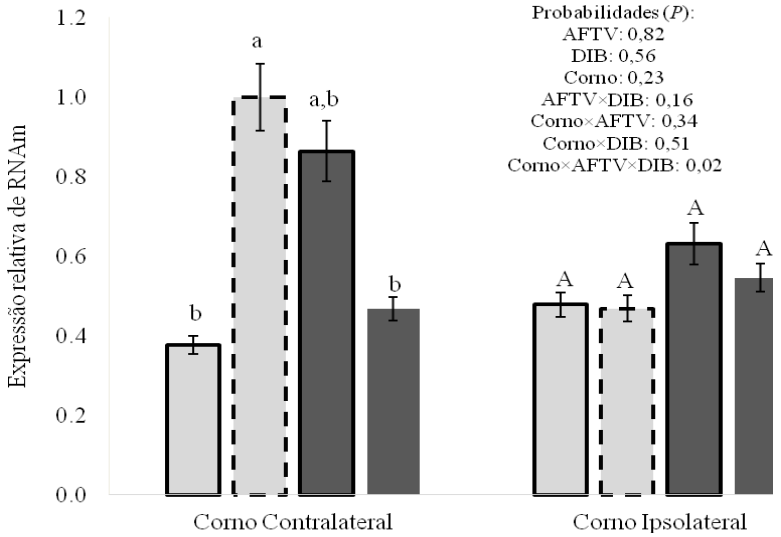


Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)

Legenda: Estratégias hormonais sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 do corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas e maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre o as estratégias hormonais nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre os efeitos de AFTV, DIB e corno sobre a expressão gênica de *EGFR* (P = 0,05; Figura 9). No corno contralateral, AFTV e DIB não afetaram a expressão deste gene (P > 0,05). No corno ipsolateral, no entanto, AFTV4 reduziu a expressão de *EGFR* em relação à AFTV1($P \leq 0,05$), nos animais que não receberam o DIB. Nos animais que receberam o DIB, o dia da AFTV não afetou a expressão gênica de EGFR (P > 0,05).

Figura 10 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica do *PGR1*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.

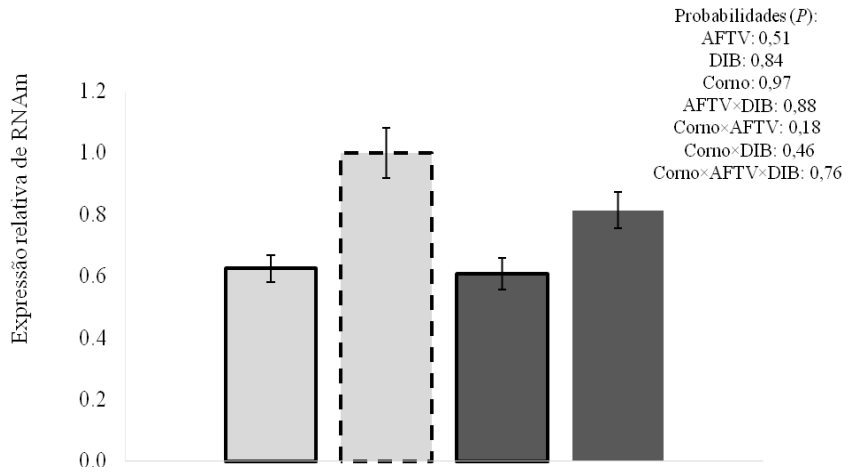


Fonte: (SOUSA, R. S, 2017)

Legenda: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 do corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas e maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre o as estratégias hormonais nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre os efeitos do dia de aspiração folicular transvaginal, DIB e corno uterino sobre a expressão gênica de *PGR1* (P = 0,02). A ausência de DIB associado a ATFV4 aumentou a expressão gênica de *PGR1* no corno contralateral, nos animais submetidos à AFTV4. O dia da AFTV e a presença do DIB não afetaram a expressão relativa de *PGR1* no corno ipsolateral (P > 0,05).

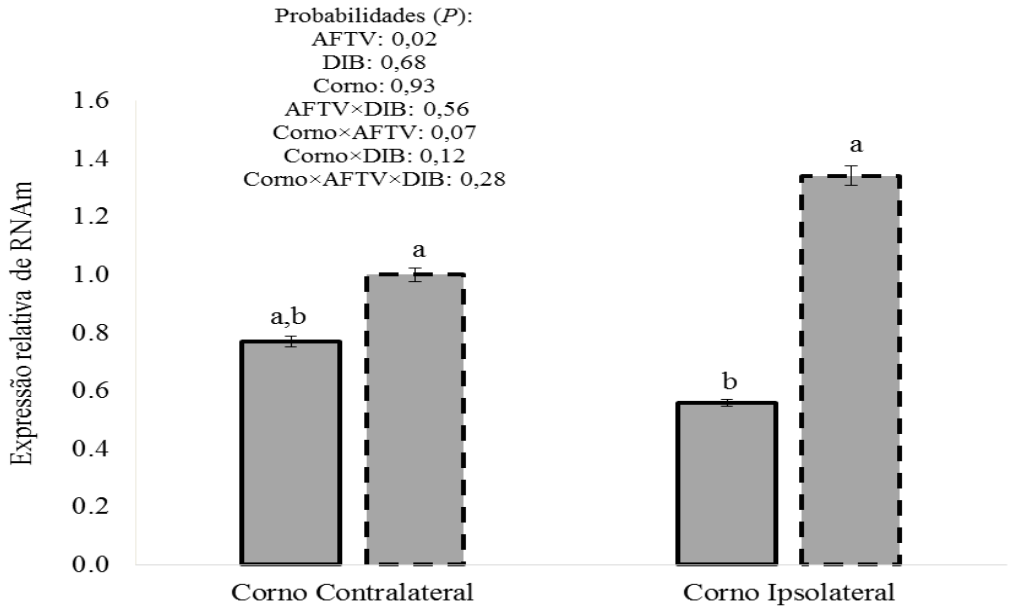
Figura 11 - Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica do *PGR2*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. S, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1).

Não houve efeito significativo nas variáveis estudadas na expressão relativa do *PGR2* ($P > 0,05$).

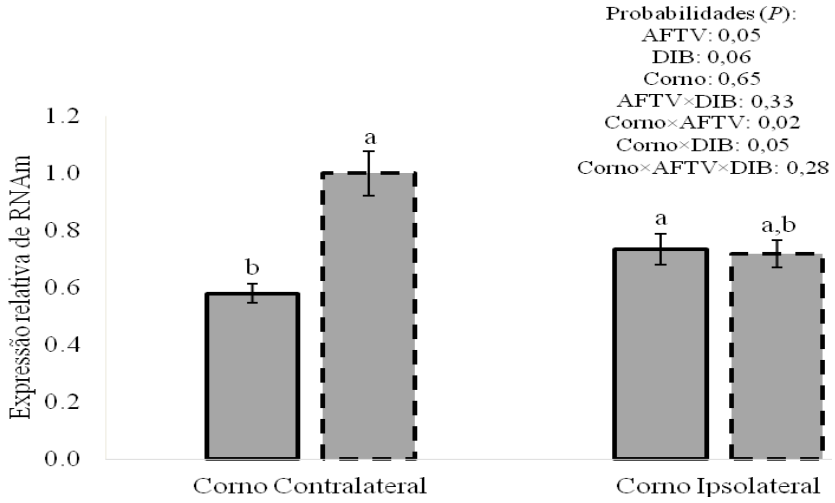
Figura 12 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) sobre a expressão gênica de *PGR3*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. S, 2017)
Legenda: AFTV1 (■) e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento com AFTV4 no corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve uma interação entre os efeitos do corno e dia da AFTV (*P* = 0,07) sobre a expressão de *PGR3*. No corno ipsolateral, AFTV1 reduziu a expressão de *PGR3*, em relação à AFTV4. No corno contralateral o dia da AFTV não afetou a expressão deste gene (*P* > 0,05).

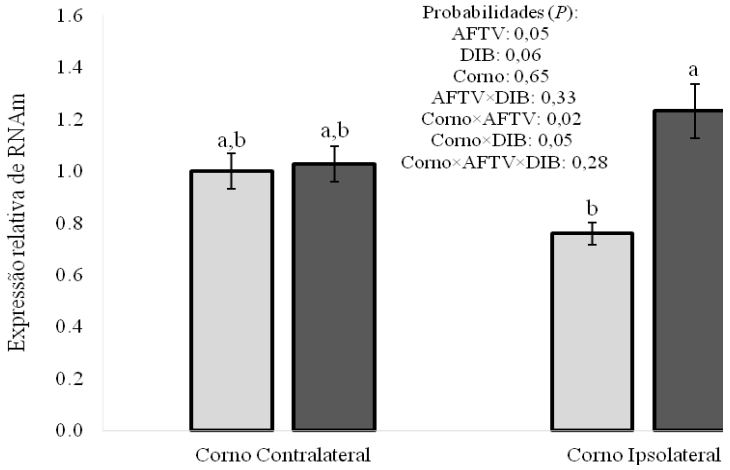
Figura 13 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) sobre a expressão gênica de PGRMC1, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legenda: AFTV1 (■) e AFTV4 (□). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento com AFTV4 no corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente (*P* ≤ 0,05).

Houve uma interação entre AFTV e corno uterino (*P* = 0,02) sobre a transcrição de *PGRMC1*. Ocorreu diminuição na expressão relativa de *PGRMC1* no corno uterino contralateral submetido à AFTV1, em relação à AFTV4. No corno ipsolateral, o dia da AFTV não afetou a expressão deste gene (*P* > 0,05).

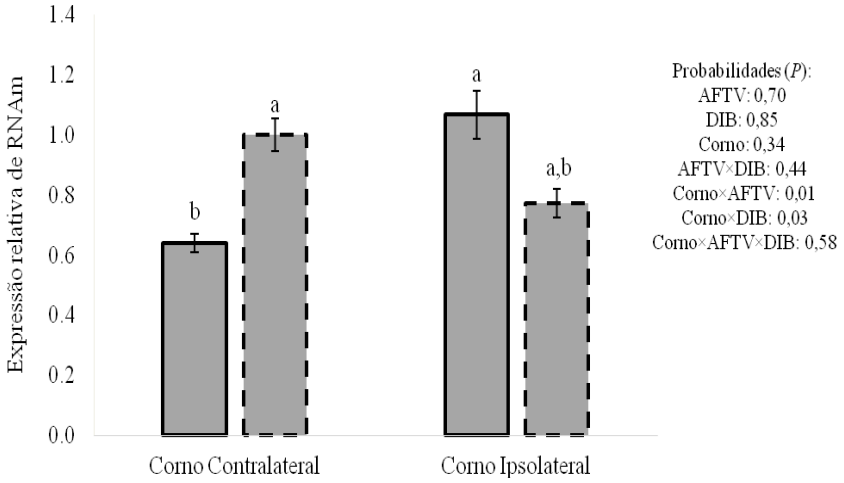
Figura 14 – Efeito do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *PGRMC1*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legenda: sem DIB (□) e com DIB (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB no contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre os efeitos de DIB e corno uterino sobre a expressão relativa de *PGRMC1* (P = 0,05; Figura 14). No corno contralateral, o DIB não afetou a expressão relativa deste gene (P > 0,05). Já no corno ipsolateral, o DIB aumentou a expressão gênica relativa de *PGRMC1* ($P \leq 0,05$).

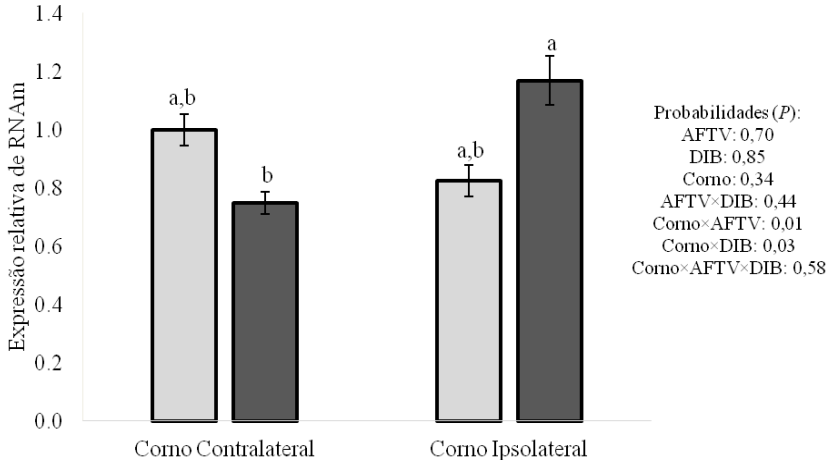
Figura 15 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) sobre a expressão gênica de *PGRMC2*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legenda: AFTV1 (□) e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento com AFTV4 no corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve uma interação entre os efeitos do dia da AFTV e corno uterino (P = 0,01) sobre a expressão de *PGRMC2*. Onde, no corno contralateral AFTV1 reduziu a expressão relativa desse gene em comparação à AFTV4 ($P \leq 0,05$). No corno ipsolateral, o dia da AFTV não afetou a expressão gênica relativa de *PGRMC2*. Além disso, na ausência do DIB, a expressão deste gene foi maior no corno ipsolateral em relação ao corno contralateral ($P \leq 0,05$).

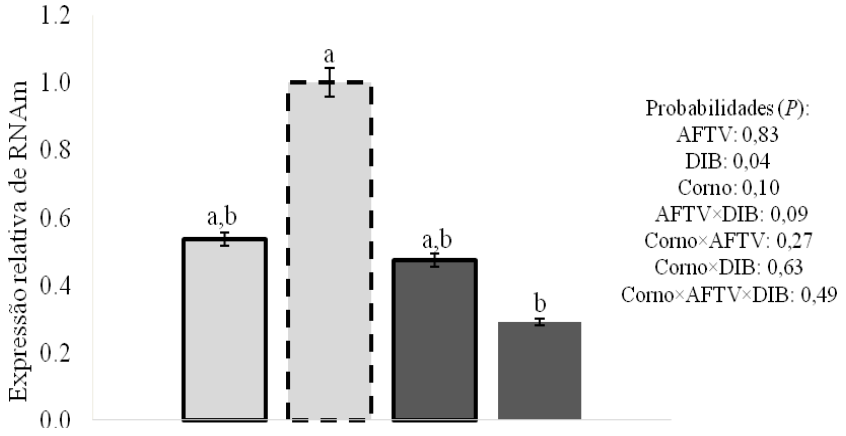
Figura 16 Efeito do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *PGRMC2*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legenda: sem DIB (□) e com DIB (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB no corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre DIB e corno uterino sobre a expressão relativa de *PGRMC2* (P = 0,03; Figura 16). Na presença do DIB, a expressão relativa deste gene foi maior no corno ipsolateral do que no corno contralateral ($P \leq 0,05$). Na ausência do DIB, a expressão gênica de *PGRMC2* foi similar nos dois cornos uterinos ($P > 0,05$).

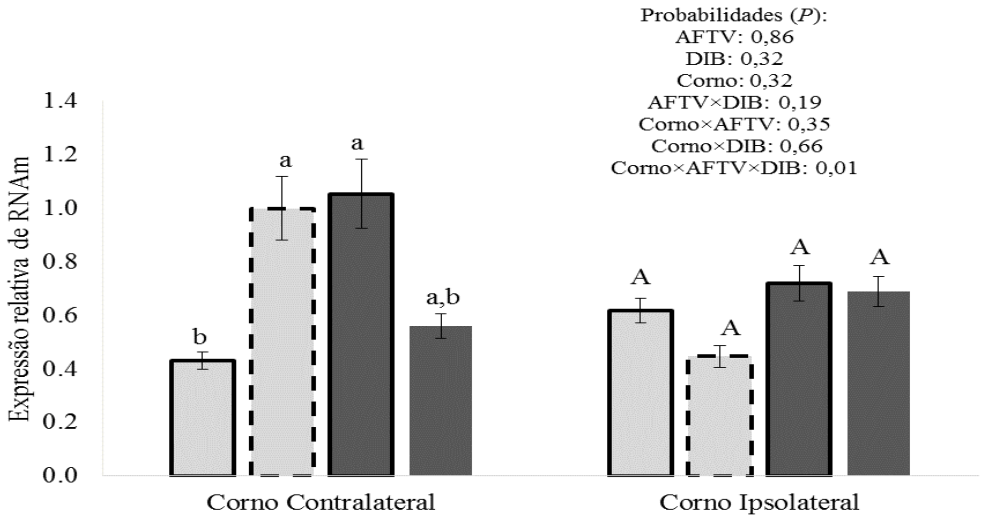
Figura 17 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica do fator de crescimento vascular endotelial (*VEGFA*), em novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre os efeitos de dia da AFTV e DIB sobre a expressão relativa de VEGFA (P = 0,09). A ausência do DIB e presença de AFTV4 aumentou a expressão relativa desse gene em relação ao tratamento com DIB e AFTV4 ($P \leq 0,05$), não diferindo dos demais ($P > 0,05$).

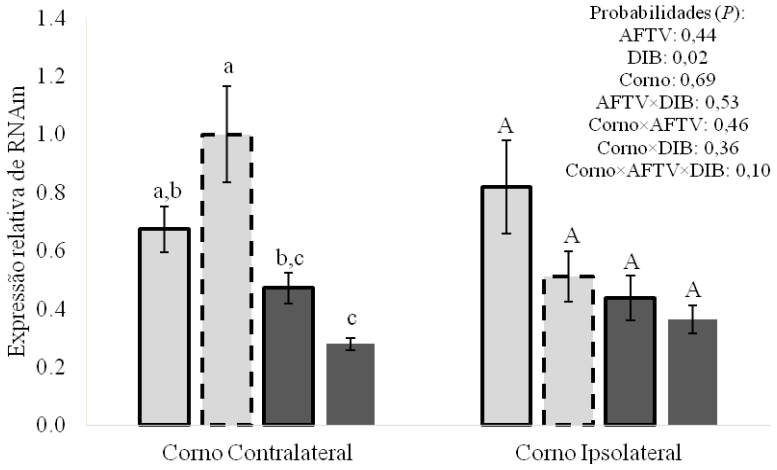
Figura 18 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de FGF2, nos diferentes cornos uterinos de novilhas nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legenda: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 do corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas e maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre o as estratégias hormonais nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre os efeitos de AFTV, DIB e corno uterino sobre a expressão gênica de *FGF2* (P = 0,05; Figura 18). No corno ipsolateral, os tratamentos não afetaram a expressão deste gene (P > 0,05). No corno contralateral, no entanto, AFVT4 aumentou a expressão de *FGF2*, em relação à AFTV1 ($P \leq 0,05$), nos animais que não receberam DIB. Da mesma forma, a inclusão do DIB, nos animais que passaram pela AFTV1 aumentou a expressão gênica de *FGF2* ($P \leq 0,05$), no corno contralateral.

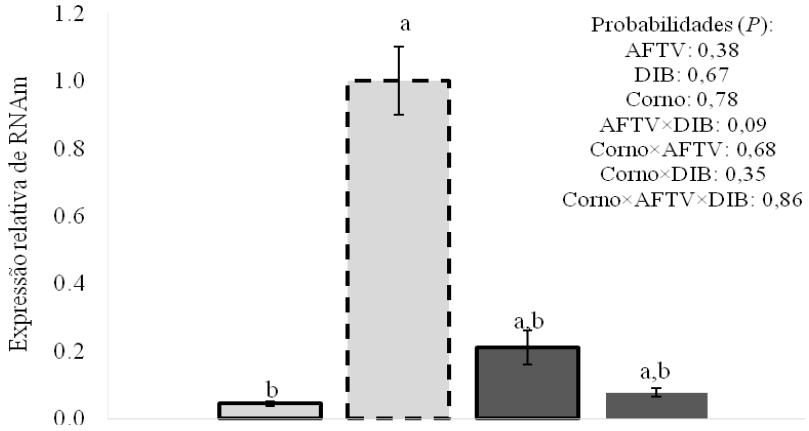
Figura 19 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *FGFR2*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Tratamentos: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 do corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas e maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre o as estratégias hormonais nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação tripla (Corno×AFTV×DIB; Figura 19) sobre a expressão de FGFR2 (P = 0,10). No corno contralateral a presença do DIB e AFTV4 reduziu a abundância de transcritos para o *FGFR2* em relação à AFTV4 sem DIB ($P \leq 0,05$). No corno ipsolateral, os tratamentos não afetaram a expressão gênica de *FGFR2* (P > 0,05).

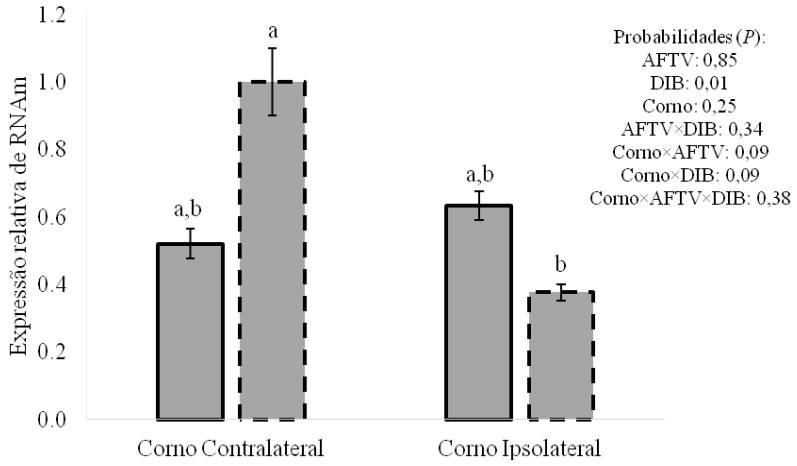
Figura 20 Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *MMP9*, em novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (▫); sem DIB e AFTV4 (▫); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Houve uma interação entre AFTV e DIB (P = 0,01) sobre a transcrição de *MMP9*. Na ausência de DIB, AFTV4 aumentou a expressão relativa desse gene, em relação à AFTV1 ($P \leq 0,05$).

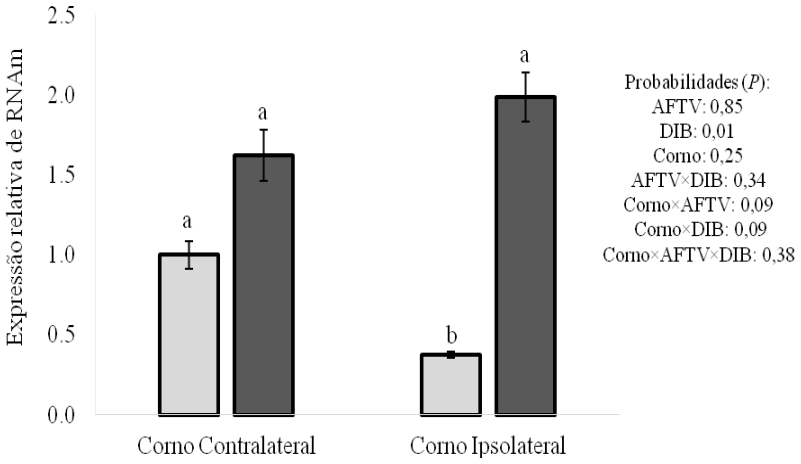
Figura 21 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) sobre a expressão gênica de AQP4, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legenda: AFTV1 (▫) e AFTV4 (▫). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento com AFTV4 (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve uma interação entre os efeitos de corno uterino e AFTV (P = 0,09) sobre a expressão de *AQP4*. No corno uterino contralateral a expressão de *AQP4* foi maior quando os animais foram submetidos à AFTV4 do que naqueles submetidos à AFTV4 no corno ipsolateral ($P \leq 0,05$), não diferindo dos demais ($P > 0,05$).

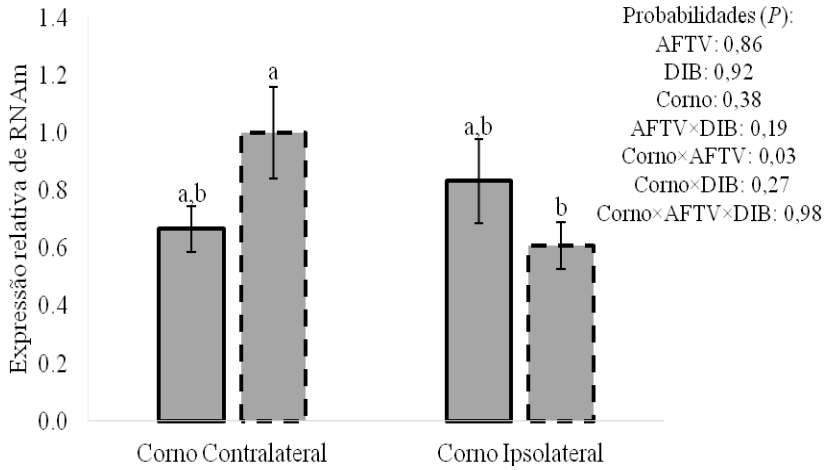
Figura 22 – Efeito do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *AQP4*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legenda: sem DIB (▭) e com DIB (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento com DIB no corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Além disso, houve uma interação entre o corno uterino e o DIB sobre a expressão de *AQP4* (P = 0,09). A ausência do DIB no corno ipsolateral reduziu a expressão relativa deste em relação aos demais tratamentos ($P \leq 0,05$).

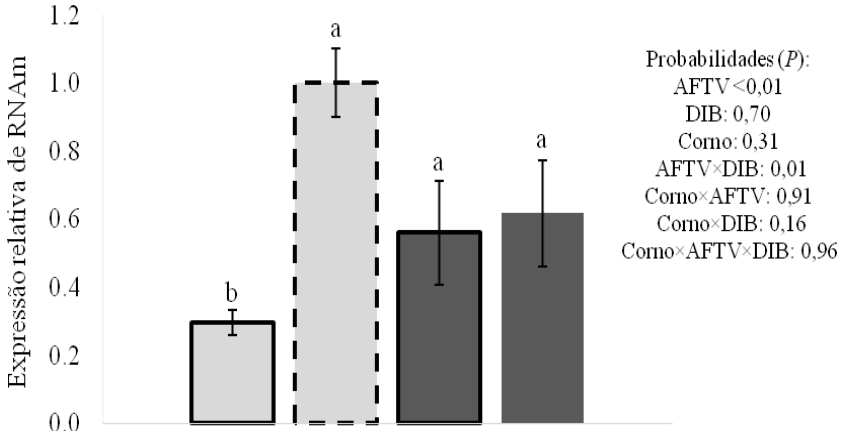
Figura 23 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) sobre a expressão gênica de *MUC1*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: AFTV1 (▭) e AFTV4 (▭). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento com AFTV4 no corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre os efeitos de corno uterino em e dia da AFTV ($P = 0,03$) sobre a expressão de *MUC1*. Nos animais submetidos à AFTV4, a expressão deste gene foi maior no corno contralateral do que no corno ipsolateral ($P \leq 0,05$).

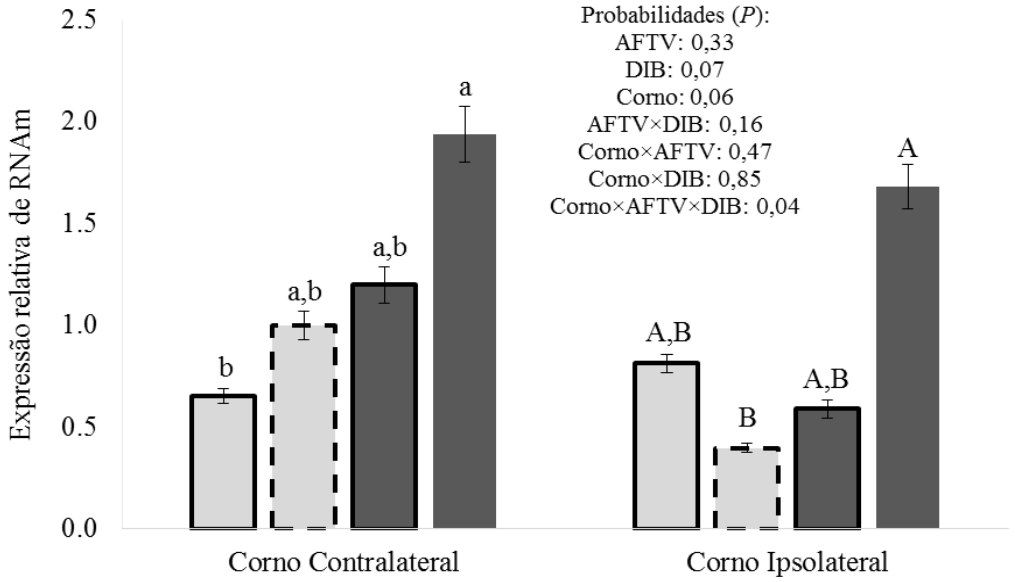
Figura 24– Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *WNT5A*, em novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (▭); sem DIB e AFTV4 (▭); com DIB e AFTV1 (▭) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Houve uma interação entre os efeitos de dia da AFTV e DIB (P = 0,01) sobre a expressão de *WNT5A*. Os animais submetidos ao tratamento com AFTV1 e sem DIB apresentam menores expressão relativa desse gene do que os demais tratamentos ($P \leq 0,05$).

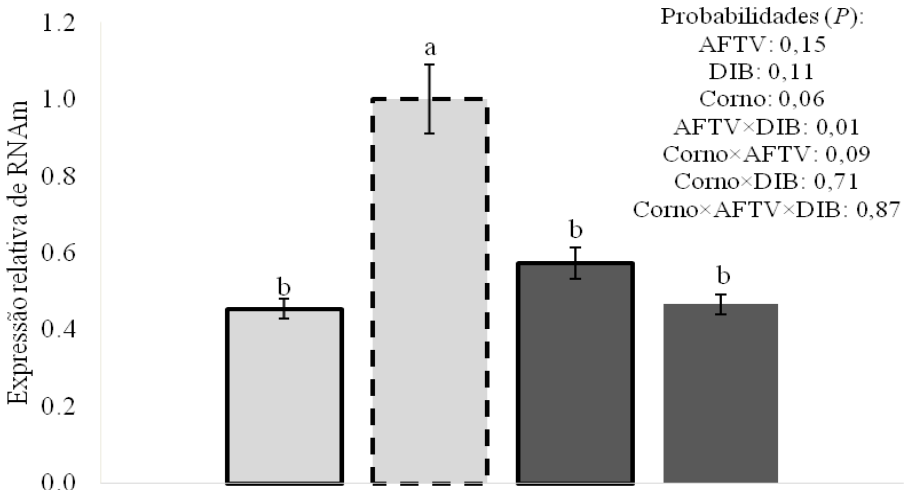
Figura 25- Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *LPL*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Tratamentos: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB e AFTV4 do corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas e maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre o as estratégias hormonais nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre os efeitos de AFTV, DIB e corno sobre a expressão gênica de *LPL* (P = 0,05; Figura 25). No corno contralateral a ausência de DIB e presença de AFTV1, reduziu a expressão de *LPL* em relação a presença de DIB ($P \leq 0,05$). Enquanto que no corno contralateral a expressão relativa desse gene aumentou na presença de DIB e AFTV4 ($P \leq 0,05$), não diferindo dos demais tratamentos ($P > 0,05$).

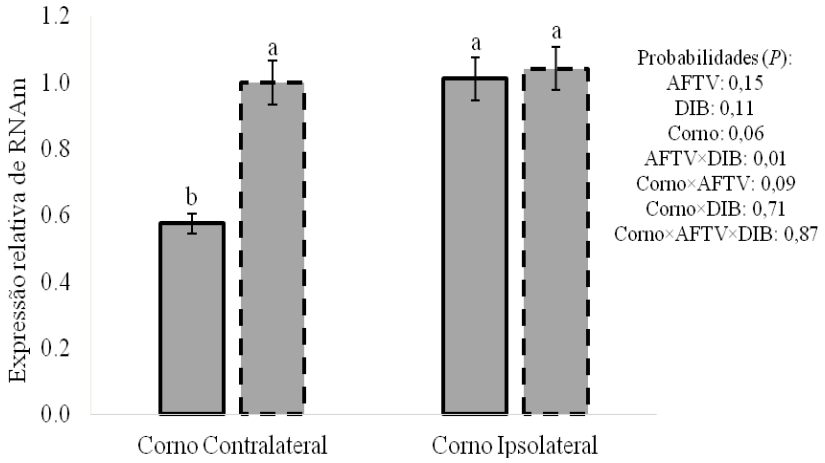
Figura 26 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) e do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *SLC2A1*, em novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Houve uma interação entre os efeitos do dia da aspiração folicular e DIB (P = 0,01) sobre a expressão de *SLC2A1*. Animais submetidos à AFTV4, sem DIB apresentaram maior expressão deste gene que os animais dos demais grupos ($P \leq 0,05$).

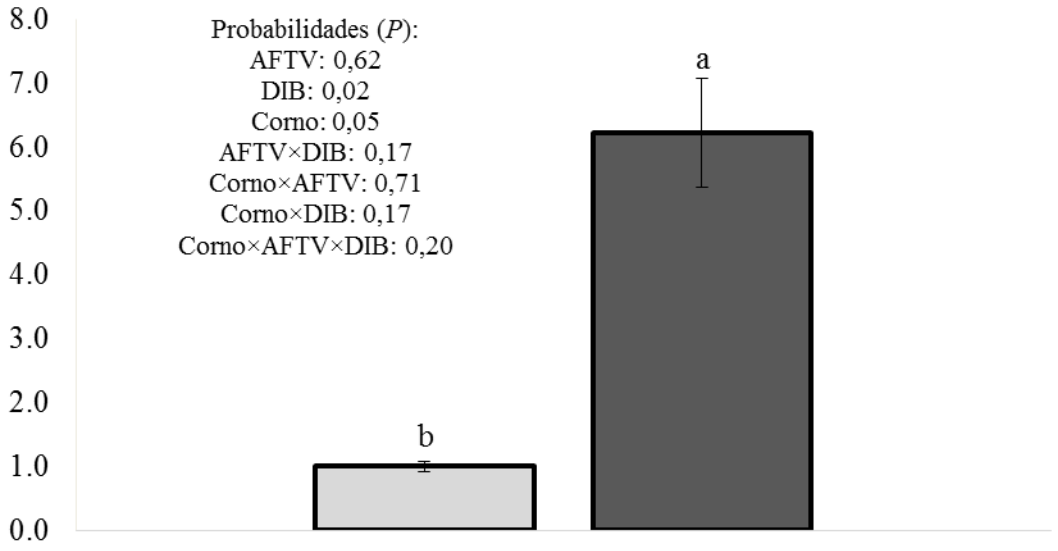
Figura 27 – Efeito da aspiração folicular transvaginal (AFTV) sobre a expressão gênica de *SLC2A1*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais AFTV1 (■) e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento com AFTV4 no corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve uma interação entre os efeitos da localização do corno uterino em relação ao folículo dominante e dia da AFTV (P = 0,09) sobre a expressão de SLC2A1. Os animais submetidos à AFTV1 apresentaram menor expressão deste gene no corno contralateral do que no corno em relação aos demais tratamentos ($P \leq 0,05$).

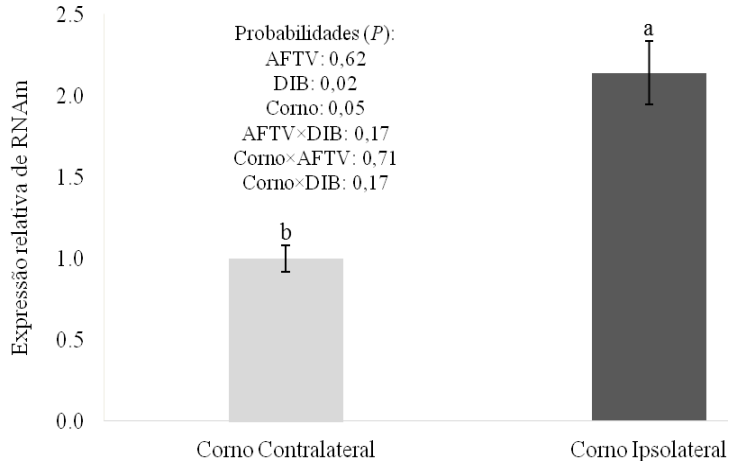
Figura 28 - Efeito do implante de liberação lenta de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *SERPINA14*, em novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. S, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB (▭) e com DIB (▬). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado como referência o tratamento sem DIB (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

O DIB aumentou a expressão gênica de *SERPINA14*, independentemente do corno uterino e da AFTV (P = 0,05; Figura 28).

Figura 29 - Efeito do corno uterino sobre a expressão gênica de *SERPINA14*, em novilhas Nelore pré-púberes de acordo com a localização do corno uterino

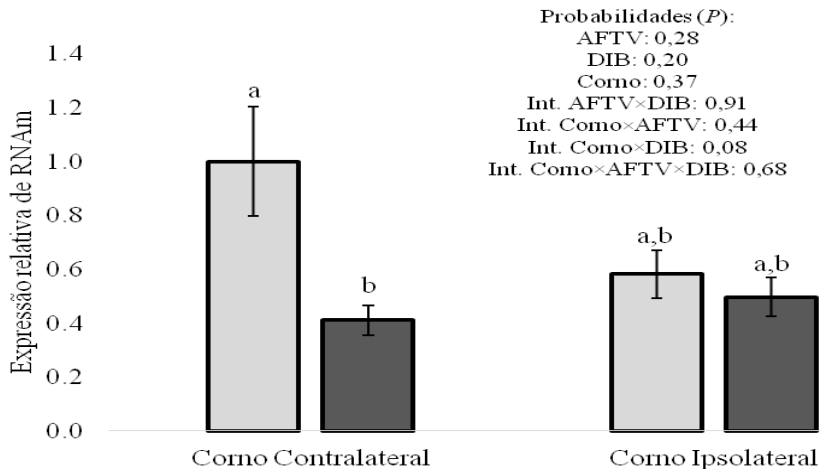


Fonte: (SOUSA, R. T, 2017).

Legenda: Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado o corno como referência contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Adicionalmente, a expressão relativa de *SERPINA14* também foi maior no corno ipsolateral do que no corno contralateral (P = 0,05; Figura 29).

Figura 30 – Efeito do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *OXTR*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes

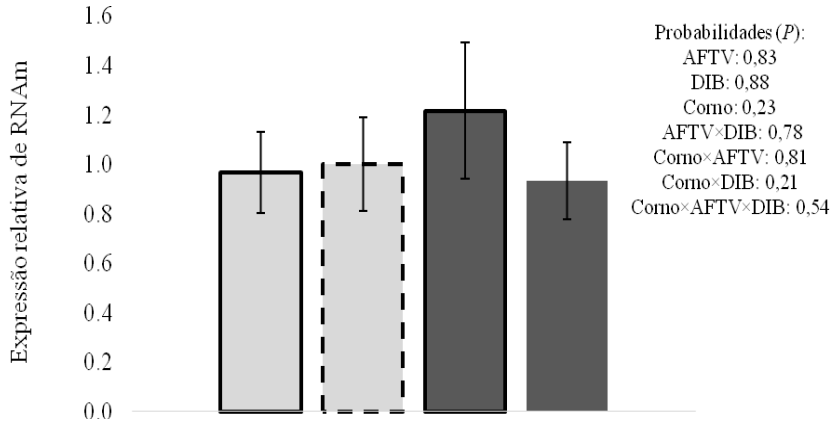


Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)

Legendas: Estratégias hormonais sem DIB (▭) e com DIB (▬). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado o tratamento sem DIB no corno contralateral (expressão=1). Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas nos cornos contra e ipsolateral, respectivamente ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre os efeitos de corno e DIB sobre a transcrição gênica de *OXTR* (P= 0,08; Figura 31). No corno contralateral, o DIB reduziu a expressão relativa do *OXTR* ($P \leq 0,05$).

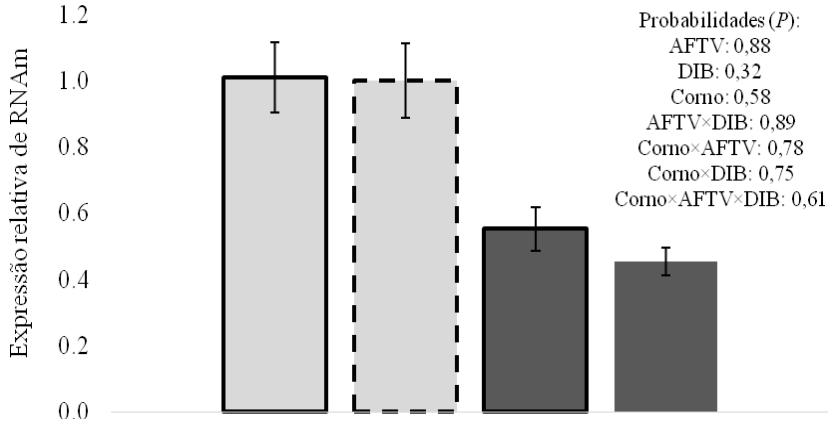
Figura 31 - Efeito do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *IGF2R*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV-4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1).

Não houve efeito significativo nas variáveis estudadas sobre a expressão relativa do gene avaliado ($P > 0,05$).

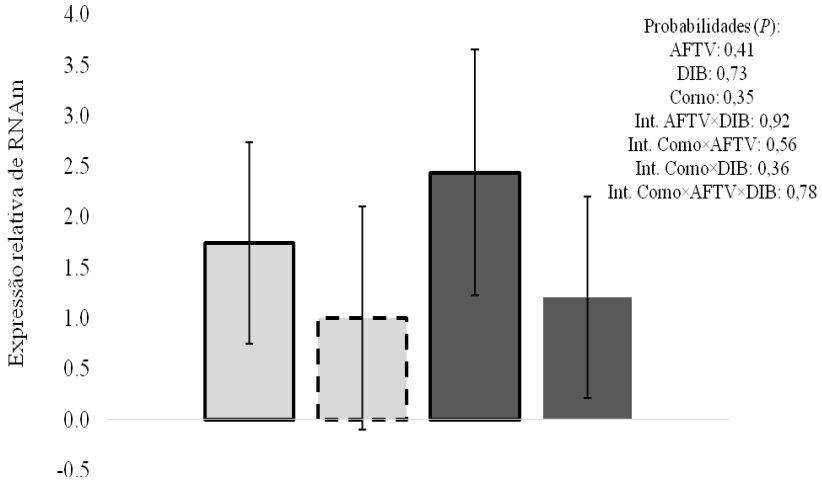
Figura 32 - Efeito do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *LTF*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)
Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV-4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1).

Não houve efeito significativo nas variáveis estudadas sobre a expressão relativa do *LTF* ($P > 0,05$).

Figura 33 - Efeito do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) sobre a expressão gênica de *MMP2*, nos diferentes cornos uterinos de novilhas Nelore pré-púberes.



Fonte: (SOUSA, R. T, 2017)

Legendas: Estratégias hormonais: sem DIB e AFTV1 (□); sem DIB e AFTV4 (□); com DIB e AFTV1 (■) e, com DIB e AFTV4 (■). Para o cálculo da expressão relativa, foi considerado o tratamento sem DIB e AFTV4 (expressão=1).

Não houve efeito significativo das variáveis estudadas, sobre a expressão relativa do gene codificador da MMP2 ($P > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Nesse tópico serão abordados alguns mecanismos moleculares associados a modulação de receptores de estrógenos (E2) e progesterona (P4) e suas relações com genes voltados ao desenvolvimento endometrial e a receptividade do futuro concepto neste tecido, além das implicações dessa fisiologia no posterior sucesso reprodutivo e produtivo de novilhas Nelore.

O aumento do peso do útero e de suas relações com outras variáveis como; peso vivo, peso metabólico, carcaça quente e de carcaça fria das novilhas Nelore pré-púberes (Tabela 4), submetidas ao implante de liberação sustentada de progesterona (DIB), levou ao questionamento da possível relação dessa alteração fenotípica, com as vias moleculares associadas, a proliferação, diferenciação e secreção celular no tecido endometrial. Adicionalmente, a essas evidências, averiguar qual seria o impacto da suplementação exógena de P4, em associação com a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom em diferentes dias, na modulação da fisiologia endometrial em novilhas Nelore pré-púberes.

O aumento no peso uterino das novilhas, ocasionado pelo DIB, talvez seja uma consequência de maiores ações de P4, efetuada principalmente através dos seus receptores componentes de membrana, desencadeando um possível maior desenvolvimento, e aumento da atividade secretória nas células glandulares do endométrio (SPENCER et al., 2004; KHATIB et al., 2009; LEDGARD; MEIER; PETERSON, 2011). Ademais, um maior fluxo de água mediado por aquaporinas, (AGRE, 2016) também por intermédio da progesterona pode ter contribuído para a alteração no peso uterino.

Em cordeiras da raça Corrideale, a aplicação de progesterona injetável por via intramuscular aumentou o peso do útero desses animais (MEIKLE et al., 2001). Sá Filho et al. (2008) relacionaram o aumento desenvolvimento uterino de novilhas Nelore, com o a chegada da puberdade, onde enfatizaram o efeito recorrente da estimulação exercida pelo aumento nas concentrações de progesterona plasmática sobre o útero desses animais. Dentro desse contexto, a elevação da concentração plasmática de progesterona nos animais submetidos ao DIB nesse estudo (Figura 4) pode ter mimetizado as concentrações plasmáticas de progesterona de animais em puberdade (DAY; ANDERSON, 1998) trazendo benefícios no desenvolvimento uterino.

Nesse sentido, Sá Filho et al. (2015) dosaram a concentração circulante de progesterona em novilhas Nelore pré-púberes para avaliar a flutuação desse hormônio através

do uso de dispositivos novos de liberação sustentada de progesterona (CIDR1) ou usados (CIDR4) implantados intravaginalmente por 10 dias. Estes autores verificaram que ambos os dispositivos foram capazes de sustentar o nível de P4 acima de 1,0 ng/mL por no mínimo 7 dias, mas o grupo que recebeu os dispositivos novos obteve maior concentração plasmática de P4. Nesse aspecto vale ressaltar que dispositivos de progesterona utilizados na indução de puberdade em novilhas Nelore devem ser previamente utilizados em vacas adultas, já que altas doses desse hormônio podem bloquear o crescimento dos folículos, comprometendo a ovulação (BARUSELLI 2007; PRADO et al., 2009). Devido a essas recomendações, nesse estudo optou-se pela utilização de implantes de reuso, com o intuído de favorecer a fisiologia do endométrio, sem comprometer a fisiologia do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal.

Além da P4, o 17 β estradiol (E2) é um importante componente no desenvolvimento endometrial, principalmente em mecanismos relacionados a proliferação celular (RAMOS et al., 2014; RAMOS et al., 2015; ARAÚJO et al., 2015; SPONCHIADO, 2015; FRANÇA et al., 2015). O E2 é produzido predominantemente pelas células da granulosa dos folículos ovarianos, tendo suas concentrações aumentadas, principalmente durante as fases de seleção e dominância folicular (DIELEMAN; BEVERS, 1987; XU et al., 1995; KINDER et al., 1996; KULICK et al., 1999; GUINTHER et al., 2000; KOMAR et al., 2001). Diante desses aspectos, a taxa de crescimento e diâmetro dos folículos, tornam-se um bom preditor dos níveis de concentração circulante de estrógenos.

Partindo desse pressuposto, nesse estudo pode ter ocorrido uma inversão nas concentrações esperadas de E2, visto que, maiores diâmetros foliculares (Figura 5), foram observados nas novilhas submetidas a aspiração folicular transvaginal um dia antes do abate (AFTV1), em detrimento daquelas submetidas a aspiração folicular quatro dias antes (AFTV4). Essas diferenças no diâmetro folicular, ocasionalmente pode ter levado a uma modulação diferenciada na transcrição dos genes alvo, que serão discutidos a seguir.

A expressão e modulação dos diferentes receptores de progesterona e estrógenos acoplados ou não a proteína G, são reportadas nas mais diversas células que compõe o útero humano, e de outras espécies (PERROT-APPLANAT et al., 1985; CLARKE et al., 1987; PRESS; GREENE, 1988; PRESS et al., 1988; GARCIA et al., 1998; LESSEY et al., 1998; PRESS), existindo alguns relatos de expressão no endométrio e oviduto de vacas Nelore cíclicas (LUCIANO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2015; SPONCHIADO, 2015; GONELLA-DIAZA et al., 2016). Porém, a expressão destes no tecido endometrial de novilhas Nelore pré-púberes ainda é desconhecida pela literatura científica.

A P4 e o E2 regulam o metabolismo celular, e as subsequentes respostas biológicas no desenvolvimento, crescimento e diferenciação das células do endométrio em vacas Nelore (LUCIANO et al., 2011; MESQUITA et al., 2014; RAMOS et al., 2014; MESQUITA et al., 2015; RAMOS et al., 2015; ARAÚJO et al., 2015; SPONCHIADO; FRANÇA et al., 2015). No tecido endometrial, as ações do E2 são mediadas principalmente pela transativação mediada através da ligação desse esteroide ovariano, às duas formas da proteína receptora para o estrógeno, denominadas de receptor estrogênico α (ESR1) e β (ESR2) (WANG et al., 1999); ou por meio do receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER) (FILARDO et al., 2000). Sendo que, no endométrio bovino, os efeitos proliferativos celulares mediados pelo E2, ocorrem principalmente por meio da interação deste com o ESR1 e GPER. Em contrapartida o ESR2 se comporta como um modulador do ESR1, apresentando efeito anti-proliferativo no útero em oposição a ação do ESR1 (WEIHUA et al., 2000). Ao ligar-se ao ESR1 ou GPER, o E2 aumenta a proliferação e altera as propriedades celulares, modulando a transcrição dos genes responsivos a ele (PARKER, 1993; RAZAND et al., 1999; PEDRAM; RAZANDI; LEVIN, 2006; PROSSNITZ; BARTON, 2011).

Em fêmeas cíclicas de várias espécies, o aumento do E2 durante o estro, estimula a expressão de seus próprios receptores no endométrio, enquanto que o aumento progressivo nas concentrações de P4, durante o diestro diminui a expressão dos receptores de E2. Além disso, a exposição continua do útero a P4, leva a supressão dos receptores intracelulares de progesterona (PGRs) (OTT et al., 1993; GEISERT et al., 1994; OKUMU et al., 1999; SPENCER; BAZER, 2002; MARTIN et al., 2008; HARTT et al., 2005).

Os animais que receberam o DIB, independentemente da AFTV, apresentaram expressões gênicas de *ESR1* semelhantes (Figura 6). Já a ausência do DIB a AFTV1 aumentou a expressão deste gene no corno ipsolateral. É reportado que as concentrações de E2 aumentam a expressão de seus receptores intracelulares tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BOOS et al., 1996; ROBINSON et al., 2001; OKUMU et al., 2010). Enquanto que altos níveis de P4 diminuem tanto a expressão de seus receptores intracelulares quanto os de E2 (SPENCER; BAZER, 1995; OKUMU et al., 2010). Estes resultados indicam que diferentes concentrações de hormônios esteroides, ocasionadas pelas estratégias hormonais, associadas a possíveis diferenças na anatomia vascular útero ovárica, nas regiões adjacentes e opostas ao ovário contendo o folículo dominante, alteram a abundância de genes do endométrio de novilhas Nelore em idades mais precoces, pré-puberdade.

Levando em consideração as possibilidades anteriormente citadas, no corno contralateral fica evidente o papel de maiores concentrações de P4, associadas a um possível menor fluxo de E2, na diminuição de transcritos desse gene. Enquanto que no corno ipsolateral, flutuações nas concentrações de E2, podem ter atuado como os maiores efetores na influência desse hormônio na abundância dos transcritos para o *ESR1*. Sponchiado (2015) demonstrou que maiores concentrações de E2, oriundas de folículos ovarianos de maior diâmetro, aumentou a expressão do *ESR1*, em comparação às vacas com folículos pré-ovulatórios menores.

Araújo et al. (2015) reportaram variações na transcrição de genes específicos modulados por hormônios esteroides ovarianos, no endométrio de vacas Nelore, em função do corno uterino. De acordo com Ginther, (1974), Ginther, (1976) e Lamond; Drost (1974) em animais cíclicos, as artérias ovarianas e uterinas adjacentes e opostas ao ovário contendo o corpo lúteo, distinguem-se em anatomia e fisiologia, sendo as anastomoses entre as ramificações da artéria uterina e ovariana significativamente mais proeminentes no lado ipsolateral ao corpo lúteo. Existem várias evidências que substâncias oriundas dos ovários, liberadas pelo fluxo venoso ovariano, e transferidas para o sangue arterial ovariano, podem atingir os ovidutos e a porção anterior e média dos cornos uterinos (McCRAKEN; SCHRAMM; EINER-JENSEN, 1984; EINER-JENSEN; HUNTER, 2005). Ghinther; Del Campo (1974) reportaram um aumento significativo de 0,4 mm em diâmetro no ramo uterino da artéria ovariana no lado ipsolateral ao corpo lúteo. Estes autores enfatizaram ainda que, essas mudanças são possíveis devido a dinamicidade das anastomoses, em relação a mudanças na vascularização de acordo com a localização da ovulação, em função dos esteroides ovarianos. Ainda, de acordo com esses autores, no ponto de vista fisiológico, essa proeminência ocorre devido a preparação do oviduto e corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo para a prenhez ou para suprir as necessidades sanguíneas do corpo lúteo mais vascularizado.

Stefaficzyc-Krzymowska et al. (1998) ao avaliar a concentração de progesterona e 17 beta estradiol em porcas do 12° ao 35° de prenhez, verificaram um aumento significativo nas concentrações desses hormônios, nos ramos da artéria proximal e distal ao ovário, em relação a veia jugular, concluindo que a elevação da concentração local de hormônios de origem ovárica, em relação ao sangue periférico é de grande importância para o reconhecimento materno da prenhez e implantação do embrião.

A ausência de DIB e a realização da AFTV1 levaram a um aumento na transcrição do gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) em relação a AFTV4, no corno

ipsolateral ao folículo dominante (Figura 9). O aumento da transcrição do *EGRF* em novilhas Nelore pré-púberes em condições de AFTV1 e baixas concentrações de progesterona no corno ipsolateral, pode favorecer a proliferação das células epiteliais luminais aumentando as chances de interação do epitélio endometrial com a trofectoderma do concepto ou até mesmo favorecer o revestimento epitelial das glândulas, que é um fator condicionante para a manutenção normal de posteriores atividades secretórias (LOSEL et al., 2008; GELLERSEN; FERNANDES; BROSENS, 2009; ULBRICH et al., 2009). Adicionalmente a esse achado, eventuais maiores concentrações de E2, nessa região, em razão de mecanismos anatômicas e fisiológicos de vascularização, similares aos que levaram ao aumento do *ESR1* nessas mesmas condições, podem também ter ocasionado o aumento na expressão relativa do *EGFR*.

O *EGFR* é caracterizado como uma glicoproteína transmembranária, com um domínio ligante extracelular, um domínio lipofílico transmembrana, e um domínio intracelular com atividade tirosina-quinase intrínseca. Ao ser ativado esse receptor desencadeia o recrutamento e a fosforilação de vários substratos intracelulares, levando à sinalização mitogênica (ALROY; YARDEN, 1997). Existem relatos na literatura que o ESR1 pode transcolar se para a membrana plasmática e interagir com o EGFR e esse complexo ao ser estimulado pelo 17 beta estradiol ativa as vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K-Akt), induzindo efeitos rápidos ou não genômicos do EGFR na proliferação celular do tecido alvo (DAUVOIS; WHITE; PARKER, 1993; RAZAND et al., 1999; PEDRAM; RAZANDI; LEVIN, 2006; LUCAS et al., 2008; PROSSNITZ; BARTON, 2011).

Estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, reportaram aumento na proliferação celular uterina mediada por EGFR, em resposta a estrógenos (MCLACHLAN, 1986; LINGHHAM et al., 1988; GARDNER et al., 1989; TOMOOKA; DIAUGUSTINE; MEND et al., 2016). Sanjoy et al. (1994) ao avaliarem diferentes aspectos biológicos do EGFR no útero de ratas ovariectomizadas, verificaram que a administração de E2 exógeno aumentou a presença do EGFR, como também a sua bioatividade, que foi verificada pelo aumento da atividade das proteínas quinases. Em mulheres, a expressão de *EGFR* aumenta principalmente no epitélio luminal e glandular, sobre efeito do E2 durante a fase proliferativa, reduzindo durante a fase secretória e menstrual (MOLLER et al., 2001).

No que diz respeito aos PGRs avaliados nesse estudo (Figura 10; Figura 11; Figura 12), resultados oriundos de células cultivadas *in vitro*, sugerem a atuação da PGR1 como inativador de transcrição aos efeitos da P4, junto ao gene específico (VEGETO et al., 1993;

KRAUS et al., 1995). Partindo desse pressuposto, o aumento da expressão do *PGR1* (Figura 10) induzida por menores concentrações plasmáticas de E2, e P4 no endométrio do corno uterino contralateral submetidos a AFTV4 e sem DIB, pode estar associada a ação deste, na repressão dos efeitos da progesterona sobre genes relacionados a proliferação e secreção celular nessa região. É reportado que o PGR2, apresenta uma função adicional da transativação específica, desempenhando um papel importante junto ao gene alvo, que pode ser ativada pelo PGR2 e não pelo PGR1. E mesmo que o domínio inibitório esteja presente nessas duas isoformas, esta atividade manifesta-se apenas no PGR1, sendo que o PGR2 apresenta uma região de transativação especifica nos genes responsivos a progesterona não presente na PGR1 (HORWITZ, 1992; GIANGRANDE; MCDONNELL, 1999).

Em células de mamíferos essas isoformas, podem ligar-se ao DNA, mediante diferentes combinações de dímeros: PGR1/PGR1, PGR2/PGR2, constituindo os homodímeros ou PGR1/PGR2, PGR2/PGR3, formando heterodímeros (WEI et al., 1990; DEMARZO et al., 1991; WEI et al., 1996; CONDON et al., 2006), além do tipo da isoforma do receptor, a reposta celular a P4, pode estar associada a alterações da razão entre as expressões de *PGR1*, *PGR2* e *PGR3*, e as diferenças funcionais entre as proteínas dessas isoformas, tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*, sugerindo que a expressão relativa das mesmas podem modular a resposta a P4 em diferentes populações celulares (WEI et al., 1990; GRAHAM; CLARKE, 1997; CONDON et al., 2001) o que suporta as evidências da função da maior abundância de transcritos do PGR1 na repressão dos efeitos biológicos da progesterona no corno contralateral ao folículo dominante em novilhas Nelore pré-púberes.

Alterações nas razões entre as diferentes isoformas do PGR no oviduto de galinhas durante o inverno, ou em aves mais velhas, resultaram em diminuição mensurável da atividade funcional do PGR (BOYD; SPELSBERG, 1979; BOYD-LEINEN et al., 1982). O aumento da expressão relativa do *PGR3* (Figura 12) no endométrio de ambos os cornos uterinos das novilhas submetidas a AFTV4 em relação a AFTV1 no contralateral, também pode ser um reflexo da redução, ou impedimento dos processos transicionais mediados pela P4, nessa área quando feita por intermédio de receptores dessa natureza, já que a PGR3 pode agir sequestrando a progesterona disponível na região citosólica, impedindo-a de ligar-se a PRG2 ou formando dímero com a PGR2, inibindo o poder de transcrição da PGR2 no gene alvo.

Henderson et al. (2001), Wei et al. (1990), Wei et al. (1996), Condon et al. (2006), Demarzo et al. (1991) demonstraram que a PGR3 está limitada à fração citosólica celular, não

possuindo capacidade de ligar-se a elementos responsivos hormonais do DNA. Entretanto essa isoforma tem a capacidade de complexar-se com a P4 disponível nessa região ou formar heterodímeros com a PGR2, inibindo as ações transcricionais desta. Garret et al. (1988) e Carter et al. (2008), ressaltaram que a diminuição da expressão das isoformas do PGR é um fator chave na expressão de diversos genes no endométrio, que contribuem para o desenvolvimento avançado do concepto em bovinos. Aumentos nas proporções de PGR3 em relação a PGR2 bloqueou a capacidade da PGR2 em manter a quiescência de células miometriais humanas cultivadas em laboratório (CONDON et al., 2006). No entanto não foram encontradas diferenças estatísticas entre as estratégias hormonais na expressão relativa do PGR2, nesse estudo.

Além da expressão das isoformas dos receptores de P4 responsáveis pelos efeitos clássicos deste hormônio, foi verificado nesse estudo uma modulação na expressão relativa dos receptores de progesterona componentes de membrana 1 (*PGRMC1*) e 2 (*PGRMC2*) no endométrio de novilhas Nelore pré-púberes (Figuras 13, 14, 15 e 16). Onde dependendo do corno uterino avaliado, tanto o DIB quanto a AFTV afetaram a expressão desses genes.

O *PGRMC1* e *PGRMC2* são expressos ao longo do trato reprodutivo em fêmeas de várias espécies, no período pré e pós implantacional, desempenhando um papel extremamente importante na homeostase, e funcionamento normal da fisiologia reprodutiva nesses tecidos (PELUSSO et al., 2006; KOWALIK et al., 2008; RAMBANGS et al., 2008; ZHANG et al., 2008; LUCIANO et al., 2010; LUCIANO et al., 2011; WU et al., 2011; THAIR et al., 2012; SAINT-DIZIER et al., 2012; SLONINA et al., 2012; KOWALIK et al., 2013; FENG et al., 2014). Considerando essas evidências, a expressão relativa dos genes codificadores dos dois tipos de receptores de membrana de progesterona nesse estudo, pode ser um indicativo da disponibilidade desses receptores para modulação de rotas moleculares alternativas, a PGR2, em ações relacionadas à homeostase da fisiologia endometrial, e ao favorecimento de condições adequadas para a implantação embrionária na região anatômica com o ambiente hormonal mais favorável.

Em um recente estudo realizado por CLARCK et al. (2016) foi demonstrado que, o silenciamento dos genes codificadores do PGRMC1 e PGRMC1 no trato reprodutivo de ratas, ocasionou formação de cistos no endométrio, subfertilidade e senescência prematura do trato reprodutivo. Em vários organismos o PGRMC1 e PGRMC2 estão envolvidos em diversos processos celulares relacionados a reprodução, incluindo mitose (LIU et al., 2009; GRIFFIN et al., 2014), meiose (LUCIANO et al., 2010; TERGARZI et al.,2016, LUCIANO et al.,

2016), metabolismo de esteroides (HUGUES et al., 2007; KIMURA et al., 2012), sobrevivência celular (PELUSO et al., 2006; PELUSO et al., 2010), transcrição (PELUSO et al., 2010; PELUSO et al., 2012), angiogenese (SWIATEK et al., 2007; NEUBAUER et al., 2009), regulação imune (MAEDA et al., 2013) e hematopoese (PIEL et al., 2016).

Considerando esses fatores, o aumento diferencial da expressão relativa do *PGRMC1* e *PGRMC2*, nos cornos contra e ipsolateral em resposta a AFTV ou DIB, podem estar associados a vias fisiológicas diversas, visando suprir necessidades celulares distintas nessas regiões anatômicas.

Coincidentemente o fator de crescimento vascular endotelial (*VEGFA*; Figura 17) teve sua expressão relativa aumentada, em condições hormonais semelhantes, às que levaram ao aumento da transcrição para o *PGRMC1* (Figura 13) e *PGRMC2* (Figura 15) no corno contralateral. Neubauer et al. (2009) demonstrou que a ativação do PGRMC1 pela progesterona conduz a um aumento no nível intracelular de Ca^{2+} e à subsequente ativação da cascata da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), resultando em ativação da transcrição do gene *VEGFA.*

O VEGFA quando estimulado por hormônios esteroides, possui efeito local no endométrio, atuando na angiogênese, remodelamento vascular e migração de células endoteliais (HIDER et al., 1996; GEVA; JAFFE, 2000; FERRARA et al., 2003;). Sendo as modificações cíclicas do endométrio dependente das flutuações no fluxo sanguíneo causados pela vasodilatação e alterações na permeabilidade celular (GIUDICE, 1996; PERROT-APPLANAT et al., 1994; LECCE et al., 2001; HERYANTO; LIPSON; ROGERS, 2003).

Este fator de crescimento vascular é encontrado no epitélio glandular e estroma endometrial (CHARNOCK et al., 1993; SHIFREN et al., 1996). Onde tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em sinergismo com o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), presente na matriz extracelular (MEC) das células estromais, possui a capacidade de remodelar a vascularização no endométrio (SMITH, 2001, PEPPER et al., 1992; SCHEEBERGER et al., 1997; PEPPER et al., 1998). No estroma endometrial os constituintes da MEC são sintetizados principalmente pelos fibroblastos, e a partir de então são distribuídos em uma rede organizada em íntima associação com a superfície dos fibroblastos (YAYON et al., 1991; KAN et al., 1993; REILAND et al., 1993; HOROWITZ et al., 1998; FAHAM et al., 1996; IOZZO et al., 1998; SELIKE et al., 1998; BAUERSACHS et al., 2005).

O FGF2 em si, também demonstrou ter uma alta afinidade por proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) associadas a superfície celular e MEC, esses cofatores são

essenciais nos processos de adesão da célula a matriz, nos sistemas de reconhecimento de célula-célula, bem como nas interações entre FGF2 e seu receptor (FGF2R), estimulando a transdução de sinal e regulando a transcrição gênica. *In vitro* o FGF2 comporta-se com um potente mitógeno em células endoteliais vasculares e fibroblastos (MOSCATELLI et al., 1986a; KLEIN et al., 1993, 1996). Em células endoteliais *in vivo*, o FGF2 é capaz de induzir um fenótipo angiogênico, verificado através do aumento da proliferação e migração celular, produção de proteinases e expressão de integrinas específicas (MOSCATELLI et al., 1986; BASILICO; MOSCATELLI, 1992; BIKFALVI et al., 1997; KLEIN et al., 1993, 1996). Quantidades significativas de FGF2 foram encontrados associados a matriz extracelular de culturas de células *in vitro* (VLODAVSKI et al., 1987; BASHKIN et al., 1989; FLAUMENHAFT et al., 1989; ROJELI et al., 1989; XIAN et al., 2010). Graziano et al. (1998) demonstraram a capacidade de sinergismo entre o FGF2 e VEGF como indutores de angiogênese, em diferentes células endoteliais vasculares através de mecanismos autócrinos e parácrinos, onde a adição de FGF2 recombinante a células endoteliais em cultura ou a regulação positiva do FGF2 endógeno, aumentou a expressão de *VEGFA*, evidenciando o papel deste último como importante mediador da angiogênese induzida por FGF2 através da interação com componentes da MEC.

No corno contralateral, dentre os animais que receberam a aplicação do DIB, aqueles submetidos à AFTV4 apresentaram maior expressão gênica de *FGF2* (Figura 18) do que os submetidos a AFTV1 sem DIB. Como destacado anteriormente a AFTV4 reduziu o diâmetro folicular, e possivelmente as concentrações de estrógenos. Possivelmente, a presença de menores diâmetros foliculares pode estar associada, a processos relacionados ao remodelamento vascular no corno contralateral de novilhas Nelore pré-púberes. Suzuki et al. (1996) reportaram que em células vasculares, o estrógeno modula a lesão vascular aguda e o desenvolvimento de outras formas de patologia vascular e quando em altas concentrações o estrógeno inibiu a expressão e ação biológica do *FGF2*.

A expressão do receptor (*FGFR2*) de *FGF2* (Figura 19) foi aumentada em menores concentrações de progesterona, no corno contralateral das novilhas submetidas a AFTV4. Gatius et al. (2011) verificaram uma alta e significativa correlação entre a expressão de *PGR* e *FGFR2* em células endometriais cancerígenas humanas. Sugerindo que a predominância de maiores expressões relativas do *PGR1* sem DIB com AFTV4 (Figura 10), e de *PGR3* (Figura 12) em condições de AFVT4, ambas no corno contralateral, podem ter contribuído para o aumento da expressão relativa de *FGFR2* nessa região anatômica do endométrio das novilhas.

O FGFR2 é estruturalmente caracterizado por uma porção extracelular, um domínio transmembrana, e um domínio intracelular responsável pela ativação e fosforilação de tirosinas, quando estimulado pelo FGF2 (ESWARAKUMAR; LAX; SCHLESSINGER, 2005; ZHANG et al., 2006). No lado intracelular há dois domínios de proteína tirosina-quinase que contêm ao todo 7 resíduos de tirosina que podem ser fosforilados (MOHAMMADI et al., 1996), com alta afinidade por HSPG, presentes na MEC (MOSCATELLI, 1987; FLAUMENHAFT et al., 1989; LEE et al., 1989; DIONNE et al., 1990; KEEGAN et al., 1991; PARTANEN et al., 1991). A presença de maiores expressões de *FGF2* e de seu receptor, no corno contralateral das novilhas, sem DIB e submetidas a AFTV4, podem ser também de um indicativo de uma maior atividade de fibroblastos na expressão de FGF2 e deste fator de crescimento na proliferação das próprias células fibroblasticas, e possivelmente em uma maior produção de componentes da MEC, já que é documentado que ambos são sintetizados por esse tipo de célula.

A MEC associada a fibroblastos e células endoteliais formam um importante e complexo arcabouço molecular no endométrio. Onde os componentes da MEC, atuam como elementos chave na angiogênese e remodelamento vascular, através de estímulos a proliferação e migração celular, além de degradação de alguns polímeros, mediados pelo FGF2, FGFR2, VEGF, MMP2 e MMP9, sendo a MMP2 e MMP9 detentoras de atividade proteolítica sobre as diferentes substâncias da MEC como colágenos, gelatinases e lamininas, permitindo a abertura de espaços para a migração celular, incluindo as angiogênicas, e além disso, durante a degradação da MEC ocorre a liberação de citocinas, caderinas, integrinas, FGF2, receptores de tirosina quinase modificando a sinalização molecular de maneira, direta ou indireta (SCHENK; QUARANTA, 2003; ALBERTS et al., 2004; MOTT; WERB, 2004; ITOH, 2006; NAGASE et al., 2006; EGEBALD; JARVELAINEN et al., 2009; RASCH; WEAVER, 2010; KIM et al., 2011).

O aumento considerável nos transcritos de *MMP9* (Figura 20), observados em condições de baixas concentrações de P4 e AFTV4 pode ser um indicativo de uma maior necessidade de transcritos para essa enzima, mediante a necessidade de seu intermédio no remodelamento vascular na MEC. Em células endometriais humanas a MMP9 é associada ao crescimento de vasos sanguíneos, tendo a sua expressão regulada tanto pelo E2 quanto pela P4, sendo a P4 o principal inibidor da sua expressão e ativação (HENRIET et al., 2002; CURRI; OESTEN, 2003).

Outra modulação interessante (Figura 21; Figura 22) ocorreu em relação à aquaporina 4 (*AQP4*). As aquaporinas pertencem à família de pequenas proteínas, responsáveis pela formação de poros na membrana plasmática, permitindo um rápido e específico transporte de água, através da membrana. Entre essas proteínas a AQP4, destaca-se pela sua expressão no trato reprodutivo feminino de diversas espécies, onde além do transporte de água, também desempenham funções relacionadas à secreção, transporte e absorção de fluidos, servindo também de canal para o transporte para o oxigênio e outros gases (ZHU et al., 2014). No tecido endometrial, o transporte e a homeostase da água são fundamentais para a manutenção do desempenho reprodutivo, permitindo o funcionamento normal das mais diversas células constituintes deste tecido, favorecendo o crescimento e desenvolvimento normal do concepto (JABLONSKI et al., 2003).

O aumento na abundância de transcritos da *AQP4* no corno contralateral submetidos a AFTV4, em comparação ao corno ipsolateral, também submetidos a AFTV4 (Figura 21) e a redução da expressão relativa deste gene, no corno ipsolateral em comparação aos animais que receberam DIB neste corno e aos que receberam ou não o DIB no corno contralateral (Figura 22), mostram diferentes funções dos hormônios esteroides sexuais na modulação deste gene, possivelmente para suprir necessidades fisiológicas distintas, nessas regiões anatômicas. O aumento na transcrição da *AQP4* no corno contralateral submetido a AFTV4 (Figura 21) pode estar associado à composição da matriz extracelular (MEC) e a eventos relacionados à diminuição da receptividade ao embrião na superfície apical do epitélio endometrial, em condições hormonais de baixa P4 e possível menor produção de E2 em função de diâmetros foliculares menores.

Enquanto que a maior expressão relativa de *AQP4*, observada no corno ipsolateral ao folículo dominante das novilhas, na presença de maiores concentrações plasmáticas de P4, próximo ao abate (Figura 22), pode estar associada à preparação dessa região para a receptividade de um futuro concepto, facilitando a absorção e secreção de fluidos luminais uterinos, e também o movimento do zigoto flutuante, para o local de implantação. Além disso, o maior fluxo de água através das células epiteliais para o lúmen uterino pode reduzir a viscosidade do fluido uterino, favorecendo a implantação do blastocisto.

O movimento da água através do canal de aquaporina é impulsionado por gradientes osmóticos (AGRE, 2016), possivelmente esse seja um dos fatores associados a maior expressão de *AQP4*, no corno contralateral das novilhas submetidas a AFTV4 sem DIB. Fisiologicamente, um aumento no fluxo de água para o estroma, para ser incorporada a MEC,

pode ser assciado à presença de substâncias altamente higroscópicas, a exemplo dos diversos tipos de proteoglicanas como agrecan, versican e decorin, ligadas a cadeias de glicosaminoglicanos, intercaladas as fibras de colágeno, permitindo um aumento na permeabilidade das células adjacentes a maiores concentrações dessas moléculas e aumentando o fluxo de água para o estroma (SUWIWAT et al., 2004; GAMBICHLER et al., 2008; KISCHEL et al., 2010). Visto que genes relacionados com a síntese de componentes da MEC támbem tiveram a sua trancrição aumentada em condições de AFTV4 (Figura 18; Figura 19).

Já o aumento no fluxo de água para o lumen endometrial pode estar relacionado a concentração de MUC1 presente na superficie apical do epitélio endometrial, visto que o gene que codifica a MUC1, também teve a sua expressão aumentada nessas mesmas condições (Figura 23). A MUC1 pertence a uma família de glicoproteínas de alto peso molecular, altamente glicosiladas, presentes na superfície das células epiteliais do endométrio (BOSHELL, 1990; DEVINE et al., 1992). Esta molécula é sintetizada no retículo endoplasmático, e glicosilada no complexo de golgi, onde em seguida é transferida para a superfície apical das células epiteliais, e posteriormente liberada da superfície apical, para dentro do lúmen uterino (LAGOW; DESOUZA; CARSON, 1999). Ao ocorrer a liberação da MUC1, após a fusão das vesículas com a membrana plasmática, esta reage com a água formando o muco. Isso leva a um aumento da viscosidade do fluido uterino luminal, formando uma barreira química que reduz as chances de interação entre os receptores da superfície do epitélio endometrial, com os da trofectoderma. Nesse sentido, acredita-se que baixas quantidades de MUC1 seja pré-requisito para a manutenção da receptividade normal do endométrio (SURVEYOR et al., 1995; APLIN et al., 1997; BOWEN; BAZER; BURGHARDT, 1997; LI et al., 2001). Assim, a maior expressão de *MUC1*, pode reduzir a receptividade uterina no corno contralateral ao folículo dominante, dos animais submetidos a AFTV4 sem DIB.

A redução da expressão da *MUC1*, mesmo no corno uterino ipsolateral, submetido a AFTV4, em relação ao corno contralateral, provavelmente esteja associada a um maior fluxo de E2, nessa região, proveniente da artéria útero ovárica. Nessas condições hormonais, a redução da expressão de *MUC1* pode ser um indicador favorável de receptividade endometrial. Sponchiado (2015) relatou a diminuição de *MUC1*, no endométrio de vacas Nelore com baixas concentrações de E2, em relação aos animais com altas concentrações deste hormônio.

A via de sinalização celular, que envolve os membros da família WNT (*Wingless-type MMTV integration site family*), classicamente conhecida pelo seu papel em eventos relacionados ao desenvolvimento do trato reprodutivo, durante o período pré e pós-natal em mamíferos, tem sido descrita em mecanismos associados, a citodiferenciação, proliferação e migração celular no útero (CLEVERS 2006; TOLEDO, COLOMBRES & INESTROSA 2008; VERHEYEN & GOTTARDI 2010). Dos membros da superfamília WNT, nesse estudo foi avaliado especificamente o gene *WNT5A*. A composição química das proteínas WNT5A possui a molécula proteica glicosilada, sendo esta glicosilação necessária, para a sua secreção e funcionalidade biológica (BURRUS; MCMAHON 1995, KURAYOSHI et al., 2006). A expressão do gene codificador de *WNT5A* foi maior nos animais que apresentaram baixas concentrações de P4 submetidos à AFTV4 (Figura 24). A menor expressão relativa de *WNT5A*, nas novilhas sem DIB submetidas a AFTV1 (Figura 24), sugere uma menor necessidade da sinalização celular, mediada por essa proteína, em processos celulares relacionados à migração, adesão e diferenciação celular. De acordo com Kikuchi et al. (2011), a sinalização do WNT5A ocorre independentemente da β catenina, onde estão incluídas múltiplas vias de sinalização celular, entre elas as relacionadas a adesão, polaridade e diferenciação celular. Já o aumento da expressão do *WNT5A*, no endométrio de novilhas pré-puberes com a realização da AFTV4, em relação a AFTV1, nos animais que não receberam DIB, pode estar associada a maior utilização da WNT5A, em processos de adesão e motilidade celular associadas ou não a elementos da MEC. Weeraratna et al. (2002), verificaram em humanos, que o complexo WNT5A acoplado ao receptor Frizzled 5, atua como um sinalizador para a invasão celular, em pacientes portadores de melanoma cutâneo, onde o aumento de ligações WNT5A ao receptor Frizzled 5, aumentou a invasão e motilidade celular. Jonsson et al. (2002), verificaram uma relação de membros da via de sinalização WNT5A, com colágenos e integrinas da matriz extracelular em pacientes portadores de carcinoma ductal de mama.

No que diz respeito ao aumento da expressão relativa de *WNT5A*, no tecido endometrial com DIB e AFTV1 ou AFTV4, em relação ao AFTV1 sem DIB (Figura 24), pode estar associado à diferenciação das glândulas endometriais, tornando-as aptas a atividade secretória. Mericskay, Kitajewski & Sassoon (2004), verificaram que a expressão persistente de *WNT5A*, no estoma endometrial, é necessária para a diferenciação do epitélio glandular em ratas. Adicionalmente, a expressão de *WNT5A* já foi identificada no epitélio luminal, e glandular do endométrio murino, após tratamento com E2 (HOU et al., 2004), no estroma

endometrial humano, em ambas as fases, proliferativa e secretora do ciclo menstrual (TULAC et al., 2003), enquanto que em ovelhas, verificou-se abundante expressão de *WNT5A* no estrato compacto entre 10° e 20° dia de prenhez (HAYASHI et al., 2007).

Além disso, a WNT5A também pode estar envolvida a processos inerentes a atividade da enzima relacionada ao metabolismo, e transporte de lipídios no útero bovino (LPL), que nesse estudo, teve a expressão aumentada, tanto no corno contra quanto ipsolateral com DIB e AFTV4 (Figura 25). Terrand et al. (2009) reportaram que ao induzirem a expressão da WNT5A, em fibroblastos embrionários murinos, anteriormente silenciados para esse gene, acarretou em aumento na atividade da LPL. Maiores concentrações de P4, em um ambiente com folículos dominantes de menor diâmetro, resultaram em um aumento na expressão relativa de *LPL*, no endométrio de ambos os cornos uterinos. No corno contralateral, a atuação das diferentes concentrações de E2, resultantes de animais submetidos à AFTV em diferentes dias, associada ou não a presença do DIB, foram mais visíveis. Enquanto que no corno ipsolateral, o efeito do DIB no aumento da expressão do *LPL*, foi mais perceptível, já que as diferenças aconteceram em condições de AFTV4 (Figura 25).

O aumento da expressão de *LPL*, em maiores concentrações de P4 associado a menores diâmetros foliculares, pode favorecer o aproveitamento lipídico no ambiente uterino, tanto pelas células uterinas, quanto por células embrionárias. Já que a LPL tem um papel crucial em vários aspectos do metabolismo lipídico, hidrolisando triglicerídeos transportados a partir de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e quilomícrons, tornando os ácidos graxos disponíveis para a absorção em vários tecidos (NILSSON-EHLE et al., 1980).

A utilização de ácidos graxos, até o estádio de blastocisto em bovinos, foi evidenciada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (FERGUSON; LEESE, 2006). Forde et al. (2011) documentaram que maiores concentrações de P4, resultaram em um aumento na expressão de *LPL*, no sétimo dia após a ovulação, diminui no início do alongamento embrionário. A localização de *LPL* no epitélio glandular de vacas nos dias 5 e 7 após o estro, sugere maior disponibilidade de ácidos graxos no lúmen uterino, para o embrião em estádios de desenvolvimento precoce (FORDE et al., 2010). Iverius, Brunzell (1988) reportaram que maiores concentrações de estrógeno diminuem a atividade da LPL em ratos e mulheres.

Outro gene também envolvido na codificação de proteínas, responsáveis pelo transporte e metabolismo de nutrientes no endométrio, que também teve sua transcrição alterada, foi o *solute carrier family 2 member 1* (SLC2A1) (Figuras 26 e 27), no endométrio de vacas cíclicas, essa proteína possui grande afinidade para o transporte de glicose, tendo a

sua expressão alterada de acordo com as concentrações dos hormônios ovarianos (FROVOLA; MOLEY, 2011). A glicose é caracterizada por ser uma molécula polar, composta por seis átomos de carbono, servindo como substrato para a produção de energia quanto para síntese de moléculas complexas. No interior celular, após ser fosforilada a glicose-6-fosfato é direcionada para a produção de ATP, NADPH, glicosamina-6-fosfato, glutamato e glicogênio (RIEGER; LOSKUTOFF; BETTERIDGE, 1992). Por ser insolúvel na membrana plasmática, o transporte de glicose é dependente da presença de proteínas transportadoras específicas presentes na superfície celular (ULDRY; THORENS, 2004).

O SLC2A1 destaca-se como um dos principais carreadores desta molécula no trato reprodutivo feminino em bovinos, tendo tanto o seu gene, quanto sua proteína, reportados no endométrio de vacas Nelore cíclicas. Araújo et al. (2015) verificaram maior abundância de transcritos para o SLC2A1 em vacas Nelore, com maiores concentrações de E2 pré-ovulatório e P4 pós-ovulatória, em relação aos animais com menores concentrações desses hormônios. Enquanto que França et al. (2015), trabalhando também com vacas Nelore, utilizando vacas em condições fisiológicas semelhantes às vacas utilizadas por Araújo et al. (2015), verificaram um aumento na abundância proteica de SCLC2A1, no endométrio de vacas com maiores concentrações plasmáticas desses esteroides ovarianos.

A ausência de DIB e presença de AFTV4 aumentou a expressão deste gene, em relação às demais condições hormonais (Figura 26). Além disso, no endométrio das novilhas pré-púberes, a expressão relativa do SLC2A1 foi maior no corno ipsolateral, em relação à AFTV1, no corno contralateral (Figura 27). Estes achados possivelmente evidenciam as diferenças na utilização desses transportadores no endométrio, para suprir a exigências de glicose, para o metabolismo celular, e composição química de algumas moléculas. Um exemplo é a expressão de genes codificadores de glicoproteínas, que aumentou em baixas concentrações de P4 e menor diâmetro de folículo dominante. Dentre eles, destacam-se *MUC1* (Figura 23), *WANT5A* (Figura 24).

Enquanto que maiores quantidades de SLC2A1, no corno ipsolateral, podem estar relacionada tanto a constituição molecular de proteínas, como também ao metabolismo celular do endométrio, e ao suporte energético para o embrião, em fases precoces de desenvolvimento, tornando-se um indicador positivo de potencial desenvolvimento do concepto. De acordo com Fleming et al. (2004) variáveis relacionadas ao desenvolvimento embrionário, estão relacionadas com a atividade fisiológica do endométrio e ao crescimento futuro do embrião. No útero, a glicose depende do SLC2A1 para ser transpostada para o

lúmen uterino, visto as células endometriais, e embrionárias não tem capacidade gliconeogênica (LEESE et al., 1984; MOLEY et al., 1998). De acordo com KIM et al., (1993), desde as primeiras clivagens, até a blastulação, o piruvato é o substrato de maior importância para o desenvolvimento do concepto. A patir da fase de blastula, a glicose torna-se a principal fonte de energia (LEESE; BARTON, 1984; KIM et al., 1993). Distúrbios nutricionais durante o início das divisões celulares do embrião, podem afetar todo o desenvolvimento do concepto (FLEMING et al., 2004).

Nesse estudo, o DIB aumentou a expressão do gene codificador da *SERPINA14* (Figura 28). Da mesma forma, a expressão relativa deste gene foi maior no corno ipsolateral, em relação ao corno contralateral (Figura 29). Essas condições hormonais e anatômicas comportam-se como um bom indicador da receptividade uterina em novilhas Nelore pré-púberes, visto a importância da SERPINA14 na nutrição precoce do embrião. Adicionalmente, a SERPINA14 pode favorecer um ambiente imunologicamente mais adequado para os espermatozoides vindos do lúmen uterino para o oviduto, e para o embrião, vindo do oviduto para a o corno uterino.

É importante ressaltar, a possibilidade de ações rápidas ou não genômicas mediadas pela P4, através do PGRMC1 (Figura 14) e PGRMC2 (Figura 16) sobre os efeitos gerais e locais desse hormônio sobre a expressão da *SERPINA14*. Araújo et al. (2015) verificaram maior abundância de transcritos para o *SERPINA14* em vacas Nelore com maior concentração de E2 pre-ovulatório e P4 pós-ovulatória. Além disso, esses autores verificaram um amento na expressão de *SERPINA14*, na região anterior do corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo.

A administração de P4 exógena aumentou a expressão de *SERPINA14*, em ovelhas ovariectomizadas em relação a ovelhas também ovariectomizadas, tratadas com E2 associado à P4 em longo prazo (SPENCER et al., 1999). A síntese e excreção do histotrofo pelo endométrio é crucial tanto como fluido nutritivo, como também serve de meio de sinalização entre a mãe e o concepto, via sinalização molecular.

A *SERPINA14* foi descrita como a proteína mais abundante no útero de ruminantes durante a prenhez (SEGERSON; BAZER, 1989). Além da função nutricional em ruminantes, a SERPINA14 atua também na regulação do sistema imunológico, prevenindo a rejeição do concepto pela mãe, inibindo a proliferação de linfócitos, regulando a função das células natural *Killer* e no transporte de imunoglobulinas (ULBRICH et al., 2009; PADUA; HANSEN, 2010; LEGARD; MEIER; PETERSON, 2011). Ainda, a SERPINA 14 tem sido descrita como um bom marcador de fertilidade e da capacidade secretória para o endométrio

de ruminantes (SPENCER; BAZER, 2004; KHATIB et al., 2009; LEDGARD; MEIER; PETERSON, 2011).

Outro indicador de receptividade uterina avaliado nesse estudo foi o receptor de ocitocina (*OXTR*), o qual teve a sua expressão aumentada, em baixas concentrações de P4 plasmática no corno contralateral (Figura 30), comportando-se como uma evidência não receptiva nessas condições. A regulação do *OXTR* ocorre através do balanço das concentrações de E2 e P4 (ROBINSON et al., 2001). Em vacas, a expressão dos *OXTR* é altamente correlacionada à expressão dos receptores de estradiol, sendo maior durante o proestro e estro do que durante a fase luteal (ROBINSON et al., 2001).

As estratégias hormonais adotadas no presente estudo não foram capazes de modular significativamente a abundância de transcritos referentes aos genes: *ESR2* (Figura 7), *GPER* (Figura 8), *PGR2* (Figura 11), *IGFR2* (Figura 31), *LTF* (Figura 32) e *MMP2* (Figura 33). Entretanto em estudos anteriores, os esteroides ovarianos foram capazes de alterar a modulação desses genes no endométrio de outras espécies, inclusive em vacas cíclicas (ULBRICH et al., 2011; CHENG et al., 2011; SANDEN et al., 2011; YANG et al., 2011; ARAÚJO et al, 2015; SPONCHIADO, 2015).

6. CONCLUSÕES

O uso de implante de liberação sustentada de progesterona em novilhas Nelore pré-púberes aumentou a transcrição dos receptores de progesterona componentes de membrana 1 e 2; favoreceu as vias gênicas relacionadas a atividade secretória, verificado pelo aumento da transcrição do gene codificador da *SERPINA14*; modulou as vias relacionadas à homeostase hídrica, regulando a expressão de *AQP4*, além de aumentar codificação de *LPL*, enzima relacionada ao metabolismo lipídico no endométrio.

Maiores diâmetros folículos dominantes favoreceram as vias relacionadas à proliferação celular mediada através do *ESR1* e *EGFR* no corno ipsolateral. Em contrapartida, diâmetros foliculares menores desfavoreceram a receptividade uterina no corno contralateral, em função da maior expressão de *MUC1*.

Estes achados confirmam a modulação dos receptores de esteroides ovarianos intracelulares e de membrana, e de seus genes alvos no endométrio de novilhas Nelore pré-púberes, sobre influência do uso de dispositivo de liberação sustentada de progesterona e dia da aspiração folicular transvaginal. Sendo este arcabouço molecular, dependente das concentrações plasmáticas de progesterona, associado ou não ao tamanho do diâmetro folicular, como também, das interações desses hormônios, com a localização anatômica do corno uterino em relação ao folículo dominante.

7. REFERÊNCIAS

AGRE, P. The aquaporin water channels. **Proceedings of the American Thoracic Society,** v. 3, p. 5–13, 2006.

ANDERSEN, K. J.; LEFEVER, D. G.; BRINKS, J. S.; ODDE, K. G. The use of reproductive tract scoring in beef heifers. **Agri-Practice,** v. 12, n.4, p.123-128, 1991.

ANDERSON, L. H.; MCDOWELL, C. M.; DAY, M. L. Progestin-Induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of Reproduction,** v. 54, p. 1025-1031, 1996.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS,J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER,P. **Molekularbiologie der Zelle**. 4. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2004.

ALROY, I.; YARDEN Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: Signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. **FEBS Letters,** v 410, p. 83–86, 1997.

APLIN, J. D. Adhesion molecules in implantation. **Reviews of Reproduction,** v. 2, p.84–93, 1997.

ARAÚJO, E. R.; SPONCHIADO, M.; PUGLIESI, G.; VAN HOECK, V.; MESQUITA, F. S.; MEMBRIVE, C. M.; BINELLI, M. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by peri-ovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.

ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression**.** **Physiological reviews,** v. 81, p.1269-1304, 2001.

AZEREDO, D. M.; ROCHA, D. C.; JOBIM, M. I. M.; MATOS, R. C.; GREGORY, R. M. Efeito da sincronização e da indução de estros em novilhas sobre a prenhez e o índice repetição de crias na segunda estação reprodutiva. **Ciência Rural,** v. 37, n.1, p-201-205, 2007.

BADINGA, L.; SONG, S.; SIMMEN, R. C. M.; CLARKE, J. B.; CLEMMONS, D. R.; SIMMEN. Complex mediation of uterine endometrial epithelial cell growth by insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF-binding protein-2. **Journal of Molecular Endocrinology,** v.23, p.277-285, 1999.

BAGLEY, C. P. Nutritional management of replacement beef heifers: a review. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 11, p. 3155–3163, 1993.

BANKS, W.J. Sistema Reprodutor Feminino. **In: Histologia Veterinária Aplicada.** 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 27, p. 565 – 588.

BASHKIN, P.; DOCTROW, S.; KLAGSBRUN, M.; SVAHN, C. M.; FOLKMAN. J.; VLODAVSKY, I. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix

and is released by heparitinase and heparin-like molecules. **Biochemistry,** v. 28, p. 1737-1743, 1989.

BARRA, G. B.; VELASCO, L. F.R.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A.M.; MOURA, F. N.; DIAS, S. M.G.; POLIKARPOV, I.; RALFF, C.J.; SIMEONI, L.A .; NEVES, F. A. R. Mecanismo de ação molecular do hormônio tireoideano. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia,**v. 48, p.25-39,2004.

BARASH, I. A.; CHEUNG, C. C.; WEIGLE, D. S.; REN, H.; KABIGTING, E. B.; KUIJPER, J. L.; CLIFON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology,** v.137, p. 3144-3147, 1996.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L.U.; SALES, J. N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v. 31, p. 244-245, 2007.
BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Advanced Cancer Research,** v. 59, p.115–165, 1992.

BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.;GROSS, K.; SCHMIDT, S. E.; MEYER, H. H.; EINSPANIER, R.; WENIGERKIND, H.; VERMEHREN, M.; BLUM, H.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in function al changes. **Journal of Molecular,** v. 34, p. 889-908, 2005.

BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M.; THATCHER, W. W. Actions of hormones on the uterus and effect on conceptus development. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 35-45, 1979.

BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; WU, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. **Reproductive biology**, v. 8, n. 3, p. 179-211, 2008.

BEATO, M.; KLUG, J. Steroid hormone receptors: an update. **Human Reproduction Update,** v.6, p. 225-236, 2000.

BERGFELD, E. G. M.; KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biology of Reproduction,** v. 51, p. 1051-1057, 1994.

BIKFALVI, A.; KLEIN, S.; PINTUCCI, G.; RIFKIN, D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. **Endocrine Reviews,** v. 18, p.26–45, 1997.

BOWEN, J. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Spatial and temporal analyses of integrin and MUC1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. **Biology of Reproduction,** v.55, p.1098–1106, 1996.

BOSHELL, M.; LALANI, E. N.; PEMBERTON, L.; BURCHELL, J.; GENDLER S, TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. The product of the human MUC1 gene when secreted by mouse cells transfected with the full length cDNA lacks the cytoplasmic tail. **Biochemical and Biophysical Research Communications, v,** 185, p.1-8, 1990.

BROOKS, A. L.; MORROW, R. E.; YOUNGQUIST, R. S. Body composition of beef heifers at puberty. **Theriogenology,** v. 24, n. 2, p.235-250, 1985.

BRONSON, F. H. Puberty in female rats: relative effect of exercise and food restriction. **American Journal of Physiology,** v. 252, p. 140-144, 1987.

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

BOYD, P. A.; SPELSBERG, T. G. Seasonal changes in the molecular species and nuclear binding of chick oviduct progesterone receptor. **Biochemisty,** v.18, n.17, p.3685-3690, 1979.

BOYD-LEINEN, P. A.; FOURNIER, D.; SPELSBERG, T. C. Nonfunctioning progesterone receptors in the developed oviducts from estrogen-withdrawn immature chicks and aged nonliving bens. **Endocrynology,** v.111, n. 1, p.30-36, 1982.

BURRUS, L. W.; MCMAHON, A. P. Biochemical analysis of murine Wnt proteins reveals both shared and distinct properties. **Experimental Cell Research,** v. 220, p.363-373, 1995.

CHARNOCK-JONES, D. S.; SHARKEY, A. M.; RAJPUT-WILLIAMS, J.; BURCH, D.; SCHOFIELD, J. P.; FOUNTAIN, S. A.; BOOCOCK, C. A.; SMITH, S.K. Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. **Biology of Reproduction,** v. 48, p. 1120–1128, 1993.

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

CASTAN O, G. A.; PABLON, L. M.; CURALLA, J. E. Concentration of *trans*-vaccenic and rumenic acids in the milk from grazing cows supplemented with palm oil, rice bran or whole cottonseed. **Revista Brasileira de Zootecnia,** vol.43, n.6, 2014.

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

CLARKE, C. L.; ZANIO, R. L.; FEIL, P. D.; MILLER, J. V.; STECK, M. E.; OHLSSON-WIHELM, B. M.; SATYASWAROOP, P. G. Monoclonal antibodies to human progesterone receptor characterization by biochemical andimmunohistochemical techniques. **Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 1123- 1132, 1987.

CLARK, J.H.; MARKAVERICH, B. M. Actions of ovarian steroid hormones. **In the Physiology of Reproduction** (E. Knobil and J. D. Neill, Eds.), pp. 679-724. Raven Press, New York, 1988.

CLARK, N. C.; PRU, C. A.; YEE, S. P.; LYDON, J.P.; PELUSO, J. J.; PRU, J. K. Conditional Ablation of Progesterone Receptor Membrane Component 2 Causes Female Premature Reproductive Senescence. **Endocrinology,** v.22, p.1-16, 2016.

CLARO JÚNIOR, I.; PERES, R.; AONO, F.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based trataments. **Theriogenology,** v. 74, p. 903-911, 2010.

CHENG, S. B.; GRAEBER, C. T.; QUINN, J. A.; FILARDO, E. J. Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled receptor 30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. **Steroids,** v.76, p.892–896, 2011.

DINIZ-MAGALHÃES, J. **Estudo do mecanismo molecular da progesterona e do estradiol sobre o início da puberdade em novilhas Nelore**. 2014. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GAMBICHLER, T.; KREUTER, A.; GROTHE, S.; ALTMEYER, P.; BROCKMEYER, N. H.; ROTTERDAM, S. Versican overexpression in cutaneous malignant melanoma. **European Journal of Medical Research**, v. 24, n. 11, p. 500-504, 2008.

GARCIA, E.; BOUCHARD, P. DE BRUX, J. BERDAH, J. FRYDMAN, R. SCHAISON, G. MILGROM, E. PERROT-APPLANAT, M. Use imunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endocrinol dating. **Journal of Endocrinology and Metabolism,** v. 67, n. 1, p. 80-87, 1988.

GARDNER, R. M.; VERNER, G.; KIRKLAND, J. L.; STANCEL, G. M. Regulation of uterine epidermal growth factor (EGF) receptors by estrogen in the mature rat and during the estrous cycle. **Journal of Steroid Biochemistry,** v.32, p.339-343, 1989.

GASSER, C. L. Considerations on puberty in replacement beef heifers. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1336–40, 15 mar. 2013. Trabalho apresentado a Alpharma Beef Cattle Nutrition Symposium no Joint Annual Meeting, July 15th to 19th, Indianapolis, Indiana.

GASSER, C. L.; BEHLKE, E. J.; GRUM, D. E.; DAY, M. L. Effect of timing of feeding a high-concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. **Journal of animal science**, v. 84, n. 11, p. 3118–22, nov. 2006a.

GASSER, C. L.; BRIDGES, G. A.; MUSSARD, M. L.; GRUM, D. E.; KINDER, J. E.; DAY, M. L. Induction of precocious puberty in heifers III: hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. **Journal of animal science**, v. 84, n. 8, p. 2050–6, 5 ago. 2006b.

GASSER, C. L.; BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; BEHLKE, E. J.; GRUM, D. E.; KINDER, J. E.; DAY, M. L. Induction of precocious puberty in heifers II: advanced ovarian follicular development. **Journal of animal science**, v. 84, n. 8, p. 2042–9, 5 ago. 2006c.

GASSER, C. L.; GRUM, D. E.; MUSSARD, M. L.; FLUHARTY, F. L.; KINDER, J. E.; DAY, M. L. Induction of precocious puberty in heifers I: enhanced secretion of luteinizing hormone. **Journal of animal science**, v. 84, n. 8, p. 2035–41, 8 ago. 2006d.

CLEVERS, H. Wnt/ß-catenin signaling in development and disease. **Cell,** v.125, p. 469-480, 2006.
GELLERSEN, B.; FERNANDES, M. S.; BROSENS, J. J. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 15, p. 119-138, 2009.

GIANGRANDE, P. H; MCDONNELL, D. P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. **Recent Progress in Hormone Research,** v.54, v.291-313, 1999.

GIUDICE, G. Molecular mechanisms in development biology. **Cell Biology International Reports,** v.20, n.1, p.29-32, 1996.

GRONEMEYER, H. Transcriptions activation by estrogen and progesterone receptors**.** **Annual Reviews of Genetics**, Palo Alto, v. 25, p. 89-123, 1991.

CONDON, J. C.; HARDY, D. B.; KOVARIC, K. MENDELSON, C. R. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. **Molecular Endocrinology,** v.20, p.764–775, 2006.

CONDON, J. C.; JEYASURIA, P.; FAUST, J. M.; WILSON, J. M.; MENDELSON, C. R. A decline in progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of labor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 100, p.9518-9523, 2003.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian aromatases. **Reproduction,** v. 121, p. 685–695, 2001.

COLLIER, R.J.; DAHL, G.E.; VANBAALE, M.J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of Dairy Science,** v.89, p.1244-1253, 2006.

COUSE, J. F.; HEWITT, S. C.; KORACH, K. Steroid receptors in the ovary and uterus. **In the Physiology of Reproduction** (E. Knobil and J. D. Neill, Eds.), pp. 593-678. Elsevier, 3 ed. New York, 2006.

CONDON JC, HARDY DB, KOVARIC K, MENDELSON CR. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. **Molecular Endocrinology**; 20:764–75, 2006.

COUSE,J. F.; LINDZEY, J.; GRANDIEN, K.; GUSTAFSSON, J. A.; KORACH, K. S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-α (ERα) and estrogen receptor-β (ERβ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERα-knockout mouse. **Endocrinology,** v. 138, p. 4613-4621, 1997.

COUSE, J. F; KORACH, K. S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? **Endocrinology,** v. 20, p. 358-417, 1999.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Tecido adipose e adipocinas. **Acta Med Port,** v. 19, p.251-256, 2006.

DAUVOIS, S.; WHITE, R.; PARKER, M. G. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. **Journal of Cell Science,** v. 106, p. 1377-1388, 1993.

DAY, M. L.; ANDERSON, L. H. Current concepts on the control of puberty in cattle. **Journal of Animal Science,** v. 76, p 1-15, 1998.

DAY, M. L.; GASSER, C. L.; GRUM, D. E.; PIRES, A. V. Fatores que afetam a idade a puberdade em novilhas de corte. In: PIRES, A. V. (Ed). **Bovinocultura de Corte.** Piracicaba: Fealq, 2010. p. 637-652.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P. L.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrines mechanisms of puberty in heifers. Role of hyphotalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction,** v. 37, p. 1054-1065, 1987.

DEVINE, P.; MACKENZIE, I. F. C. Mucins: structure, function and association with malignancy. **Bioessays,** v.14, p.619–625, 1992.

DIELEMAN, S. J; BEVERS, M. M. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG-treated cows. **Journal of Reproduction and Fertility,** v.81, p. 533-542, 1987.

DELLMANN, H.D.; BROWN, E.M. **In: Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397p.

DEMARZO, A. M.; BECK, C.A.; ONATE, S.A.; EDWARDS, D.P. Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.88, p. 72–76, 1991.

DESJARDINS, C.; HAFS, H. D. Maturation of bovine female genitalla from birth throught puberty. **Journal of Animal Science,** v. 28, p-502-507, 1969.

DIAS, L.T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L.G. Estimativas de herdabilidade para idade ao primeiro parto de novilhas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.33, n.1, p.97- 102, 2004.

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

DIONNE, C.A., CRUMLEY, G. BELLOT, F. KAPLOW, J.M. SEARFOSS, M. RUTA, G. BURGESS, W.H. JAYE, M.; SCHLESSINGER. J. Cloning and expression of two distinct

high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factor. **Journal of European Molecular Biology Organiztion,** v.9, p.2685–2692, 1990.

ENDECOTT, R. L.; FUNSTON, R. N.; MULLINIKS, J. T.; ROBERTS, A. J. Implications of beef heifer development systems and lifetime productivity. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1329–35, 2013.

EDWARDS, D. P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. **Annual Review of Physiology,** v. 67, p.335–376, 2005.

EGEBLAD, M.; RASCH, M. G.; WEAVER, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current Opinion of Cell Biology,** v. 22, p. 697-706, 2010.

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

ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S.; TEIXEIRA, L. A. Seleção para precocidade sexual em novilhas de corte. In: Pires, A. V. (Ed.) **Bovinocultura de Corte.** Piracicaba: Fealq, 2010. p. 801-811.

ELER, J.P.; SILVA, J.A. II V.; FERRAZ, J.B.S. et al. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **Journal of Animal Science,** v.80, p.951-954, 2002.

EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; GONÇALVES, P. E. M.; MARTINS, J. A. M.; LEITE, T. G.; ANDRADE, V. J.; FILHO, V. R. V. Aspectos relevantes sobre a puberdade em fêmeas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v. 33, n.1, p-11-19, 2009.

ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, S.; LAGERCRANTZ, J.; FRIED, G.; NORDENSKJOLD, M.; GUSTAFSSON, J. A. Human estrogen receptor-β gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,** v. 82, 4258-4265, 1997.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyzes of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science,** v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.

ESWARAKUMAR, V.; LAX, I.; SCHLESSINGER, J. Cellular sinaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine Growth Factor Review,** v. 16, p.139-149, 2005.

ESWARAKUMAR, V. P.; LAX, I.; SCHLESSINGER J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. **Cytokine Growth Factor Review,** v. 16, n.2, v.p.139-149, 2005.

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 187-194, 1994.

FAHAM, S.; HILEMAN, R. E.; FROMM, J. R.; LINHARDT, R. J.; REES, D. C. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor, **Science,** v.271, p.1116-1120, 1996.

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.

FENG, L.; ANTCZAK, B. C.; LAN, L. GROTEGUT, C. A.; THOMPSON, J. L.; ALLEN, T. K.; MURTHA, A. P. Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) expression in fetal membranes among women with preterm premature rupture of the membranes (PPROM). **Placenta,** v.35, p.331- 333, 2014.

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

FILARDO, E J.; QUINN, J A.; BLAND, K. I.; FRACKELTON, JR. A. R. Estrogen induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homologue, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. **Molecular Endocrinology,** v. 14, p.1649–1660, 2000.

FLAUMENHAFT, R.; MOSCATELLI, D.; SAKSELA, O.; RIFKIN. D. B. Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long-term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. **Journal of Cell Physiology,** v. 140, p.75–81, 1989.

FLEMING, T. P. ; KWONG, W. Y.; PORTER, R.; URSELL, E.; FESENKO, I.; WILKINS, A.; MILLER, D. J.; WATKINS, A. J.; ECKERT, J. J.; The embryo and its future. **Biology of reproduction,** v. 71, n. 4, p.1046-54, 2004.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine,** v. 9, n.6, p.669-676, 2003.

FIORENTINI, G.; MESSANA, J.D.; DIAN, P.H.M.; REIS, R.A.; CANESIN, R.C.; PIRES, A.V.; BERCHIELLI, T.T. Digestibility, fermentation and rumen microbiota of crossbred heifers fed diets with different soybean oil availabilities in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 181. p 26-34, 2013.

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

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

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

FRANCO, G. L. Desafios de interação entre aspectos nutritivos e reprodutivos do gado de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE DESAFIOS E NOVAS TECNOLOGIAS NA BOVINOCULTURA DE CORTE, 1., 2005. Brasília. **Anais…**I SIMBOI, Brasília, DF, 2005. p. 35.

FRISCH R. E.; MCARTHUR, J. W. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. **Science,** v. 185, n. 4155, p. 949 – 951, 1974.

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

FU, M. RAO, M.; WANG, C.; SAKAMAKI, T.; WANG, J.;DI VIZIO,D.; ZHANG, X.; ALBANESE, C.; BALK, S.; CHANG, C.; FAN, S.; ROSEN, E.; PALVIMO, J. J.; JANNE,O. A.; MURATOGLU, S.; AVANTAGGIATI, M. L.; PESTELL, R. G. Acetylation of androgen receptor enhances coactivator binding and promotes prostate cancer cell growth. **Molecular and Cellular Biology,** v.23, 8563-8575, 2003.

FU, M.;WANG, C.; REUTENS, A. T.;WANG, J.; ANGELETTI, R.H.; SICONOLF-BAEZ, L.; OGRYZKO, V.; AVANTAGGIATI, M. L.; PESTELL, R. G. p300 AND P300/Camp-response element binding protein-associaed factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. **Journal of Biological Chemistry,** v.275, p. 8563-8575, 2000.

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

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological action of progesterone in target tissue. **Endocrine Reviews,** v. 18, n. 4, p. 502-519, 1997.

GATIUS S, VELASCO A, AZUETA A, SANTACANA M, PALLARES J, VALLS J, DOLCE, X.; PRAT, J.; XAVIER, M. G. FGFR2 alterations in endometrial carcinoma. **Modern Pathology,** v.24, p. 1500–1510, 2011.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT. K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction,** v. 62, p.920–927, 2000.

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

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

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

GRIFFIN, D.; LIU, X.; PRU, C.; PRU, J. K.; PELUSO, J. J. Expression of progesterone receptor membrane component-2 within the immature rat ovary and its role in regulating mitosis and apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells. **Biology of Reproduction,** v. 91, n.2, p.1–11, 2014.

GOTTSCHALL, C. S. **Controle do ciclo estral e taxa de prenhez em mtrizes de corte bovinas: Efeitos Hormonais, Genéticos e Ambientais.** 2011. Porto Alegre. 190f (Tese em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Gradução em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS.

GONELLA-DIAZA, A M.; DA SILVA, A. S. C.; SPONCHIADO, M.; PUGLIESI, G.; MESQUITA , F. S.; VAN HOECK, V.; DE FRANCISCO, S, R.; GASPARIN, G. R.; COUTINHO, L L.; BINELLI, M. 2015 Size of the ovulatory follicle dictates spatial differences in the oviductal transcriptome in cattle. **PLOS ONE,** 10 e0145321, 2015.

GONZALEZ-PADILLA, E.; WILTBANK, J. N, NISWENDER, G. D. Puberty in beef heifers. **Journal of Animal Science,** v. 40, p. 1091-1104, 1975.

GELMANN, E. P. Molecular biology of the androgen receptor. **Journal of Clinical Oncology,** v. 20, p.3001-3015, 2002.

GREEN, S.; WALTER, P.; KUMAR, V.; KRUST, A.; BORNERT, J.M..; ARGOS, P.; CHAMBOM, P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. **Nature,** v. 320, p. 134-139, 1986.

GRECO, T. L.,DUELLO, T. M., GORSKI, J. Estrogen receptors, estradiol, and diethylstilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of strogen receptors and strogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts. **Endocrine Reviews,** v.14, p. 59-71, 1993.

GEISERT, R.D.; PRATT, T.N.; BAZER, F.W; MAYES, J.S.; WATSON, G.H. Immunocytochemical localization and changes in endometrial progestin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development,** v. 6, p. 749–760, 1994.

GEVA, E.; JAFFE, R. B. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. **Fertility and Sterility,** v. 74, p.429-438, 2000.

GIASSETI, M. I.; PONTES, E. O.; NIEMEYER, C.; SIQUEIRA, A. F. P.; FEDOZZI, F.; LIMA, M. C.; MARQUES, V. B.; BERTAN, C. M.; MIGLINO, M. A.; ARRUDA, R. P.; PAPA, P. C.; BINELLI, M. Quantificação do interferon-tau durante o reconhecimento materno de gestação em fêmeas bovinas *Bos taurus indicus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** São Paulo, v. 45, p.111-120, 2008.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M.R. Reproductive Cycles. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals.** 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 55-66.

HARTT, L. S.; CARLING, S. J.; JOYCE, M. M.; JOHNSON, G. A.; VANDERWALL, D. K.; OTT, T. L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v.130, p.241-250, 2005.

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

HENDERSON, D.; WILSON, T. Reduced binding of progesterone receptor to its nuclear response element after human labor onset. **American Journal of Obstetrics and Gynecology,** v.185, p.579-585, 2001.

HENRIET, P.; CORNET, P. B.; LEMOINE, P.; GALANT, C.; SINGER, C. F.; COURTOY, P. J.; EECKHOUT, Y.; MARBAIX, E. Circulating ovarian steroids and endometrial matrixmetalloproteinases (MMPs). **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 955, p. 119-138, 2002.

HERYANTO, B.; LIPSON, N. E.; ROGERS, P. A. Effect of angiogenesis inhibitors on estrogen-mediated endometrial endothelial cell proliferation in the ovariectomized mouse. **Reproduction,** v. 125, n.3, p.337-346, 2003.

HILIER, S. G. Gonadotropic control ovarian follicular growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology,** v. 179, p. 39-46, 2001.

HINEY, J. K.; SRIVASTAVA, V.; NYBERG, C. L.; OJEDA, S. R.; DOES, W. L. Insulin-like growth factor peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. **Endocrinology,** v. 137, p.3717-3728, 1996.

HOU, X.; TAN, Y.; LI, M.; DEY, S. K.; DAS, S. K. Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. **Molecular Endocrinology,** v. 18, p.3035–3049, 2004.

HOLM, D. E.; THOMPSON, P. N.; IRONS, P. C. The economic effects of an estrus synchronization protocol using prostaglandin in beef heifers. **Theriogenology,** v. 70, n.9, p. 1507-1515, 2008.

HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R. K.; BEARD, A. P.; BARTLEWSKI, P. M.; PIERSON, R. A.; RAWLINGS, N. C. Utrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. **Animal Reproduction Science,** v. 80, p.15-29, 2004.

HONARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R. K.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. Effects of season of birth on the prepubertal pattern of gonadotropin secretion and age at puberty n beef heifers. **Theriogenology,** v. 52, n.1, p. 67-79, 1999.

HOROWITZ, A.; SIMONS, M. Regulation of syndecan-4 phosphorylation in vivo, **Journal of Biological Chemistry,** v.273, p.10914-10918, 1998.

HORWITZ, K.B. The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? **Endocrine Reviews,** v. 13, p.146-163, 1992.

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

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

HUGHES, A. L.; POWELL, D.W.; BARD, M.; ECKSTEIN, J.; BARBUCH, R.; LINK A. J.; ESPENSHADE, P. J. Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. **Cell Metabolism,** v.5, p.143-149, 2007.

HYDER, S. M.; STANCEL, G. M.; CHIAPPETTA, C.; MURTHY, L.; BOETTGER-TONG, H. L.; MAKELA, S. Uterine expression of vascular endothelial growth factor is increased by estradiol and tamoxifen. **Cancer Research,** v. 56, p.3954–3960, 1996.

IBRAHIMI, O. A.; ELISEENKOVA, A. V.; YEH, B. K.; YAYON, A.; LINHARDT, R. J.; MOHAMMADI, M. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. **Molecular Cell,** v.6, n.3, p.743-750, 2000.

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

IOZZO, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular de- sign to cellular function, **Annual Review of Biochemistry,** v.67, p.609-652, 1998.

IGARASHI, M.; FINCH, P.; AARONSON, S. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF-10) reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). **Journal of Biological Chemistry,** v.273, p.13230-13235, 1998.

IMAKAWA, K.; HANSEN, T. R.; MALATHY, P. V.; ANTHONY, R. V.; POLITES, H. G.; MAROTTI, K. R.; ROBERTS, R. M. Molecular cloning and characterization of complementary deoxyribonucleic acids corresponding to bovine trophoblast protein-1: a comparasion with ovine trophoblast protein-1 and bovine interferon-α II. **Molecular Endocrinology,** v.3, p.127-139, 1989.

IVERIUS, P. H.; BRUNZELL, J. D. Relationship between lipoprotein lipase activity and plasma sex steroid level in obese women. **Journal of Clinical Investigation,** v. 82, p.1106 – 1112, 1988.

JABLONSKI, E. M.; MCCONNELL, N. A.; HUGHES, F. M.; HUET-HUDSON, Y. M. Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1481-1487, 2003.

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

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews,** 1995.

JONES, E. J.; ARMSTRONG, J. D.; HARVEY, R. W. Changes in metabolites, metabolic hormones, and luteinizing hormone before puberty in Angus, Bradford, Charolais, and Simental heifers. **Journal of Animal Science,** v. 69, p. 1607-1615, 1991.

JONSSON, M.; DEJMEK, J.; BENDAHL, P. O.; ANDERSSON, T. Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. **Cancer Research,** v,62, n.2, p.409-416, 2002.

HAYASHI, K.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Wnts in the Ovine Uterus: Potential regulation of Peri-implantation Ovine Conceptus Development. **Endocrinology,** v.148, p.3496-506, 2007.

KAN, M.; WANG, F.; XU, J.; CRABB, J. W.; HOU, J.; MCKEEHAN, W. L. An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. **Science,** v. 259 1918–1921, 1993.

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

KASTNER, P.; KRUST, A.; TURCOTTE, B.; STROPP, U.; TORA, L.; GRONAMEYER, H.; CHAMBON, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcript encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. **The Embo Journal**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 1603-1614, 1990.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; MONTANO, M.M.; EDIGER, T. R..; SUN, J.; EKENA, K.; LAZENNEC,G.; MARTINI, P. G.; McINERNEY, E.M.; DELAGE-MOURROUX,R.; WEISS, K.; KATZENELLENBOGEN, J. A. Estrogen receptors: selective ligands, partners and distinctive pharmacology. **Recent Progress in Hormone Research,** v. 55, p.163-193, 2000.

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

KRAUS, W. L.; WEIS, K. E.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Inhibitory crosstalk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors. **Molecular Cell Biology,** v. 15, p.1847–1857, 1995.

KRAUS, W. L.; MONTANO, M. M.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5′-region and identification of two functionally distinct promoters. **Molecular Endocrinology,** v. 7, p.1603–1616, 1993.

KEEGAN, K.; JOHNSON, D.E.; WILLIAMS, L.T.; HAYMAN, M.J. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 88, p.1095–1099, 1991.

KIKUCHI, A.; YAMAMOTO, H.; SATO, A.; MATSUMOTO, S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. **International Review of Cell and Molecular Biology,** v. 291, p. 21-71, 2011.

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

KLEIN, S.; GIANCOTTI, F.G.; PRESTA, M.; ALBELDA, S. M.; BUCK, C.A.; RIFKIN, D.B. Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. **Molecular Biology Cell,** v. 4, p.973–982, 1993.

KLEIN, S., A. BIKFALVI, T.M. BIRKENMEIER, F.G. GIANCOTTI, AND D.B. RIFKIN. Integrin regulation by endogenous expression of 18-kDa fibroblast growth factor-2. **Journal of Biological Chemistry,** v. 271, p.22583–22590, 1996.

KIM, J. H.; FUNAHASHI, H.; NIWA, K.; OKUDA, K. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. **Theriogenology,** v. 39, p. 875-886, 1993.

KIMMINS, S.; MACLAREN, L. A. Oestrus cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placenta,** v. 22, p. 742-748, 2001.

KIMURA, I.; NAKAYAMA, Y.; KONISHI, M.; TERASAWA, K.; OHTA, M.; ITOH, N.; FUJIMOTO, M. Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as heme/steroid-binding proteins. **Current Protein Peptide Science Journal,** v.13, p.687-696, 2012.

KINDER, J. E.; KOJIMA, F. N.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. **Journal of Animal Science,** v. 74, p. 1424–1440, 1996.

KINDER, J. E.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; KOJIMA, F. N. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement,** n. 49, p.393-407, 1995.

KINDER, J. E.; DAY, M. L.; KITTOK, R. J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility,** Suppl. 34: v. 34, p. 167-173, 1987.

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

KOMAR, C. M.; BRAISSANT, O.; WAHLI, W.; CURRY, T. E, JR. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. **Endocrinology,** v. 142, p.4831–4838, 2001.

KOWALIK, M. K.; SLONINA, D.; REKAWIECKI, R.; KOTWICA J. Expression of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1) and nuclear progesterone receptor (PGR) in the bovine endometrium during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. **Reproductive Biology,** v.13, p.15-23, 2013.

KOWALIK, M. K.; KOTWICA, J. Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) gene expression in corpus luteum during the estrous cycle in cows. **Reproductive Biology,** v. 8, p.291-297, 2008.

KULICK, L. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology,** v.52, p.913-921, 1999.

KUIPER, G. G.; FABER, P. W.; VAN ROOIJ, H. C.; VAN DER KORPUT, J.; A., RIS-STALPERS, C.; KLASSEN, P.; TRAPMAN, J.; BRINKMANN, A. O. Structural organization of the human androgen receptor gene. **Journal of Molecular Endocrinology,** v.2, p.11-19, 1989.

KURAYOSHI, M.; OUE, N.; YAMAMOTO, H.; KISHIDA, M.; INOUE, A.; ASAHARA, T.; YASUI, W.; KIKUCHI, A. Expression of Wnt-5a is correlated with aggresiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. **Cancer Research,** v. 66, p. 10439–10448, 2006.

KURITA, T.; LEE,K. J.; COOKE, P. S.; LYDON, J.P.; CUNHA, G.R. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus. **Biology of Reproduction,** v.62, p. 831-838, 2000.

KURITA, T.; LEE, K.; SAUNDERS, P.T.; COOKE, P. S.; TAYLOR, J. A.; LUBAHN, D. B.; ZHAO, C.; MAKELA, S.; GUSTAFSON, J.A.; DAHIYA, R.; CUNHA, G. R. Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. **Biology of Reproduction,** v. 64, p. 272-283, 2001.

KRUST, A., GREEN, S., ARGOS, P., KUMAR, V., WALTER, P. BORNERT, J. M., CHAMBON, P. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erb-A and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. **The Embo Journal**, v. 5, p. 891-897, 1986.

LAGOW, E.; DESOUZA, M. M.; CARSON, D. D. Mammalian reproductive tract mucins. **Human Reproduction Update**, v.5, p.280–292, 1999.

LAMB, G. C.; LARSON, J. E.; GERAY, T. W.; STEVENSON, J. S.; JOHNSON, S. K.; DAY, M. L.; ANSOTEGUI, R. P.; KESLER, D. J.; DEJARNETTE, J. M.; LANDBLOM, D. Synchronization of estrus and artificial insemination in replacement beef heifers using GnRH, PGF2α and progesterone. **Journal of Animal Science,** v. 84, p.3000-3009, 2006.

LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O. The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. **Animal Reproduction Science,** v. 52, p. 175-190, 1998.

LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. **The nuclear receptor:factsbook.** Academic Press, San Diego, 2002.

LEE, J. M.; STORMSHAK, F.; THOMPSON, J. M.; HESS, D. L.; FOSTER, D. L. Melatonin and puberty in females lamb exposed to EMF: a replicate study. **Bioeletromagnetics,** v.16, p-119-123, 1995.

LEE, P.L.; JOHNSON, D.E.; COUSENS, L.S.; FRIED, V.A; WILLIAMS. L.T. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. **Science,** *v.* 245, p.57–60, 1989.

LECCE, G.; MEDURI, G.; ANCELIN, M.; BERGERON, C.; PERROT-APPLANAT, M. Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism,** v.86, n.3, p.1376-1386, 2001.

LEESE, H. J.; BARTON, A. M.; 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 72, p. 9-13, 1984.

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

LESSEY, B. A.; KILLAM, A. P.; METZGER, D. A.; HANEY, A. F.; GREENE, G. L.; MCCARTY, K. S. J. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism,** v. 67, n. 2, p. 334-340, 1988.

LESSEY, B. A.; ALEXANDER, P. S.; HORWITZ, K. B. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photaffinity labeling. **Endocrinology,** v. 112, p.1267–1274, 1983.

LEVIN, E. R. Minireview: extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions. **Molecular Endocrinology,** v. 25, p. 377–384 2011.

LEROITH, D.; WERNER, H.; JOHNSON, D. B.; JRROBERTS, A. T. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. **Endocrine Reviews,** v.16, p.143-163, 1995.

LI, X.; O`MALLEY, B. W. Unfolding the action of progesterone receptors**. Journal of Biological Chemistry,** v. 278, p. 39261-39264, 2003.

LI, Y.; MARTIN, L. D.; SPIZZ, G.; ADLER, K. B. MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells in vitro. **Journal of Biological Chemistry, v.** 276, p.40982- 40990, 2001.

LIU, L., WANG, J.; ZHAO, L.; NILSEN, J.; MCCLURE, K.; WONG, K.; BRINTON, R. D. Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2. **Endocrinology,** v. 150, p.3186-3196, 2009.

LINGHAM, R. B.; STANCEL, G. M.; LOOSE-MITCHELL, D. S. Estrogen induction of the epidermal growth factor receptor mRNA. **Molecular Endocrinology,** v. 2, p.230-235, 1988.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGE. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods,** v.25, p.402-408, 2001.

LOOSFELT, H.; ATGER, M.; MISRAHI, M.; GUIOCHON-MANTEL, A.; MERIEL, C.; LOGEAT, F.; BENAROUS, R..; MILGRON, E. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. **Procedings of the National Academy of the United States of America,** v. 83, p. 9045-9049, 1986.

LÖSEL, R. M.; BESONG, D.; PELUSO, J. J.; WEHLING, M. Progesterone receptor membrane component 1-many tasks for a versatile protein. **Steroids**, v. 73, p. 929- 934, 2008.

LUCAS, T. F.; SIU, E. R.; ESTEVES, C. A.; MONTEIRO, H. P.; OLIVEIRA, C. A.; PORTO, C. S.; LAZARI, M. F. 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. **Biology of Reproduction,** v. 78, p. 101-114, 2008.

LUCIA, R. F. S.; PEREIRA, F. V.; NOGUEIRA, G. P. Follicular population in precocious and non precocious Nellore heifers during prepubertal period. **Theriogenolgy,** v. 57, p. 603, 2002.

LUCIANO, A. M.; PELUSO, J. J. PGRMC1 and the faithful progression through mitosis and meiosis. **Cell Cycle,** v.15, p.2239-2240, 2016.

LUCIANO, A. M.; CORBANI, D.; LODDE, V.; TESSARO, I.; FRANCIOSI, F.; PELUSO, J. J.; MODINA, S. Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle. **European Journal of Histochemistry,** v. 55, p. 145-150, 2011.

LUCIANO, A.M.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F.; CECILIANI, F.; PELUSO, J. J. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. **Reproduction,** v.140, p.663-672, 2010.

MACHADO, P. F. A.; BERGMANN, J. A. G.; PEREIRA, J. C. C.; SILVA, M. A. Predição da taxa de gestação de novilhas da raça Nelore acasaladas com um ano de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 53, n. 2, p.1, 2001.

MAEDA, Y.; OHTSUKA, H.; TOMIOKA, M.; OIKAWA, M. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. **Veterinary Research Communications,** v.37, p.43-49, 2013.

MAGOFFIN, D. A. The ovarian androgen-producing cells: a 2001 perspective. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders,** v.3, p. 47-53, 2002.

MARSON, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; MIRANDA NETO, T. Puberdade e maturidade sexual em novilhas de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v. 28, p, 1-64, 2004.

MATIAS, P. M.; DONNER, P.; COELHO, R.; THOMAS, M.; PEIXOTO, C.; MACEDO, S.; OTTO,N.; JOSCHKO, S.; SCHOLZ, P.; WEGG,A.; BASLER, S.; SCHAFER, M.; EGNER, U.; CARRONDO, M. A. Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations. **Journal of Biological Chemistry,** v. 275, p. 26164-26171, 2000.

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

MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E.; BURATINI, J.R.E.; BINELLI, M.; LAUFER-AMORIM, R.; FERREIRA, J. C. P. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in nelore (*Bos Taurus indicus*) cows. **Reproduction of Domestic Animals,** v. 43, p. 415-421, 2008.

MCEWAN, I. J. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. **Endocrine Related-Cancer,** v.11, 281-293, 2004.

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

MEDINA, C. L.; NAGATANI, S.; DARLING, T. A.; BULCHOLTZ, D. C.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K. I.; FOSTER, D. L. Glucose availability modulates the timing of the luteinizing hormone surge in the ewe. **The Journal of endocrinology,** v. 10, p. 785-792, 1998.

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

MEIKLE, A.; SAHLIN, L.; FERRARIS, A.; MASIRONI, B.; BLANC, J. E.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; RODRIGUEZ-PINON, M.; KINDAHL,H.; FORABERG, M. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor alpha, progesterone receptor and insuline-like growth factor-I (IGF-1) throughout the bovine oestrus cycle. **Animal Reproduction Science,** v. 68, p.45-56, 2001.

MERICSKAY, M.; KITAJEWSKI, J.; SASSOON, D. Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. **Development,** v.131, p.2061-72, 2004.

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. B.; 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.2, p.1-12, 2015.

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. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. **Theriogenology,** v. 81, p. 861- 869, 2014.

MEYER, M. E.; QUIRIN-STRICKER, C.; LEROUG, T.; BOCQUEL., M. T.; GRONEMEYER, H. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforme. **Journal of Biological Chemistry,** v. 267, n. 25, p. 10882-10887, 1992.

MICHAEL, D. D.; ALVAREZ, I. M.; OCÓN, O. M.; POWELL, A. M.; TALBOT, N. C.; JOHNSON, S. E.; EALY, A. D. Fibroblast growth factor-2 is expressed by the bovine uterus and stimulates interferon-τ production in bovine trophectoderm. **Endocrinology,** v.147, p.3571-3576, 2006.

MISRAHI, M.; NENENCIE, P. Y.; SAUGIER-VEBER, P.; SAR, S.; DESSEN, P., MILGROM. Structure of the human progesterone receptor gene. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression,** v. 1216, p. 289-292, 1993.

MOSCATELLI, D. High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology,** v. 131, p.123–130, 1987.

MOSCATELLI, D.; PRESTA, M.; RIFKIN, D. B. Purification of a factor from human placenta that stimulates endothelial cell protease production, DNA synthesis and migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p.2091–2095, 1986.

MOHAMMADI, M.; DIKIC, I.; SOROKIN, A.; BURGESS, W. H.; JAYE, M.; SCHLESSINGER, J. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. **Molecular Cell Biology,** v. 16, n.3, p. 977-989, 1996.

MOLLER, B.; RASMUSSEN, C.; LINDBLOM, B.; OLOVSSON, M. Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction,** v.7, p. 65–72, 2001.

MOLEY, K. H.; CHI, M. M.; KNUDSON, C. M.; KORSMEYER, S .J.; MUECKLER, M. M. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. **Nature Medicine,** v. 4, p. 1421-1424, 1998.

MOORE, J. T.; PARK, K.; IN, Y.; PARK-SARGE, O.K. Characterization of estrogen receptor-beta isoforms. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 247, p. 75-78, 1998.

MONTEIRO, C. M. R.; FARIAS, E. C.; PERRI, S. H. V.; SOUZA, W. M. Estudo anatômico comparative do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas Nelore *(Bos primigenius indicus).* **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v.38, p.13-16, 2001.

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

MORAIS DA SILVA, S.; HACKER, A.; HARLEY, V.; GOODFELLOW, P.; SWAIN, A.; LOELL-BADGE, R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. **Nature Genetics,** v.14, p.62-68, 1996.

MORAN, C.; QUIRKE, J. F.; ROCHE, J. F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science,** v. 18, p 167-182, 1989.

MOTE, P. A.; ARNETT-MANSFIELD, R. L.; GAVA, N.; DEFAZIO, A.; MULAC-JERICEVIC, B.; CONNEELY, O. M.; CLARKE, C. L. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. **Endocrinology,** v. 147, p. 5503-5512, 2006.

NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; NAKAO, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Changes in concentrations of plasma imunoreactive follicle-stimulating hormone luteinizing, estradiol, testosterone, progesterone and inhibin in heifers from birth to puberty. **Domestic Animal Endocrinology,** v.18, p. 57-69, 2000.

NEBERT, D. W., ADESNIK, M., COON, M. J., ESTABROOK, R. W. GONZALEZ, F. J., GUENGERICH, F.P., GUNSALUS, I. C., JOHNSON, E. F., KEMPER, B., LEVIN, W., PHILLIPS, I. R.; SATO, R.; WATERMAN, M. R. The P450 gene superfamily:recommended nomenclature. **DNA,** v. 6, p.1-11, 1987.

NEUBAUER, H.; ADAM, G.; SEEGER, H.; MUECK, A O.; SOLOMAYER, E.; WALLWIENER, D.; CAHILL, M. A.; FEHM, T. Membrane-initiated effects of

progesterone on proliferation and activation of VEGF in breast cancer cells. **Climacteric,** v.12, p.230-239, 2009.

NILSSON-EHLE, P.; GARFINKEL, A. S.; SCHOTZ. M. C. Lipolytic enzymes and plasma lipoprotein metabolism. **Annual Review of Biochemistry,** v. 49, p.667-693, 1980.
NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American Bos indicus (Zebu) cattle. **Animalreproduction science**, v. 82-83, p. 361–72, jul. 2004.

NOGUEIRA, G. P.; GHINTHER, O. J. Dinamics of follicle population and gonadotropin concentrations in fillies age two to ten months. **Equine Veterinary Journal,** v. 32, n.6, p. 482-488, 2000.

O'MALLEY, B. W; CONNEELY, O. M. Orphan receptors: in search of a unifying hypothesis for activation. **Molecular Endocrinology,** v. 6, p. 1359–1361, 1992.

OTT, T.L.; MIRANDO, M.A.; STEVENS, C.; HARNEY, J.P.; OGLE, T.F.; BAZER, F.W. Changes in progesterone and oestrogen receptor mRNA and protein during maternal recognition of pregnancy and luteolysis in ewes. **Journal of Molecular Endocrinology,** v. 10, p. 171–183, 1993.

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

OWENS, F. N.; DUBESKI, P.; HANSON, C. F. Factors that alter the growth and development of ruminants**. Journal of Animal Science,** v. 71, p. 3138-3150, 1993.

PADUA, M. B.; HANSEN, P. J. Evolution and function of the uterines serpins (SERPINA 14). **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64,n.4, p.265-274, 2010.

PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPER, G.G.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.; KUSHNER, P.J.; SACANIAN, T. S. Differential ligand activation of estrogen receptors Era and Erb at AP1 sites. **Science,** v. 277, p. 1508-1510, 1997.

PARTANEN, J.; MAKELA, T. P.; EEROLA, E.; KORHONEN, J.; HIRVONEN, H.; CLAESSON- WELSH, L. ALITALO, K. FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern. **Journal of European Molecular Biology Organization,** v.10, p.1347–1354, 1991.

PATTERSON, D. J.; WOOD, S. L.; RANDLE, R. F. 1999. Procedures that support reproductive management of replacement beef heifers. Proc. Am. Soc. Anim. Science., 1999. Disponível em: http://www.asas.org/symposia/9899proc/0902.pdf. Acessado em 25/03/2015.

PATTERSON, D.J.; PERRY, R.C.; KIRAKOFE, G.H.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R. B.; CORAH, L. R. Management considerations in heifer development and puberty. **Journal of Animal Science,** v.70, n.12, p.4018- 4035, 1992.

PRADO, L. S.; QUEIROZ, G. R.; KOETZ JUNIOR, C.; BARCA JUNIOR, F. A.; CUNHA FILHO, L. F. C. Avaliação da taxa de concepção em novilhas submetidas a inseminação artificial em tempo fixo após um protocolo de pré-sincronização com progesterona. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde,** v. 11, n.3, p.37-39, 2009.

PEDRAM, A.; RAZANDI, M.; LEVIN, E. R. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. **Molecular Endocrinology,** v. 20, n. 9, p. 1996-2009, 2006.

PFEIFER, L.; SIQUEIRA, L.; MAPLETOFT, R.; KASTELIC, J.; ADAMS, G.; COLAZO, M.; SINGH J. 2009. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology,** v.72, n.8, p.1054–1064, 2009.

PELUSO, J. J.; LODDE, V.; LIU, X. Progesterone regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) sumoylation and transcriptional activity in spontaneously immortalized granulosa cells. **Endocrinology,** v.153, p.3929-3939, 2012.

PELUSO, J. J.; LIU, X.; GAWKOWSKA, A.; LODDE, V.; WU, C. A. Progesterone inhibits apoptosis in part by PGRMC1-regulated gene expression. **Molecular and Cellular Endocrinology,** v.320, p.153-161, 2010.

PELUSO, J. J.; PAPPALARDO, A.; LOSEL, R.; WEHLING M. Progesterone membrane receptor componente 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. **Endocrinology,** v. 147, p.3133-3140, 2006.

PEPPER, M.S.; MANDRIOTA, S. J. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) expression in vascular endothelial cells. **Experimental Cell Research,** v.241, p.414–425, 1998.

PEPPER, M. S.; FERRARA, N.; ORCI, L.; MONTESANO, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. **Biochemical Biophysical Research Communications,** v. 189, p.824–831, 1992.

PETROVIC, M.P.; PETROVIC, V.P.; MUSLIC, D.R.; MAKSIMOVIC, N.; ILIC, Z.; MILOSEVIC, B.; STOJKOVIC, J. Some important factors affecting fertility in sheep. **Biotecnhology in Animal Husbandry,** v. 28, n. 3, p.517-528, 2012.

PERROT-APPLANT, M.; DENG, M.; FERNANDEZ, H.; LELAIDIER, C.; MEDURI, G.; BOUCHARD, P. Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,** v.78, n.1, p.216-224, 1994.

PERROT-APPLANAT, M.; LOGEAT, F.; GROYER, P. M.; MILGROM, E. Imunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies. **Endocrinology**, v. 116, n.4, p. 1473-1484, 1985.

PRELICH, G.; TAN, C. K.; KOSTURA, M.; MATTHEW, K.; MATHEWS, M. B.; SO, A. G.; DOWNEY, K. M.; STILLMAN, B. Functional identity of "proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-J auxiliary protein. **Nature,** v.326, p.517-520, 1987.

PRESS, M. F.; GREENE, G. L. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, n. 3, p. 1165-1175, 1988.

PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female Reproductive System. In: DELLMANN, H.D.; EURELL, J. **Textbook of Veterinary Histology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998. p. 247-286.

PIEL, R. B.; SHIFERAW, M. T.; VASHISHT, A. A.; MARCERO, J. R.; PRAISSMAN, J. L.; PHILLIPS, J. D.; WOHLSCHLEGEL, J. A.; MEDLOCK, A. E. A novel role for progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): a partner and regulator of ferrochelatase. **Biochemistry**, v. 37, p.5204-5217, 2016.

PONGLIKITMONGKOL, M.; GREEN, S.; CHAMBOM, P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. **The Embo Journal,** v.7, p. 3385-3388, 1988.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology,** v.7, p.715–726, 2011.

PROLO, P.; WONG, M. L.; LICINIO, J. Leptin. **Journal of Biochemistry and Cell Biology,** v.30, p.1285-1290, 1998.

QUINN, J. A.; GRAEBER, C. T.; FRACKELTON, A. R.; KIM, M.; SCHWARZBAUER, J. E.; FILARD, E. J. Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G-protein-coupled receptor, GPR30. **Molecular Endocrinology,** v. 23, p.1052–1064, 2009.

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. 39, p. 1-10, 2015.

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, p. 584-594, 2014.

RAMBAGS, B. P.; van TOL, H, T.; van den ENG, M. M.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T. A. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. **Theriogenology,** v. 69, p.366-375, 2008.

RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P. M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle sheep and goats. **Animal Reproduction Science,** v. 78, p. 259-270, 2003.

RAMIREZ, D. V.; MCCANN, S. M. Comparison of the regulation of LH secretion in immature and adult rats. **Endocrinology,** v. 72, p. 452-464, 1963.

RAZANDI, M.; PEDRAM, A.; GREENE, G.; LEVIN, E. R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. **Molecular Endocrinology,** v. 13, n. 2, p. 307-319, 1999.

REILAND, J.; RAPRAEGER, A. C. Heparan sulfate proteoglycan and FGF receptor target basic FGF to different intracellular destinations. **Journal of Cell Science,** v. 105, p.1085–1093, 1993.

RESTLE, J.; PORTA, M. A.; SENNA, D. B. Desempenho reprodutivo de novilhas de diferentes grupos genéticos submetidas previamente a duas idades ao desmame. In: 29ª REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Lavras. **Anais…**Viçosa: SBZ, 1992. P. 219.

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. M.; BETTERIDGE, K. J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 95, n. 2, p.585-95, 1992.

RIBEIRO, R. C. J.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annual Review of Medicine,** v. 46, p.443-453, 1995.

ROBINSON, J. J.; ASHWORTH. C.J.; ROOKE, J.A.; MITCHELL, L.M.; MCEVOY T.G. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology.** v.126, p.259-276, 2006.

ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E. WATHES. D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in the uterine biopsy samples throughout the oestrus cycle and early pregnancy in cows. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 122, p. 965-979, 2001.

RODRIGUES, A. D. P.; PERES, R. F. G.; LEMES, A. P.; MARTINS, T.; PEREIRA, M. H. C.; CARVALHO, E. R.; DAY, M. L.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of interval from induction of puberty to initiation of a timed AI protocol on pregnancy rate in Nellore heifers. **Theriogenology,** v. 82, n. 5, p. 760–6, 15 set. 2014.

RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction,** v. 66, p. 603-609, 2002.

RODRIGUEZ, R. E.; WISE, M. E. Advancement of postnatal pulsatilite luteinizing hormone secretion in the bull calf by pulsatile administration of gonadotropin realising hormone during infantile development. **Biology of Reproduction,** v. 44, p. 603-609, 1991.

ROJELI, S.; KLAGSBRUN, M.; ATZMON, R.; KUROKAWA, M.; HAIMOVITZ, A.; FUKS, Z.; VLODAVSKI. I. Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix

component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells. **Journal of Cell Biology,** v. 109, p. 823–831, 1989.

ROSENFELD, C. S.; ROBERTS, R. M.; LUBAHN, D. B. Estrogen receptor- and aromatase-deficient mice provide insight into the roles of estrogen within the ovary and uterus. **Molecular Reproduction and Development,** v.59, p. 336–346, 2001.

SÁ FILHO, M. F.; NASSER, L. F. T.; PENTEADO, L.; PRESTES, R.; MARQUES, M. O.; FREITAS, B. G.; MONTEIRO, B. M.; FERREIRA, R. M.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S. Impact of progesterone and estradiol treatment before the onset of the breeding period on reproductive performance of Bos indicus beef heifers. **Animal Reproduction Science,** v.160, p.30-39, 2015.

SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; MEDALHA, A. G.; BARUSELLI, P. S. IATF em novilha. In: 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. **Anais...**3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina-PR, 2008.

SÁ FILHO, O. G.; VALARELLI, R. L.; PERES, R. F. G.; HOE, F. G. H.; MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J. L. M. Avaliação do uso de acetato de melengestrol (MGA® Premix) em vacas de corte. **A Hora Veterinária,** Porto Alegre, n. 158, p. 1-5, 2007.

SANJOY, K. D.; HIROKO, T.; BIBHASH, C.; P, G. K. A.; SUDHANSU, K. D. Differential Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) Gene and Regulation of EGF-R Bioactivity by Progesterone and Estrogen in the Adult Mouse Uterus, **Endocrinology,** v. 134, n.2, p. 971-981, 1994.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (Bos indicus) heifers and cows. **Theriogenology,** v.63, p.2382-2394, 2005.

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

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

SHARMA, R. D.; NANDA, B. S.; SAIGAL, R. P.; KHATRA, G. S.; GUPTA, S. K. Histomorphological and histochemical studies of placentome and expelled foetal membranes of buffalo. **Indian Journal Animal Science,** v.53, p.964-967, 1983.

SACK, J. S.; KISH, K. F.; WANG, C.; ATTAR, R.M.; KIEFER, S. E.; AN,Y.; WU, G. Y.; WU, G.Y.; SCHEFFLER, J.E.; SALVATI, M. E.; KRYSTEK, S.R. Jr.; WEINMANN, R.; EINSPAHR, H. M. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone.

Procedings of the National Academy of the United States of America, v. 98, p. 4904-4909, 2001.

SANDEN, C.; BROSELID, D. S.; CORNMARK, L.; ANDERSON, K.; DASZKIEWICZ-NILSON, J.; MARTENSSON, U. E. A.; OLDE, B.; LUNDENBERG-LEFB, L. M. G-protein-coupled estrogen receptor 1/G-protein-coupled receptor 30 localizes in the plasma membrane and traffics intracellularly on cytokeratin intermediate filaments. **Molecular Pharmacology,** v. 79, p.400–410, 2011.

SCHAMS, D. E.; SCHALLENBERGER, E.; GOMBE, S.; KARG, H. Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 30, p. 103, 1981.

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

SCHLESSINGER, J.; PLOTNIKOV, A. N.; SCHLESSINGER J.; PLOTNIKOV A.N.; IBRAHIMI O. A.; ELISEENKOVA, A. V.; YEH, B. K., YAYON A., LINHARDT R.J.; MOHAMMADI M**.** Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. **Molecular Cell,** v. 6, n. 3, p.743-750, 2000.

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

SEGHEZZI, G.; PATEL, S; REN, C. J.; GUALANDRIS, A. PINTUCCI, G.; ROBBINS, E. S.; SHAPIRO, R. L.; GALLOWAY, A. C.; RIFKIN, D. B.; MIGNATTI P. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. **Journal of Cell Biology,** v.141. p.1659-1673, 1988.

SHARKEY, A. M.; SMITH, S. K. The endometrium as a cause of implantation failure. **Clinic Obstetetric and Gynaecology,** v. 17, p. 289-307, 2003.

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

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

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience,** v. 7, p. 1879– 1898, 2002.

STEFAFICZYK-KRZYMOWSKA, S.; SKIPOR, J.; GRZEGORZEWSKI, W.; WASOWSKA, B.; KRZYMOWSKI, T. The local elevation of estrone and androstenedione

concentrations in the blood supplying the oviduct and uterus on days 17-18 of the estrous cycle of the gilts. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 33, n. 1, p. 39-43, 1998.

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

SMITH, S. K. Angiogeneses, vascular endothelial growth factor and endometrium. **Human Reproduction Update,** v.4, n.5, P.509-519, 1998.

SHIFREN, J. L.; TSENG, J. F.; ZALOUDEK, C. J.; RYAN, I P.; MENG, Y. G.; FERRARA, N.; JAFFE, R B.; TAYLOR, R. N. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth fator in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism,** v. 81, p-3112– 3118, 1996.

SAINT-DIZIER, M.; SANDRA, O.; PLOYART, S.; CHEBROUT, M.; CONSTANT, F. Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cyclic and pregnant cows during the post-ovulation period. **Reproductive Biology and Endocrinology,** v.76, p. 1-12, 2012.

SELLKE, F. W.; LAHAM, R. J.; EDELMAN, E. R.; PEARLMAN, J. D.; SIMONS, M. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early results. **Annals of Thoracic Surgery,** v.65, p.1540-1544, 1998.

SAVOURET, J. F.; MISRAHI, M.; MILGROM. Molecular action of progesterone. **International Journal of Biochemistry,** v. 22, p.579-594, 1990.

SEMMELMANN, C. E. N.; LOBATO, J. F. P.; ROCHA, M. G. Efeitos de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 30, n.3, p. 835-843, 2001.

STEWART, M. D.; JOHNSON, G. A.; GRAY, C. A.; BURGHARDT, R. C.; SCHULER, L. A.; JOYCE, M. M.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Prolactin receptor and uterine milk protein expression in the ovine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction,** v.62, p.1779-1789, 2000.

SHIBATA, M; TERADA, F. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. In: Review article. **Animal Science Journal**, v.81, p.2-10, 2010.

SILVA, J.A.V.; Van MELIS, M.H.; ELER, J.P. et al. Estimação de parâmetros genéticos para probabilidade de prenhez aos 14 meses e altura na garupa em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.32, n.5, p.1141-1146, 2003.

SILVA, L. F. P.E.; CARVALHO, M. V.; DINIZ-MAGALHÃES, J. **Crescimento e puberdade de novilhas zebuínas.** In: Santos, M. V.; RENNO, F. P.; SILVA, L. F. P.; ALBUQUERQUE, R.. (Org). Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal. 1 ed. Pirassununga: Editora 5D, 2009, v. 1, p. 162-190.

SILVA, L. F. P. E.; MAGALHAES, J. D.; SOUSA, D. O. ; CONSOLO, N. R. B. ; FERRARI, V. B. ; SOUSA, R. T. ; FRASSETO, M. O. ; SOUZA, J. M. . Sistema intensivo de produção para cria, recria e engorda: avaliação produtiva e econômica. **In: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos (6º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada)**, 2014, Londrina-Paraná. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, 2014. p. 1-14.

SISSON, S. Aparelho Urogenital. In: GETTY, R. **Anatomia dos Animais Domésticos.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. cap. 31, p.879 - 895.

SILVEIRA, A. C.; ARRIGONI, M. B.; OLIVEIRA, H. N.; COSTA, C.; CHARDULO, L. A. L.; SILVEIRA, L. G. G. MARTINS, C. L. Produção do novilho superprecoce. In: Simpósio de produção de gado de corte 2.Disponível em: http://www.simcorte.com/index/Palestras/s_simcorte/04_silveira.PDF. Acesso: 26/01/2015.

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

SPENCER, T. E.; BAZER, F.W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience,** v. 7, p. 1879-1898, 2002.

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

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

STEINER, R. A.; CAMERON, J. L.; MCNEILL, T. H.; CLIFTON, D. K.; BREMNER, W. J. In: **Neuroendocrine Aspects of Reproduction,** pp. 183-227 [R. L. Norman, editor]. New York: Academic Press, 1983.

STYGAR, A. H.; KRISTENSEN, A. R.; MAKULSKA, J. Optimal management of replacement heifers in a beef herd: A model for simultaneous optimization of rearing and breeding decisions. **Journal of animal science**, v. 92, p. 3636–3649, 1 jul. 2014.

STINSON, M.W.; WEBER, A.F.; ZEMJAMIS, R. The Bovine Endometrium – An Electron Microscopic Study. **American Journal of Veterinary Research,** v. 23, n. 97, p. 1164-1182, 1962.

SWIATEK-DE LANGE, M.; STAMPFL A.; HAUCK, S. M.; ZISCHKA, H.; GLOECKNER, C. J.; DEEG, C. A.; UEFFING, M. Membrane-initiated effects of progesterone on calcium dependent signaling and activation of VEGF gene expression in retinal glial cells. **Glia,** v.55, p.1061-1073, 2007.

SHORT, R. E.; STAIGMILLER, R. B.; BELLOWS, R. A.; GREER, R. C. Breeding heifers at one year of age: biological and economic considerations. In: Annual Beef Cattle Short

Course, 39., 1990. Gainesville (FL). **Proceedings...** Florida: University of Florida; 1990. p. 93–106.

SLONINA, D.; KOWALIK, M. K.; KOTWICA, J. Expression of progesterone receptor membrane component 1, serpine mRNA binding protein 1 and nuclear progesterone receptor isoforms A and B in the bovine myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Development,** v. 58, p.288-294, 2012.

SURVEYOR, G. A.; GENDLER, S. J.; PEMBERTON, L.; DAS, S. K.; CHAKRABORTY, I.; JULIAN, J.; PIMENTAL, R. A.; WEGNER, C. C.; DEY, S. K.; CARSON, D. D. Expression and steroid hormonal control of MUC1 in the mouse uterus. **Endocrinology,** v.136:3639-3647, 1995.

SMIT, A. F. A.; HUBLEY, R.; GREEN, P. 1996–2010. RepeatMasker Open-3.0. See http://www. repeatmasker. org.

SUZUKI, A.; MIZUNO, K.; INO, Y.; OKADA, M.; KIKKAWA, F.; MITZUTANI, S.; TOMODA Y. Effects of 17-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro. **Cardiovascular Research,** v.31, p.516-523, 1996.

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

TAN, J.; PARIA, B. C.; DEY, S.K.; DAS, S. K. Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. **Endocrinology,** v.140, p. 5310-5321, 1999.

TAUCK, S. A.; WILKINSON, J. R.; OLSEN, J. R.; JANITELL, J. N.; BERARDINELLI, J. G. Comparasion of controlled internal drug release device and melengesterol acetate as progestin sources in an estrous synchonization protocol for beef heifers. **Theriogenology,** v.68, p-162-167, 2007.

TAHIR, M. Z.; REYNAUD, K.; MAWA, G.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S.; SAINT-DIZIE, M. Immunolocalization of progesterone receptors in the canine oviduct around ovulation. **Reproduction of Domestics Animals,** v.47, p-35-39, 2012.

TAYLOR, K.M.; GRAY, C. A.; JOYCE, M. M.; STEWART, M. D.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Neonatal ovine uterine development involves alterations in expression of receptors for estrogen, progesterone and prolactin. **Biology of Reproduction,** v.63, p. 1192-1204, 2000.

TEIXEIRA, R. A. **Comparações bio-econômicas entre dois sistemas de produção com diferentes níveis de fertilidade em rebanho Nelore a pasto.** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1997, 42p. Monografia (Graduação em Zootecnia)-Universidade Estadual Paulista, 1997.

TERRAND, J.; BRUBAN, V.; ZHOU, L.; GONG W, EL ASMAR Z, MAY P, ZURHOVE K, HAFFNER P, PHILIPPE C, WOLDT E.; MATZ, R. L.; GRACIA, C. L.; METZGER, D.; AUWERX, J, JOACHIM HERZ, J; BOUCHER, P. LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. **Journal of Biological Chemistry,** v. 284, p.381-388, 2009.

TOMOOKA, Y.; DIAUGUSTINE, R. P.; MCLACHLAN, J. A. Proliferation of mouse uterine epithelial cells *in vitro*. **Endocrinology,** v. 118, p.1011-1018, 1986.

SPONCHIADO, M. **O ambiente periovulatório modula a expressão gênica e o funcionamento do endométrio no início do ciclo estral em bovinos.** Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2015. 69f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Reprodução Animal)-Universidade de São Paulo, 2015.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocrine Reviews,** v. 22, p. 111-151, 2001.

TERZAGHI, L.; TESSARO, I.; RAUCCI, F.; MERICO, V.; MAZZINI, G.; GARAGNA, S.; ZUCCOTTI, M.; FRANCIOSI, F.; LODDE, V. PGRMC1 participates in late events of bovine granulosa cells mitosis and oocyte meiosis. **Cell Cycle,** v. 15, p.19-32, 2016.

TIBBETTS, T.A.; MENDOZA-MENESES, M.; O`MALLEY, B. W.; CONNEELY, O.M. Estrogen induces progesterone receptor expression in the mouse uterus. **Biology of Reproduction,** v.59, p. 1143-1152, 1998.

TOLEDO, E. M.; COLOMBRES, M.; INESTROSA, N. C. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. **Progress in Neurobiology**, v.86, p. 281-296, 2008.

TORA, L.; GRONEMEYER, H.; TURCOTTE, B.; GAUB, M. P.; CHAMBON P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. **Nature,** v.333, n. 185–188, 1988.

TULAC, S.; NAYAK, N. R.; KAO, L. C.; VAN WAES, M.; HUANG, J.; LOBO, S.; GERMEYER, A.; LESSEY, B. A.; TAYLOR, R.N.; SUCHANEK, E. GIUDICE, L.C. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism,** v. 88, p.3860-6, 2003.

ULBRICH, S. E.; MEYER, S. U.; ZITTA, K.; HIENDLEDER, S.; SINOWATZ, F.; BAUERSACHS, S.; BÜTTNER, M.; FRÖHLICH, T.; ARNOLD, G. J.; REICHENBACH, H. D.; MEYER, H. H. D.; WOLF, E. Bovine endometrial metallopeptidases MMP14 and MMP2 and the metallopeptidase inhibitor TIMP2 participate in maternal preparation of pregnancy. **Molecular Cellular Endocrinology,** v. 332, p. 48-57, 2011.

ULBRICH, S. E.; FROHLICH, T.; SCHULK, K.; ENGLBERGER, E.; WALDSCHMITT, N.; ARNOLD, G. J.; REICHENBACH, H. D.; REICHENBACH, M; WOLF, E.; MEYER, H. H. D.; BAUERSACHS, S. Evidence for Estrogen-Dependent Uterine Serpin (SERPINA 14)

expression during estrus in the bovine endometrial glandular epithelium and lumen. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 795-805, 2009.

ULDRY, M.; THORENS, B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. **Pflugers Archiv,** v. 447, p.480-489, 2004.

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

VAICIUNAS, A.; COUTINHO, L. L.; MEIRELLES, F. V.; PIRES, A. V.; SILVA, L. P. F. Leptin and hypothalamic gene expression in early-and late-maturing *Bos indicus* Nellore heifers. **Genetics and Molecular Biology,** v. 31, n.3, p. 657-664, 2008.

VEGETO, E.; SHAHBAZ, M. M.; WEN, D X.; GOLDMAN, M. E.; O'MALLEY, B. W.; MCDONNELL, D. P. Human progesterone receptor A form is a cell and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. **Molecular Endocrinology,** v.7, p.1244–1255, 1993.

VERHEYEN, E. M.; GOTTARDI, C .J. Regulation of Wnt/ß-catenin signaling by protein kinases. **Developmental Dynamics,** v. 239, p. 34-44, 2010.

VLODAVSKY, I.; FOLKMAN, J.; SULLIVAN, R.; FRIDMAN, R.; ISHAI-MICHAELI, R.; SASSE, J.; KLAGSBRUN, M. Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. **Procedings of the National Academy of the United States of America,** v. 84, p.2292–2296, 1987.

WAGNER, R. L.; APRILETTI, J. W.; McGRATH, M. E.; WEST, B. L.; BAXTER, J. D.; FLETTERICK. R. J. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. **Nature,** v. 378, p. 690-697, 1995.

WANG, H.; MASIRONI, B.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. A comparative study of estrogen receptors α and β in the rat uterus. **Biology of Reproduction,** v. 61, p. 955- 964, 1999.
WATHES D. C.; HAMON M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. **Journal of Endocrinology,** v.138, p. 479-491, 1993.

WEERARATNA, A. T., JIANG, Y., HOSTETTER, G., ROSENBLATT, K., DURAY, P., BITTNER, M. AND TRENT, J. M. Wnt5a signalling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. **Cancer Cell,** v.1, 279–288, 2002.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science,** v. 82, p. 63-74, 2004.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GAVERICK, H. A.; ARSMSTRONG, D. G. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Supplement,** n. 61, p. 71-90, 2003.

WEI, L. L.; HAWKINS, P.; BAKER, C.; NORRIS, B.; SHERIDAN, P. L.; QUINN, P. G. An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. **Molecular Endocrinology,** v. 10, p.1379–1387, 1996.

WEI, L. L.; GONZALEZ-ALLER, C.; WOOD, W. M.; MILLER, L. A.; HORWITZ, K. B. 5-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. **Molecular Endocrinology,** v. 4, p.1833–1840, 1990.

WEIHUA, Z., SAJI, S., MAKINEN, S., CHENG, G., JENSEN, E. V., WARNER,M., GUSTAFASSON, J.A. Estrogen receptor (ER) beta, a modular of ER alpha in the uterus. **Procedings of the National Academy of the United States of America,** v. 97, p. 5936-5941, 2000.

WILTBANK, J. N.; KASSON, C. W.; INGALLS, J. E. Puberty in crossbred and straightbred beef heifers on two levels of feed. **Journal of Animal Science,** v. 29, p. 602-05, 1969.

WILTBANK, J. N.; ROBERTS, S.; NIX, J.; ROWDEN, L. Reproductive performance and probality of heifers fed to weight 272 or 318 kg the start of the first breeding season. **Journal of Animal Science,** v.60, p.25-34, 1985.

WILTBANK, J. N.; GREGORY, K. E.; SWIGER, L. A.; INGALLS, J. E.;ROTHLISBERGER, J. A.; KOCH, R. M. Effects of heterosis on age and weight at puberty in beef heifers. **Journal of animal science**, v. 25, n. 3, p. 744–751, 1966.

WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T.; WLFE, P.L.; DAY, M. L.; KOCH, R. M.; KINDER, J. E. Effect of selection for growth traits on age and weight at puberty in bovine females. **Journal of Animal Science,** v.68, n.6, p.1595-1602, 1990.

WU, W.; SHI, S. Q.; HUANG, H. J.; BALDUCCI, J.; GARFIELD, R. E. Changes in PGRMC1, a potential progesterone receptor, in human myometrium during pregnancy and labour at term and preterm. **Molecular Human Reproduction,** v.17, p.233-242, 2011.

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

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A, YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction,** v. 53, p.951–957, 1995.

YANG, L.; YU, W.; YAN, W. L.; PENG, G. Expression of insulinlike growth factor 2 receptor (IGF2R), leptin receptor (LEPR) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) mRNA in human and bovine pregnancies. **Reproduction Fertility and Development,** v. 25, 205-213, 2013.

YAMAKOSHI, S.; BAI, R.; CHAEN, T.; IDETA, A.; AOYAGI, Y.; SAKURAI, T.; KONNO, T.; IMAKAWA, K. Expression of mesenchymal-related genes by the bovine

thophectoderm following conceptus attachment to the endometrial epithelium. **Reproduction,** v.143, p.377-387, 2012.

YASSEN, M. A.; WRENZYCKI, C.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. **Reproduction,** v.122, p.601-610, 2001.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Pospartum acyclicity in suckled beef cows: A review. **Theriogenology,** v. 54, p.25-55, 2000.

YELICH, J. V.; WETTEMAN, R. P.; MARTSON, T. T.; SPICER, L. J. Luteinizing hormone, growth hormone, IGF-I, insulin, and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. **Domestic Animal Endocrinology,** v. 13, p.325-338, 1996.

YAYON, A.; KLAGSBRUN, M.; ESKO, J. D.; LEDER, P; ORNITZ, D. M. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. **Cell,** v. 64, p. 841–848, 1991.

ZHANG, L.; KANDA, Y.; ROBERTS, D, J.; ECKER, J. L.; LOSEL, R.; WEHLING, M.; PELUSO, J. J.; PRU, J. K. Expression of progesterone receptor membrane component 1 and its partner serpine 1 mRNA binding protein in uterine and placental tissues of the mouse and human. **Molecular and Cellular Endocrinology,** v. 287, p.81-89, 2008.

ZHANG, X.; IBRAHIMI, O. A.; OLSEN, S. K.; UMEMORI, H.; MOHAMMADI, M.; ORNITZ, D.M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 281, n.23, p.15694-15700, 2006.

ZERVOUDAKIS, J. T.; PAULINO, M. F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; LANA, R. P; CECON, P. R. Desempenho de novilhas mestiças e parâmetros ruminais em novilhos, suplementados durante o período das águas. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v. 31, n. 2, p. 1050-1058, 2002.

ZIJDERVELD, S.M.;FONKEN, B.; DIJKSTRA, J.; GERRITS, W.J.J.; PERDOK, H.B.; FOKKINK, W.; NEWBOLD, J.R. Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science.** v.94, p.1445-1454, 2011.

ZHU, C.; JIANG, Z.; BAZER, F.W.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; WU, G. Aquaporins in the female reproductive system of mammals. **Frontiers in Bioscience** (Landmark edition) v. 20, p. 838-871, 2014.