UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Fábio Luis Valério Pinaffi

**Aspectos morfológicos, vasculares e endócrinos de prenhez produzidas
por técnicas de reprodução assistida em bovinos.**

Pirassununga/SP

2016

FÁBIO LUIS VALÉRIO PINAFFI

Aspectos morfológicos, vasculares e endócrinos de prenhez produzidas por técnicas de reprodução assistida em bovinos

“Versão corrigida”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em ciências

Departamento:

Medicina Veterinária

Área de Concentração:

Biociência Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P645a Pinaffi, Fábio Luis Valério
Aspectos morfológicos, vasculares e endócrinos de
prenhezes produzidas por técnicas de reprodução
assistida em bovinos / Fábio Luis Valério Pinaffi ;
orientador Luciano Andrade Silva. -- Pirassununga,
2016.
130 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Esteroidogênese. 2. Clone. 3. FIV. 4.
Interferon tau. 5. Parto. I. Silva, Luciano
Andrade, orient. II. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PINAFFI, Fábio Luis Valério

Título: Aspectos morfológicos, vasculares e endócrinos de prenhez produzidas por técnicas de reprodução assistida em bovinos.

.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____
_____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____
_____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____
_____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____
_____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

**À minha família.
Especialmente aos meus pais Sonia e Wagner**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e minha família pelo suporte durante toda essa jornada e por acreditarem nas metas que trilhei em meu caminho. Agradeço imensamente a companhia, conselhos e ajuda financeira que tive de meus pais, Wagner Pinaffi e Sônia R. V. Pinaffi, que mesmo estando longe, foram sempre presentes. Não há palavras para descrever o amor que tenho por vocês. Não posso esquecer também de minhas irmãs Flávia e Juliana, as quais foram e serão grandes exemplos para mim. Acredito que todos seguiram um caminho de sucesso e me sinto honrado por fazer parte dessa família.

Agradeço ao Prof. Luciano A. Silva por ter aberto as portas que me introduziram na pesquisa. Reconheço o Prof. Luciano não só como um educador, mas também como boa pessoa e grande amigo. Devo um imenso agradecimento pelas oportunidades e experiências que pude vivenciar durante todo esse tempo desde a iniciação científica até a conclusão do doutorado.

Durante o longo caminho do doutorado e incontáveis horas passadas no curral não seriam fáceis sem a ajuda e dedicação dos alunos, estagiários e residentes que vivenciaram um pouco a rotina conosco. As lembranças são tantas que levariam páginas para descrever. Agradeço e muito a ajuda de todos e espero ter contribuído com a formação de cada um. Além disso, não posso esquecer de agradecer à dedicação que tive dos funcionários do Campus Fernando Costa da USP como Everson, Zanquetin, Ismael, Ricardo e Paulinho.

O Laboratório de Teriogenologia O. J. Ginther começou pequeno e foi ampliando-se aos poucos até atingir o grupo que é hoje. Devo um imenso agradecimento à Izabelle B. Jardim e Marcelo Oliveira. Durante praticamente todos os experimentos de meu doutorado, os quais incluíram trabalhos árduos e inúmeros problemas. Ambos sempre estiveram dispostos a aprender, persistir no trabalho, discutir e solucionar os problemas. Acredito que o crescimento foi mútuo, sem contar na parceria fora do trabalho. Além disso, devo mencionar que a Izabelle foi a peça chave na condução de todos os experimentos, estando presente sem se importar com as dificuldades. Devo agradecer também à mestranda Bárbara Monteiro por estar sempre muito interessada em aprender e ajudar, demonstrando grande dedicação em tarefas bem complicadas e concluindo todas àquelas que se propôs a realizar. Além dos mestrandos, não posso esquecer ajuda de nosso aluno de iniciação científica o Maurício

Guilherme, sempre presente, disposto e dedicado, sem contar no bom humor que trazia para o trabalho. Tenho certeza que todos terão um grande sucesso profissional.

O trabalho não se resumiu somente ao L. T. O. J. Ginther, sendo essencial a parceria com o Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular coordenado pelo Prof. Mário Binelli. Agradeço ao Prof. Mário pela oportunidade da parceria e disponibilidade de troca de conhecimentos, demonstrando ser um grande exemplo de liderança. Devo agradecer imensamente ao Prof. Guilherme Pugliesi pelas discussões e ideias que resultaram em boa parte da Tese, pela ajuda no trabalho com os dados, assim como pela grande amizade. Também não posso esquecer de todos no LFEM que me ajudaram durante os procedimentos laboratoriais e com as dúvidas de protocolos como Moana França, Thiago Martins, Ângela Gonela, Mariana Sponchiado e Everton Lopes.

Gostaria de agradecer também à parceria com o Laboratório Thompsom de Espectrometria de Massas, em colaboração com Dr. Hélio Martins Júnior, Dra. Rosineide Simas, Dra. Adriana Tarouco, Dra. Cristina Ferreira, Prof. Guilherme Nogueira, Prof. Flávio Meirelles, Prof. Marcos Eberlin e Prof. Felipe Perecin. Ao Prof. Felipe Perecin devo um especial agradecimento pela oportunidade da parceria, assim como a dedicação que resultou em uma grande publicação.

Uma tese não se resume apenas ao trabalho, mas também ao apoio externo de grandes amigos que estiveram presentes nessa jornada. Gostaria de agradecer ao Leonardo Batissaco, pela grande amizade durante toda minha caminhada, e à galera CFH como Rui, Bruno e Rodolfo, os quais fizeram parte de minha etapa por Pirassununga. Além disso devo um especial agradecimento aos amigos presentes desde minha infância como Leo, Jonathas, Evelyn, Lipe, João, Dodo, Marco, Matsui e Luciana, vocês são muito especiais em minha vida.

Por fim não posso deixar de agradecer à pessoa que esteve a meu lado em grande parte dessa jornada, Estela Rose Araújo. Esse agradecimento se deve não apenas ao apoio, mas também à ajuda em boa parte de minhas análises laboratoriais. Muito obrigado por estar ao meu lado, amo muito você.

Muito obrigado à todos!!!

RESUMO

PINAFFI, F. L. V. **Aspectos morfológicos, vasculares e endócrinos de prenhez produzidas por técnicas de reprodução assistida em bovinos.** [Morphological, vascular, and endocrine aspects of pregnancies derived of assisted reproduction techniques in bovines]. 2014. 145 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Perdas embrionárias e alterações gestacionais são frequentemente observadas em prenhez de embriões bovinos manipulados *in vitro*. Sabe-se que tais anormalidades são resultantes de alterações epigenéticas ocasionadas pela manipulação dos gametas e/ou do embrião durante as técnicas de reprodução assistida (ARTs), com destaque para as técnicas de fecundação *in vitro* (FIV) e da clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT). Tais alterações resultam em distúrbios no desenvolvimento do conceito em algum momento crítico entre a fertilização e o parto, fornecendo bons modelos de estudos sobre a fisiopatologia de perdas embrionárias e dos distúrbios de desenvolvimento. Caracterizam-se como momentos críticos após a transferência do embrião (TE) o desenvolvimento embrionário no útero, o reconhecimento materno da gestação, a placentação e o desenvolvimento da placenta e do feto, os quais tem de ser transpassados sem nenhuma falha, permitindo um desenvolvimento normal do conceito até o termo. Sendo assim, o presente trabalho abordou três fases distintas do amplo período gestacional em prenhez por ARTs. O Estudo 1 foi realizado durante o período peri-reconhecimento materno da gestação e objetivou descrever a abundância de expressão de genes estimulados pelo interferon tau (ISGs) de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) maternas em gestações oriundas de ARTs no primeiro mês de gestação; o Estudo 2 compreendeu os primeiros 35 dias de gestação e objetivou descrever as mudanças morfológicas e vasculares do complexo útero-conceito-ovário e o estímulo à expressão de ISGs em PBMCs em gestações de conceitos clonados por SCNT com diferentes fenótipos de desenvolvimento, sendo esses denominados gestação anembrionada e CL persistente; e o Estudo 3 foi conduzido durante o período pré-parto e objetivou descrever as alterações na produção de esteroides sexuais e corticosteroides em gestações produzidas por ARTs. Três hipóteses foram testadas: (1) Gestações de conceitos clonados por SCNT apresentam uma baixa e mais tardia estimulação de ISGs em PBMCs maternas quando comparadas com gestações de conceitos produzidos por FIV e IA; (2) O conceito clonado por SCNT apresenta um menor estímulo sobre mudanças morfológicas e vasculares do complexo útero-ovário e ISGs em PBMCs maternas durante os primeiros 35 dias de gestação, quando comparado com conceitos oriundos de IA; e (3) Gestações de embriões oriundos de ARTs apresentam alterações na dinâmica esteroidogênica no pré-parto quando comparados

com gestações de IA. No estudo 1 foram coletadas amostras de sangue de gestações produzidas por inseminação artificial (IA), FIV e clonagem por SCNT, nos dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 31 pós-ovulação e foi realizada mensuração da abundância de transcritos de ISGs (OAS1 e ISG15) em PBMCs maternas. No estudo 2, gestações produzidas por IA e clonagem por SCNT, foram submetidas a escaneamentos ultrassonográficos dos ovários, útero e concepto a cada 3 dias do dia 14 ao 35 (dia 0 = ovulação) e amostras de sangue foram coletadas nos dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 31 para mensuração da abundância de transcritos de ISGs (OAS1 e ISG15) em PBMCs maternas. No estudo 3, foram coletadas amostras de sangue no último mês em gestações naturais, oriundas de FIV e de clonagem por SCNT para análise hormonal de 10 esteroides utilizando o método de espectrometria de massas multi-hormonal de alta resolução LC-MS/MS. O primeiro estudo mostrou semelhanças na expressão de genes estimulados pelo IFNT em gestações oriundas de ARTs e produzidas por IA. Entretanto, a estimulação nas gestações oriundas de ARTs aparentou ser quatro dias mais prolongada, sugerindo uma maior funcionalidade do trofotoderma em conceptos oriundos de ARTs. O segundo estudo demonstrou um aumento na expressão de ISGs em PBMCs maternas tanto em gestações de conceptos normais quanto em anormais, justificando a manutenção da função luteal mesmo na ausência de detecção do concepto por ultrasonografia. No terceiro estudo, demonstrou-se alterações na esteroidogênese nas gestações de embriões FIV e clonados no último mês de gestação, sendo essas compatíveis com a hiperativação da enzima aromatase durante todo o último mês de gestações oriundas de FIV e hiperativação das enzimas P450C11 e P450C21 trinta dias antes do parto em gestações oriundas de clonagem por SCNT. O presente estudo concluiu que conceptos oriundos de FIV e clonagem por SCNT apresentam um prolongamento no estímulo de ISGs pelo IFNT, conceptos clonados anormais apresentam estímulo de ISGs, o que justifica a manutenção da função luteal, e, por fim, a cascata esteroidonênica que culmina com o parto apresenta-se alterada em gestações oriundas de FIV e clonagem por SCNT.

Palavras-chave: esteroidogênese, clone, FIV, interferon-tau, parto.

ABSTRACT

Pregnancy losses and gestational abnormalities are frequently observed in pregnancies from *in vitro* produced embryos in bovines. It is known that these abnormalities are due to epigenetic changes from the manipulation of gametes and/or embryo during the use of assisted reproduction techniques (ARTs), especially for the *in vitro* fertilization (IVF) and cloning by somatic cells nuclear transfer (SCNT). These changes results in disturbances of conceptus development in any critical stage between the fertilization and parturition, which provides good models for the study of physiopathology of embryo losses and disturbances of development. Critical stages after the embryo transfer (ET) to the uterus are characterized as the maternal recognition of pregnancy, placentation, and fetal-placental development, which needs to be surpassed without failures, in order to develop a normal conceptus until term. Therefore, the present work approached three distinct phases of the wide gestational period in pregnancies from ARTs. The Study 1 was conducted during the maternal peri-recongnition of pregnancy period and aimed to describe the expression of interferon stimulated genes (ISGs) in maternal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in pregnancies derived of ARTs; the Study 2 comprise the first 35 days of pregnancy and aimed to describe morphological and vascular changes of the complex uterus-ovaries-conceptus, as well as the expression of ISGs in maternal PBMCs in pregnancies of conceptus cloned by SCNT with different phenotypes of development, denominated as anembryonic gestation and persistent CL; the Study 3 was conducted during the pre-partum period and aimed to describe changes in the production of sexual steroids and corticosteroids during the last month of pregnancies derived of ARTs. Three hypothesis were tested: (1) Pregnancies of conceptus cloned by SCNT presented a decrease and delay in the stimulation of ISGs in maternal PBMCs when compared with conceptuses produced by IVF and AI; (2) Stimulus from the conceptus for changes in the morphology and vasculature of the the uterus-ovarian complex, detected by ultrasonography in B and Doppler modes, and the stimulation of ISGs in maternal PBMCs during the first 35 days of pregnancy of conceptus cloned by SCNT are less intense when compared with conceptus derived from AI; and (3) Pregnancies derived of ARTs present changes in the steroidogenic dynamics in the pre-partum, when compared with pregnancies derived from AI. In Study 1 blood samples were collected from pregnancies produced by AI, IVF, and cloning by SCNT, at days 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28, and 31 post-ovulation for the measurement of abundance of transcripts of ISGs (OAS1 and ISG15) in maternal PBMCs. In Study 2, pregnancies derived of AI and cloning by SCNT, were submitted to ultrasonographic scans

for the evaluation and description of morphological and vascular changes in ovaries, uterus, and conceptus every 3 days from day 14 to 35 (day 0 = ovulation) and blood samples were collected on days 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 31 for the measurement of the abundance of transcripts of ISGs (OAS1 and ISG15) in maternal PBMCs. In Study 3, blood samples were collected during the last month of pregnancies naturally conceived, derived of IVF, and cloned by SCNT for the analysis of 10 steroids using the method of mass spectrometry high resolution LC-MS/MS. The first study showed similarities in the ISGs expression stimulation in pregnancies derived of ARTs and AI. However, the stimulation in the ART derived pregnancies was apparently 4 days longer, suggesting a greater placental function in conceptus derived of ARTs. The second study showed an increase in ISG expression in both normal and abnormal conceptus development, which justifies the maintenance of CL in the absence of a conceptus structure detected by ultrasonography. In the third study, was detected changes in the steroidogenesis of pregnancies derived of IFV and cloning by SCNT during the last month of pregnancy, which are compatible with the hyperactivation of the aromatase enzyme during the last month of IFV derived pregnancies, and hyperactivation of the enzymes P450_{C11} and P450_{C21} thirty days before parturition in pregnancies derived of cloning by SCNT. The present study concludes that conceptus derived of IFV and cloning by SCNT present a prolonged stimulus of ISGs, cloned conceptus with anomalous development presents a stimulus of ISGs, which justifies the CL function maintenance, and, ultimately, the steroidogenic cascade that culminates with the term is altered in pregnancies derived from IFV and cloning by SCNT.

Key words: steroidogenesis, clone, IVF, interferon tau, parturition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema do protocolo de sincronização de ovulação	15
Figura 2 – Representação esquemática da via de biossíntese de esteroides	23
Figura 3 – Média $\pm$ EPM da abundância de transcritos para os genes OAS1 nos animais gestantes (+) e não gestantes (-) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18 e 20 pós-ovulação	30
Figura 4 – Média $\pm$ EPM da abundância de transcritos para os genes ISG15 nos animais gestantes (+) e não gestantes (-) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18 e 20 pós-ovulação	31
Figura 5 – Média $\pm$ EPM da abundância de transcritos para os genes OAS1 e ISG15 nos animais gestantes (+) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 27 e 31 pós-ovulação.	33
Figura 6 – Média $\pm$ EPM da abundância de transcritos em cada pulso (aumento seguido de diminuição) para os genes OAS1 e ISG15 nos animais gestantes (+) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 27 e 31 pós-ovulação	40
Figura 7 – Média $\pm$ EPM da média geométrica da abundância de transcritos entre os genes OAS1 e ISG15 nos animais gestantes (+) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 27 e 31 pós-ovulação	42
Figura 8 – Média $\pm$ EPM da média geométrica da abundância de transcritos entre os genes OAS1 e ISG15 nos animais gestantes (+) e não gestantes (-) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18 e 20 pós-ovulação	43
Figura 9 – Média $\pm$ EPM para os valores de área e fluxo sanguíneo do CL na comparação entre prenhez (grupo CNG), gestação anembrionada (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceptos clonados e prenhez oriundas de IA (grupo CTRL) durante os dias 14 e 35 pós-ovulação	47
Figura 10 – Média $\pm$ EPM para os valores de ecotextura e fluxo sanguíneo endometrial na comparação entre prenhez (grupo CNG), gestação anembrionada (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceptos clonados e prenhez oriundas de IA (grupo CTRL) durante os dias 14 e 35 pós-ovulação	49
Figura 11 – Média $\pm$ EPM para os valores de fluxo sanguíneo endometrial na comparação entre prenhez (grupo CNG), gestação anembrionada (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceptos clonados e prenhez oriundas de IA (grupo CTRL) durante os dias 14 e 35 pós-ovulação	51
Figura 12 – Média $\pm$ EPM para os valores arbitrários dos genes OAS1 e ISG15 na comparação entre prenhez (grupo CNG), gestação anembrionada (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceptos clonados e prenhez oriundas de IA (grupo CTRL) durante os dias 14 e 35 pós-ovulação	52
Figura 13 – Média $\pm$ EPM para a média geométrica dos valores arbitrários entre os genes OAS1 e ISG15 nos grupos de gestações normais de clone (CNG), gestação anembrionada	

(CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceptos clonados e prenhez oriundas de IA (CTRL) durante os dias 15 e 35 pós-ovulação54

Figura 14 – Média $\pm$ EPM para a média geométrica dos valores arbitrários entre os genes OAS1 e ISG15 na comparação entre os animais gestantes e não gestantes nos grupos de gestações normais de clone (CNG), gestação anembrionada (CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceptos clonados e prenhez oriundas de IA (CTRL) durante os dias 14 e 20 pós-ovulação.....55

Figura 15 – Representação dos cromatogramas de íons extraídos (XIC) em cada esteroide analisado pelo método APCI (+).57

Figura 16 – Representação dos cromatogramas de íons extraídos (XIC) em cada esteroide analisado pelo método ESI (-).57

Figura 17 – Níveis plasmáticos de moléculas da via dos corticosteroides (progesterona (A), corticosterona (B), 17- α -OH-progesterona (C), 11-deoxicortisol (D), cortisol (E) e da via dos esteroides sexuais (androstenediona (F), estrona (G), sulfato de estrona (H), testosterona (I), estradiol (J) e razão entre estrona (E1)/sulfato de estrona (E1S; K) em receptoras bovinas prenhes de conceptos controle (CTRL) ou conceptos derivados de FIV ou SCNT 30 dias (D-30) e 1 dia (D-1) anteriores ao parto e no dia do parto (D0)63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos primers dos genes alvo e de referência para análise utilizando qPCR	18
Tabela 2 – Parâmetros de detecção por espectrometria de massas utilizados nos métodos de monitoramento da reação de alta resolução (MRM ^{HR})	25
Tabela 3 – Programa de gradiente cromatográfico utilizado no método APCI(+).	27
Tabela 4 – Média $\pm$ EPM do valor máximo de abundância de transcritos e dia de ocorrência em prenhez oriundas de inseminação artificial (IA), fertilização <i>in vitro</i> (FIV), e clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT)	35
Tabela 5 – Porcentagem de ocorrência de pulsos únicos ou múltiplos (dois ou mais pulsos) na mensuração temporal de abundância de transcritos para os genes OAS1 e ISG15 em prenhez bovinas oriundas de inseminação artificial (IA), fertilização <i>in vitro</i> (FIV) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) durante os dias 15 e 31 pós-ovulação.	36
Tabela 6 – Fold change de valores comparados com o dia 15 e com o dia médio de ocorrência de pulsos únicos ou múltiplos na abundância de transcritos para o gene OAS1 em prenhez bovinas oriundas de inseminação artificial (IA), fertilização <i>in vitro</i> (FIV) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) durante os dias 15 e 31 pós-ovulação	37
Tabela 7 – Fold change de valores comparados com o dia 15 e com o dia médio de ocorrência do pico de pulsos únicos ou múltiplos na abundância de transcritos para o gene ISG15 em prenhez bovinas oriundas de inseminação artificial (IA), fertilização <i>in vitro</i> (FIV) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) durante os dias 15 e 31 pós-ovulação	38
Tabela 8 – Média $\pm$ EPM do dia da perda gestacional, regressão luteal e dias entre a perda gestacional e regressão luteal em prenhez de conceitos clonados (grupo CNG) e fenótipos aberrantes de gestações anembrionadas (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) durante o desenvolvimento de conceitos clonados	46
Tabela 9 – Resumo da performance e resultado dos métodos ESI (-)	59

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Técnicas de reprodução assistida e problemas gestacionais relacionados	4
2.2. Desenvolvimento da gestação em bovinos	5
2.3. Reconhecimento materno-fetal da gestação	7
2.4. Esteroidogênese durante o parto	9
2.5. Utilização da gestação de embriões clonados como modelo para anormalidades gestacionais	10
3. HIPÓTESES PRINCIPAIS	13
4. OBJETIVOS	13
5. MATERIAL E MÉTODOS	14
5.1. Animais	14
5.2. Produção de embriões clonados por SCNT e transferência para as receptoras	14
5.3. Sincronização da ovulação	15
5.4. Estudo 1: “Abundância de expressão de genes estimulados pelo interferon tau (IFNT) em estágio inicial de prenhez oriundas de técnicas de reprodução assistida (ARTs) em bovinos”	16
5.5. Estudo 2: “Alterações morfológicas e vasculares no útero e ovários, e do estímulo da expressão de ISGs em PBMCs, em fêmeas gestantes de conceptos oriundos de clonagem e IA em bovinos”	20
5.6. Estudo 3: “Dinâmica esteroidogênica do plasma sanguíneo periférico durante o último mês de gestação em prenhez bovinas naturalmente e artificialmente concebidas, elucidada por espectrometria de massas LC-MS/MS multi-hormonal de alta resolução”	22
6. RESULTADOS	29
6.1. Estudo 1: “Abundância de expressão de genes estimulados pelo interferon tau (IFNT) em estágio inicial de prenhez oriundas de técnicas de reprodução assistida (ARTs) em bovinos”	29
6.2. Estudo 2: “Alterações morfológicas e vasculares no útero e ovários, e do estímulo da expressão de ISGs em PBMCs, em fêmeas gestantes de conceptos oriundos de clonagem e IA em bovinos”	44

6.3. Estudo 3: “Dinâmica esteroidogênica do plasma sanguíneo periférico durante o último mês de gestação em prenhez bovina naturalmente e artificialmente concebidas, elucidada por espectrometria de massas LC-MS/MS multi-hormonal de alta resolução”	56
7. DISCUSSÃO	64
7.1. Estudo 1: “Abundância de expressão de genes estimulados pelo interferon tau (IFNT) em estágio inicial de prenhez oriundas de técnicas de reprodução assistida (ARTs) em bovinos”	64
7.2. Estudo 2: “Diferenças morfológicas e vasculares no útero e ovários, e estímulo da expressão de ISGs em PBMCs, em fêmeas portando conceptos oriundos de clonagem e IA em bovinos”	68
7.3. Estudo 3: “Dinâmica esteroidogênica do plasma sanguíneo periférico durante o último mês de gestação em prenhez bovina naturalmente e artificialmente concebidas, elucidada por espectrometria de massas LC-MS/MS multi-hormonal de alta resolução”	75
8. CONCLUSÃO GERAL	80
9. REFERÊNCIAS	81
10. APÊNDICE	94

1. INTRODUÇÃO

Técnicas de reprodução assistida (ARTs) foram introduzidas na medicina veterinária e humana com os objetivos de maximizar a geração de indivíduos e/ou de driblar problemas reprodutivos. Nas últimas décadas, a técnica de fecundação *in vitro* (FIV) em bovinos foi difundida no Brasil colocando o país em destaque internacional pela quantidade de embriões produzidos (VIANA et al 2012), demonstrando o avanço do país no conhecimento e aplicação de técnicas de reprodução assistida na produção bovina.

Por outro lado, as ARTs demandam uma intensa manipulação *in vitro* dos gametas e embriões, a qual é sugerida como principal responsável pelas elevadas perdas gestacionais, mal desenvolvimento do conceito, má placentação, má sinalização do parto, distocias, recém-nascidos debilitados e possível propensão à síndromes e doenças no indivíduo adulto (CHAVATTE-PALMER et al., 2012; CHEN et al., 2013; MIGLINO et al., 2007). Ambas as técnicas de FIV e clonagem envolvem diversos passos laboratoriais, nos quais vem se tentando minimizar as alterações na reprogramação genética, de modo a mimetizar um ambiente *in vitro* próximo ao fisiológico. O sucesso da aplicação de da clonagem depende de uma correta reprogramação genética durante o desenvolvimento *in vitro*. Após a transferência do embrião à receptora, perde-se o controle exógeno do desenvolvimento embrionário, o qual passa a ser exercido pela comunicação entre o embrião e o útero. Desse modo, ao entrar em contato com o ambiente uterino, o embrião deve ser capaz de desenvolver uma placenta funcional, realizar eficientemente a interação materno-fetal, estabelecer uma regulação adequada do metabolismo fetal e formar células corretamente diferenciadas a fim de originar tecidos e órgãos normais do novo indivíduo.

O primeiro ponto crítico do desenvolvimento de embriões provenientes de ARTs ocorre no período *in vitro* até o estágio de blastocisto, demonstrado pelas baixas taxas tanto de clivagem (70%) quanto de viabilidade embrionária (20%). O segundo ponto crítico se dá no desenvolvimento *in vivo* após a transferência do embrião à receptora, sendo importante a adequada liberação de interferon tau (IFNT) pelo trofotoderma do conceito. O IFNT é responsável pelo bloqueio da secreção pulsátil de PGF2 α por uma via parácrina no endométrio (HANSEN et al., 1999). Consequentemente, o processo luteolítico cíclico não acontece após à ação do IFNT e a função luteal é mantida para o estabelecimento da gestação (SPENCER et al., 2007; BAZER, 2012). Em ARTs, acredita-se que a falha na produção de IFNT pelo conceito seja uma das causas das elevadas perdas em gestações iniciais.

Em gestações mais tardias, os problemas relacionados à aplicação de ARTs se remetem às perdas fetais, hidroalantoide, anasarca, distocias e à falha na sinalização do parto (CHAVATTE-PALMER et al., 2012; CHEN et al., 2013). No caso da FIV, frequentemente ocorre o desenvolvimento de fetos maiores do que o normal, sendo esta condição chamada de síndrome “large offspring”. Em gestações de embriões clonados por transferência nuclear de células somáticas (SCNT), além de fetos maiores, hidropsia e incompetência placentária, as receptoras falham em exibir sinais indicativos do parto, ou seja, ocorre uma falha no processo fisiológico de indução do parto. Nesses casos, o feto clonado aparenta estar imaturo no momento previsto para o nascimento, sendo a sobrevivência do recém-nascido dependente dos procedimentos de cesariana e tratamentos intensivos.

Contudo, embora tenham sido relatadas anormalidades gestacionais, ainda não foi feita uma descrição temporal mais aprofundada de mudanças morfológicas, vasculares e endócrinas em diferentes momentos durante a gestação de conceitos clonados por SCNT. A detecção de falhas na produção de IFNT, mal desenvolvimento do conceito e alterações na cascata esteroidogênica do parto são de extrema importância para a detecção de alterações em momentos críticos da gestação, sendo esses o reconhecimento materno, desenvolvimento inicial do conceito e sinalização para o parto, respectivamente, os quais estão contidos nos três estudos que compõem essa tese.

O Estudo 1 visou comparar o grau de expressão de ISGs em PBMCs maternas durante o reconhecimento materno-fetal da gestação em conceitos clonados por SCNT, produzidos por FIV e naturalmente concebidos. Nesse estudo foi testada a hipótese de que gestações de embriões clonados apresentam um menor e mais tardio aumento da expressão de ISGs em PBMCs maternas quando comparado com gestações de embriões produzidos por FIV e naturalmente concebidos. O Estudo 2 teve como objetivo principal descrever aspectos morfológicos e vasculares do útero e ovários durante a fase inicial do desenvolvimento de conceitos oriundos de embriões clonados por SCNT, assim como a expressão de ISGs em PBMCs maternas. Desse modo, foi testada neste estudo a hipótese de que as perdas de gestações de embriões clonados se devem a um deficiente reconhecimento materno-fetal e placentação, detectada precocemente pela análise de aspectos morfológicos e vasculares do útero e ovários, visualizados por ultrassonografia e estímulos de ISGs. O Estudo 3 objetivou comparar a cascata esteroidogênica no último mês de gestação em conceitos oriundos de clonagem por SCNT, FIV e concebidos naturalmente. Com isso foi possível testar a hipótese

de que gestações de embriões oriundos de ARTs apresentam alterações na dinâmica esteroidogênica no pré-parto.

Em resumo, os achados dos três estudos do presente trabalho pretenderam elucidar pontos importantes da fisiologia gestacional e poderão ser utilizados como modelos e fonte de dados para o desenvolvimento de futuros estudos mais específicos sobre a fisiopatologia da gestação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Técnicas de reprodução assistida e problemas gestacionais relacionados

As técnicas de reprodução assistida (ARTs) foram um importante avanço na melhoria da eficiência reprodutiva, assim como nos tratamentos de subfertilidade e infertilidade. Além disso, muitas das ARTs desenvolvidas em medicina veterinária tem sido aplicadas em medicina humana para contornar problemas reprodutivos. Em bovinos, o Brasil é apresentado como líder mundial na produção embriões (VIANA et al., 2012), sendo destaque internacional na produção de embriões fecundados *in vitro* (FIV), tendo conquistado no ano de 2008 aproximadamente 66,6% do mercado mundial (VIANA et al., 2010). Além disso, o Brasil detém uma produção significativa de clones bovinos e sustenta um importante mercado de produção de cópias de animais geneticamente superiores. Entretanto, as baixas taxas de fertilidade pelo procedimento da clonagem dificultam a aplicação desta técnica na produção animal em larga escala. Atualmente, a motivação da aplicação da clonagem animal advém de novas abordagens, como exemplo a clonagem de animais transgênicos ou a geração de células pluripotentes a partir dos embriões clonados (BRESSAN et al., 2013a; 2013b).

O nascimento do primeiro bezerro nascido de FIV ocorreu em 1982 (BRACKET et al., 1982), enquanto que o primeiro clone bovino nascido por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) ocorreu em 1998 (VIGNON et al., 1998). Embora não tão recentes, ambas ainda apresentam entraves, como as elevadas perdas embrionárias na produção *in vitro*, perdas gestacionais elevadas no primeiro mês de gestação, desenvolvimento anormal do concepto, perdas gestacionais tardias e distocias no momento do parto (CHAVATTE-PALMER et al., 2012; CHEN et al., 2013). Sugere-se que tais problemas têm suas origens nas alterações epigenéticas causadas pela excessiva manipulação *in vitro* dos gametas e embriões, interferindo na capacidade das células embrionárias se diferenciarem corretamente em tecidos e órgãos (FARIN et al., 2006; SMITH et al., 2012).

A correta reprogramação genética é necessária para um adequado desenvolvimento do concepto. Este deve ser capaz de gerar uma placenta funcional, realizar eficientemente a interação materno-fetal, estabelecer o metabolismo fetal competente a fim de formar células corretamente diferenciadas capazes de dar origem a tecidos e órgãos normais. Os primeiros sinais de alterações em embriões FIV são detectados *in vitro*, demonstrado pelas baixas taxas

de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, seguidos por alterações *in vivo*, quando elevadas perdas gestacionais no primeiro mês de gestação são relatadas e, ao final da gestação, a ocorrência de fetos grandes denominados como produtos da síndrome “large offspring” (DROST, 2007). Em vacas gestantes de embriões clonados por SCNT, as alterações gestacionais são mais intensas (CHAVATTE-PALMER et al., 2012), sendo relatados índices ainda menores de desenvolvimento embrionário *in vitro* até o estágio de blastocisto e perda de 70% dos embriões *in vivo* até o dia 30 de gestação. Além disso, das gestações mantidas até o dia 30, apenas 60% permanecem até o dia 60, ocorrendo pequenas parcelas de perdas em cada mês subsequentes até o parto, em taxas de 5 a 10% por mês (MERIGHE, 2007). Nas perdas embrionárias tardias em clones por SCNT destacam-se como achados frequentes a ocorrência de hidropsia e hiperplasia cotiledonária (HEYMAN et al., 2004; EVERTS et al., 2008). Além disso, no momento do parto observa-se em gestações de clones uma má sinalização do parto (CAMPBELL et al., 2007), tornando a indução do parto e a realização do procedimento de cesariana cruciais para a sobrevivência do recém-nascido, seguida de tratamentos intensivos para manutenção da sobrevivência do clone após o nascimento.

2.2. Desenvolvimento gestacional em bovinos

Betteridge & Fléchon (1988) detectaram a chegada do embrião bovino no lúmen uterino no dia 5 pós-fertilização, no estágio entre mórula a blastocisto inicial. A compactação seguida de blastulação do embrião ocorreu no estágio de 32 a 64 células (dia 7 a 8), surgindo as células da massa celular interna e trofotoderma, as quais darão origem ao embrião e às membranas do conceito, respectivamente. A eclosão do embrião ocorre entre os dias 8 e 9, resultando no alongamento do mesmo, o qual preenche todo o lúmen do corno ipsolateral ao ovário com o CL até o dia 17 e do corno contralateral até o dia 20 (KING et al., 1982). Entre os dias 16 e 18, células gigantes são encontradas no trofoblasto (GREENSTEIN et al., 1958), sendo este o momento de preparação para a implantação, sendo chamada de “fase de pré-contato” (LEISER et al., 1975).

Temporalmente, o contato íntimo entre o trofoblasto e epitélio uterino ocorre na região do disco embrionário no dia 19 e entre o trofoblasto e áreas carunculares no dia subsequente.

O desenvolvimento do saco alantoideano se inicia no dia 20, seguido do aparecimento de vasos do plexo vitelínico, coração primitivo do embrião e microvilos na parte apical do trofoblasto. Entre os dias 23 a 25, todas as carúnculas apresentam interdigitações, surgem células binucleadas e ocorre uma expansão rápida do tamanho e vascularização do alantoide. Nota-se que a placentação não é um processo uniforme e sua formação se inicia nas proximidades do embrião, ampliando-se para as periferias do concepto (KING et al., 1982).

Entre os dias 28 e 30, a expansão do alantoide é dramática, ocorrendo a fusão entre o alantoide e trofotoderma, dando origem ao córion. No dia 30, o concepto apresenta-se no lúmen uterino como uma estrutura em formato alongado, apresentando elevada pressão interna por conta da repleção de líquido no alantoide (MELTON et al., 1951). Entre os dias 31 e 33, são observados vilos coriônicos primários vascularizados (MELTON et al., 1951; GREENSTEIN et al., 1958) descritos como pontos avermelhados que representam os futuros cotilédones. Nota-se que a interação física entre endométrio e concepto se inicia no início da gestação (por volta do dia 20), observando-se áreas carunculares com interdigitações no dia 25 e placentônios primordiais com microvilos e sistema vascular primitivo no dia 32 (KING et al., 1979; SCHLAFFER et al., 2000). Todas as camadas celulares (epitélio, estroma e endotélio) estão presentes nos lados materno e fetal, sendo que as células trofoblásticas estão em contato direto com a superfície das células epiteliais uterinas, cotilédone (vilo fetal) com a carúncula, formando os placentônios. Após o primeiro mês de gestação, a placentação continua com as carúnculas induzindo a hipertrofia e hiperplasia dos vilos cotiledonários, dando origem a placentônios grandes e complexos por volta do dia 40 (KING et al., 1979; SCHLAFFER et al., 2000). Os placentônios são constituídos pela aposição do endométrio (carúnculas, parte materna) ao concepto (cotilédone, parte fetal), formando várias áreas de interação na superfície coriônica, sendo esta estruturação exclusiva da placenta de ruminantes do tipo sinepiteliocorial (AMOROSO 1952). Os placentônios são responsáveis pelo suporte nutricional e pela retirada de resíduos metabólicos do feto.

O remodelamento e desenvolvimento vascular nos lados materno e fetal são essenciais para o sucesso da prenhez em todos os mamíferos, anteriormente, na placentação e durante toda a prenhez até o parto (REYNOLDS et al., 2006; TORRY et al., 2007). A vascularização endometrial propicia um ambiente uterino apropriado para a fixação do embrião, estimulando glândulas endometriais a secretarem o histotrofo, responsável por suportar a sobrevivência e desenvolvimento do embrião (BURTON et al., 2007). O desenvolvimento e expansão da vascularização dos vilos placentários após a fixação é responsável por suprir as demandas

iniciais de nutrientes e gases do feto. Durante toda a gestação, o remodelamento da vascularização materno-placentária é contínua e ocorre paralelamente ao aumento gradual da demanda fetal por transporte de nutrientes, gases respiratórios e excretas durante o desenvolvimento (REYNOLDS et al., 2006; TORRY et al., 2007).

A formação de vasos sanguíneos no feto se inicia a partir do dia 21 em bovinos (GREENSTEIN et al., 1958; BETTERIDGE et al., 1982; BETTERIDGE & FLÉCHON 1988), sendo que a regulação do processo angiogênico no início de gestação é semelhante ao observado em desenvolvimento de tumores. Desse modo, observa-se a proliferação, migração e invasão da matriz extracelular (ZYGMENT et al., 2003; CHARNOCK-JONES et al., 2004; KAUFMANN et al., 2004). Entretanto, diferentemente de tumores, durante a prenhez a invasão e formação de novos vasos é autolimitada e o embrião não apenas interage com o sistema vascular materno, mas também estimula e controla o desenvolvimento do seu próprio sistema vascular (ZYGMENT et al., 2003).

A vascularização deficitária durante a prenhez é relacionada com falhas na prenhez e desenvolvimento fetal debilitado ou anormal (REYNOLDS et al., 2006; TORRY et al., 2007), sendo o aumento de suprimento sanguíneo um importante mecanismo para aumentar o transporte transplacentário durante a prenhez. Na segunda metade da gestação, a mensuração do fluxo sanguíneo nas artérias uterinas mostrou um aumento de aproximadamente 4,5 vezes, quando comparada com a primeira metade (REYNOLDS et al., 1986). Sendo assim, o remodelamento e crescimento vascular placentário tornou-se foco de diversos estudos sobre o crescimento fetal comprometido (REYNOLDS & REDMER 1995; REYNOLDS et al., 2005; REYNOLDS et al., 2006; TORRY et al., 2007), sendo sugerido que alterações no desenvolvimento vascular e expressão de fatores relacionados possam ser estimulados por condições de hipóxia feto-placentária (MAYHEW et al., 2004).

2.3. Reconhecimento materno-fetal da gestação

O estabelecimento da gestação é um processo complexo, o qual requer um diálogo entre o conceito e o útero. A sinalização pelo conceito de sua presença intrauterina deve ser iniciada no período prefixação a fim regular a expressão de genes em células do estroma e

epitélio uterino, iniciando o processo denominado de reconhecimento materno da gestação. Apesar do diálogo entre a mãe e o conceito ocorrer durante toda a gestação, o primeiro ponto crítico é o estabelecimento do bloqueio do mecanismo responsável pela secreção pulsátil de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo endométrio, envolvendo uma regulação parácrina entre o conceito e o endométrio (HANSEN et al., 1999). Esse bloqueio é exercido pelo IFNT, o qual silencia a expressão de receptores de oxitocina (OXTR) no lúmen uterino e no epitélio superficial glandular e, conseqüentemente, impede a secreção de $PGF_{2\alpha}$ (BAZER et al., 2010). A manutenção da secreção de progesterona pelo CL é o primeiro sinal do estabelecimento da prenhez (SPENCER et al., 2007; BAZER, 2012).

O IFNT tem duas funções importantes durante no reconhecimento materno da gestação. A primeira é bloquear o processo de luteólise, enquanto que a segunda é induzir a expressão do fator 2 regulatório de interferon (IRF2) no lúmen uterino e epitélio glandular superficial, a fim de estimular genes clássicos estimulados pelo IFNT (ISGs). O papel dos ISGs ainda não foi totalmente elucidado, mas sugere-se que estes estejam associados à regulação da receptividade uterina, alongamento do conceito e processo de aposição-interação trofoblástico-endometrial, também chamado por alguns autores de implantação (HANSEN et al., 2010; BAZER et al., 2009).

A expressão de ISGs após estímulo do IFNT não se restringe apenas ao útero, mas também ocorre em leucócitos do sangue periférico (PBMCs) maternas (HAN et al., 2006; GIFFORD et al., 2007; GREEN et al., 2010). Fazem parte dos ISGs a proteína de 15 KDa estimulada pelo interferon (ISG-15), as proteínas de resistência a mixovírus (MX) 1 e 2, assim como a 2'-5'-oligoadenilato sintase (OAS-1) (HAN et al., 2006; GIFFORD et al., 2007; GREEN et al., 2010a, 2010b; SHIRASUNA et al., 2012; PUGLIESI et al., 2014). Tais ISGs podem ser estimuladas naturalmente pela secreção do IFNT do conceito e também por infusão intrauterina de IFNT (MATSUYAMA et al., 2012; BOTT et al., 2010), sendo essa estimulação dose dependente. Foi recentemente descrito que os níveis de abundância de transcritos de ISGs durante o início da gestação aumentam progressivamente do dia 15 ao 20 após IA, com um pequeno decréscimo no dia 22, atingindo níveis basais a partir do dia 30 (PUGLIESI et al., 2014). Esses dados sugerem um perfil paralelo entre a expressão de ISGs e a secreção de IFNT pelo conceito em ruminantes (ASHWORTH & BAZER, 1989; FARIN, IMAKAWA & ROBERTS, 1989) e possibilita a utilização da mensuração da abundância de transcritos de ISGs como análise indireta da secreção de IFNT pelo conceito.

2.4. Esteroidogênese durante o parto

Os mecanismos responsáveis pelo desencadeamento do parto são semelhantes entre as diferentes espécies de mamíferos. Em uma breve descrição, o parto se inicia com o aumento pronunciado da secreção de cortisol fetal (CHALLIS et al., 2000), o qual estimula a produção de estradiol e, conseqüentemente, a atividade miometrial (GYOMOREY et al., 2000; WHITTLE et al., 2000). A secreção de cortisol pela adrenal é consequência do estresse fetal no final da gestação e atua na estimulação da expressão da enzima 17 α -hidroxilase, favorecendo a via de conversão da progesterona em estradiol na placenta (HUNTER et al., 1977; SCHULER, HARTUNG & HOFFMAN, 1994). O estradiol circulante materno se eleva com paralela queda da concentração de progesterona (CHALLIS et al., 2000). Além disso, a queda abrupta de progesterona está também associada ao processo de luteólise desencadeado durante o parto (HOFFMAN et al., 1979). Esses eventos endócrinos são de grande importância na preparação do trato reprodutivo materno para o momento do parto, sendo responsável pela expressão de receptores de ocitocina no miométrio para a contração miometrial, síntese de prostaglandinas, relaxamento e abertura cervical, relaxamento das articulações sacro-ilíacas e distensibilidade vulvar (JENKIN & YOUNG, 2004). No entanto, não se conhece ainda os mecanismos exatos das inter-relações hormonais e detalhes temporais da produção destes hormônios que expliquem a sequência dos eventos que culminam no parto.

Corticosteroides são primariamente regulados pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) e, devido ao processo de maturação gradual do eixo HPA fetal, apresentam um aumento gradual na concentração sérica materna durante o último mês de gestação (HUNTER et al., 1977; CONLEY et al., 1992). Dentre os corticosteroides, o cortisol apresenta um papel de destaque, estimulando a conversão de andrógenos em estrógenos pela aromatase na placenta (TAKENOUCHI et al., 2004; ANDERSON, FLINT & TORNBULL 1975; HOFFMANN & SCHULER 2002). Por meio da sulfoconjugação, a placenta é capaz de regular a atividade e excreção do estrógeno, em uma reação catalisada pelas sulfotransferases. Em uma breve explicação, os estrógenos sulfoconjugados têm dificuldade de se ligarem a receptores nucleares e, conseqüentemente, são excretados (HOFFMANN et al., 2001).

As enzimas presentes na cascata esteroidogênica abrangem o citocromo P450 (CYP genes) e as hidroxisteroide desidrogenases (HSD). Tais enzimas são diferentemente expressas e localizadas nos tecidos materno, placentário e fetal. Nas glândulas adrenais fetais, a quantidade de enzimas esteroidogênicas por unidade de massa tecidual é consideravelmente mais elevada do que em tecidos placentários. Entretanto, é importante considerar o fato de que variações na quantidade de massa tecidual pode afetar significativamente a atividade esteroidogênica (CONLEY et al., 1992), sendo o aumento da atividade esteroidogênica da placenta resultante do aumento da respectiva massa tecidual no avanço da prenhez.

Dois caminhos diferentes podem ser seguidos na esteroidogênese, as vias $\Delta 4$ (17- α -OH progesterona como intermediário principal) e $\Delta 5$ (17- α -OH pregnenolona e dehidroepiandrosterona, DHEA, como intermediários principais). Ambas as vias estão presentes nos tecidos placentários e glândulas adrenais fetais, mas sugere-se que a placenta bovina privilegie enzimas esteroidogênicas da via $\Delta 5$ do que da via $\Delta 4$ (FEVOLD et al., 1989). Tal sugestão se justifica pela 17 α -OH progesterona não ser um eficiente substrato para a síntese de androstenediona (SCHULER, HARTUNG & HOFFMAN, 1994), o principal precursor de estrógenos.

Em bovinos, a cascata enzimática da esteroidogênese pode ocorrer completamente na placenta pela via $\Delta 5$ (CONLEY et al., 1992; SCHULER, HARTUNG & HOFFMAN, 1994), sendo demonstrado que o aumento de estrógeno no momento do parto é sustentado pelo aumento da síntese de pregnenolona (SCHULER, HARTUNG & HOFFMAN, 1994). Em humanos e equinos há uma baixa atividade da P450C17 na placenta, sendo essas espécies dependentes de substratos andrógenos (DHES e sulfato de DHEA) proveniente, em humanos, da glândula adrenal fetal e, em equinos, das gônadas fetais para a síntese de estrógenos (DICZFALUSY, 1964; MESIANO & JAFFE, 1997; CONLEY, PATTISON & BIRD, 2004; PASHEN & ALLEN, 1979). Na placenta de bovinos, ovinos e suínos os progestágenos são convertidos em estrógenos sem a necessidade de substratos fetais (SCHULER, HARTUNG & HOFFMAN, 1994; CONLEY & MASON, 1990; MASON et al., 1989).

2.5. Utilização da gestação de embriões clonados como modelo para anormalidades gestacionais

As alterações morfológicas e endócrinas nas gestações podem ser estudadas por duas abordagens: acompanhar casos espontâneos de anormalidades em gestações naturalmente produzidas ou causar experimentalmente um distúrbio gestacional. No caso da gestação de clones bovinos por SCNT, observa-se uma frequência extremamente alta de alterações gestacionais, possibilitando o uso dessas gestações como modelos fisiopatologia da gestação. Com a utilização de gestações de embriões clonados por SCNT, evita-se a dependência do acaso para encontrar alterações gestacionais em uma população normal ou a necessidade de se induzir farmacologicamente uma anormalidade gestacional. Além disso, no procedimento de clonagem, cada linhagem celular utilizada como doadora nuclear origina embriões que resultam em alterações gestacionais específicas (POWEL et al., 2004). Tal característica propicia formar grupos homogêneos de alterações gestacionais para investigações fisiopatológicas específicas em bovinos.

A frequência de ocorrência de alterações em gestações de embriões clonados por SCNT foi descrita em estudos prévios (CHAVATTE-PALMER et al., 2012). As principais alterações encontradas são o elevado tamanho do feto ao nascimento (Síndrome Large Offspring: LOS) e placentomegalia (HILL et al., 1999; CHAVATTE-PALMER et al., 2002; PACE et al., 2002; YOUNG et al., 1998; CONSTANT et al., 2006), resultando em distocias, alta morbidade e mortalidade (HILL & CHAVATTE-PALMER, 2002, MEIRELLES et al., 2010), somada às inúmeras más-formações placentárias (HILL et al., 2000). Ressalta-se que o embrião clonado tem um padrão bifásico de desenvolvimento, sendo demonstrado inicialmente um retardo no crescimento do conceito, seguido de alterações no desenvolvimento do tecido placentário resultando em uma aceleração do desenvolvimento até o parto (BERTOLINI et al., 2002).

Gestações de embriões clonados por SCNT frequentemente apresentam-se prolongadas e falhas na preparação para o parto (imaturidade na função pulmonar do feto), hidropsias e distocias, assim como o insuficiente relaxamento e dilatação da cavidade pélvica, cérvix, vagina e genitália externa são achados comuns (HEYMAN et al., 2002; HASHIZUME et al., 2002; CAMPBELL et al., 2007). As causas dessas alterações ainda estão pouco elucidadas, tendo a perturbação na esteroidogênese placentária como o mais sugestivo fator predisponente, resultando em falhas na produção e metabolismo de estrogênios (HIRAYAMA et al., 2008).

Embora cada anormalidade das gestações de embriões clonados por SCNT seja resultado de anormalidades fisiológicas específicas, a causa primária mais sugestiva é a ocorrência de alterações epigenéticas quando os embriões foram produzidos (SMITH et al., 2012). Tais alterações epigenéticas aparentam estar relacionadas à extrema manipulação do oócito associada às diferentes condições e meios de cultura embrionária *in vitro* (EDWARDS et al., 2003). Desse modo, gestações de embriões clonados apresentam grande chance de sofrerem um desequilíbrio de desenvolvimento no curso da gestação (SMITH et al., 2012; HASHIZUME et al., 2002), o qual possibilita a utilização dessas gestações como modelos para o entendimento fisiopatológico de distúrbios do desenvolvimento intrauterino.

3. HIPÓTESES

1º Estudo: Gestações de embriões clonados por SCNT apresentam uma baixa e mais tardia estimulação dos genes estimulados pelo interferon (ISG) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) materno quando comparadas com gestações de embriões produzidos *in vitro* e gestações naturalmente concebidas por inseminação artificial (IA), devido à uma menor funcionalidade e desenvolvimento do trofotoderma.

2º Estudo: O conceito clonado por SCNT apresenta alterações nas mudanças morfológicas e vasculares do complexo útero-ovário e ISGs em PBMCs maternas durante os primeiros 35 dias de gestação, quando comparado com conceitos oriundos de IA.

3º Estudo: Gestações de embriões oriundos das técnicas de reprodução assistida de clonagem por SCNT e FIV apresentam alterações na dinâmica esteroidogênica no pré-parto quando comparados com gestações de embriões oriundos de inseminação artificial (IA).

4. OBJETIVOS

O presente trabalho abrangeu três fases distintas da gestação de embriões produzidos por FIV e clonagem por SCNT, com os objetivos de:

1º Estudo: Comparou a abundância de transcritos de genes estimulados pelo IFNT em PBMCs maternas em gestações oriundas das técnicas de reprodução assistida, FIV e clonagem por SCNT, no primeiro mês de gestação.

2º Estudo: Comparou as mudanças morfológicas e vasculares do complexo útero-conceito-ovário e o estímulo à expressão de ISGs em PBMCs maternas em gestações de conceitos clonados por SCNT com diferentes fenótipos de desenvolvimento.

3º Estudo: Comparou as alterações na produção de esteroides sexuais e corticosteroides no último mês em gestações oriundas das técnicas de reprodução assistida, FIV e clonagem por SCNT, comparando-as com gestações naturalmente concebidas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Setenta e sete fêmeas bovinas (30 novilhas mestiças, 6 vacas mestiças, 6 novilhas tabapuãs e 35 vacas Nelore) foram selecionadas não apresentando anormalidades do trato reprodutivo por palpação e exame de ultrassonográfico transretal. As vacas foram mantidas em pastos de capim *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* (Mombaça), sendo oferecido sal mineral e água à vontade. A condição corporal das vacas foi mantida em bom estado durante todo o experimento. Os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com o comitê de ética em experimentação animal da FZEA-USP.

5.2. Produção de embriões clonados por SCNT e transferência para as receptoras

Ovários de vacas mestiças provenientes de abatedouros foram utilizados para a obtenção de oócitos por meio da aspiração dos folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm. Os complexos cumulus oócito (COC) aspirados, contendo citoplasma homogêneo com até quatro camadas de células do cumulus, foram selecionados para maturação *in vitro* (IVM), como descrito previamente (SANGALLI et al., 2012).

Todos os procedimentos *in vitro* foram realizados à temperatura de 38,8°C, em atmosfera de ar com humidade máxima e 5% de saturação de CO₂. Fibroblastos de pele oriundos de bovinos Nelore (*Bos indicus*) foram utilizados como fonte celular para doação de núcleos. Os fibroblastos foram mantidos em 0,5 % de soro fetal bovino por 72 h anteriormente à micromanipulação com o objetivo de sincronização do estágio do ciclo celular para G1/G0. Os procedimentos de maturação *in vitro* (IVM), enucleação do oócito, reconstrução e ativação foram realizados segundo técnica de rotina do laboratório de clonagem (SANGALLI et al., 2012).

Conjuntos de 20 embriões foram mantidos por 7 dias até o estágio de blastocisto em micro gotas contendo 100 µL de meio SOFaa suplementado com 5 mg/mL de soro fetal bovino (BSA) ausente de ácidos graxos e 2,5% (v/v) de FBS sobreposto com óleo mineral. Os blastocistos individualizados foram transferidos para o útero das receptoras sete dias pós-ovulação pelo método não cirúrgico.

5.3. Sincronização da ovulação

Previamente à TE ou IA, as vacas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação em tempo fixo, esquematizado na Figura 1. O protocolo era iniciado (D0) com a inserção de implante intravaginal de P4 (1,0 g de P4; Sincrogest®; Ouro Fino Saúde Animal) somado a uma injeção de benzoato de estradiol (2 mg; Sincrodiol®; Ouro Fino Saúde Animal). Oito dias após (D8) o implante de P4 era retirado e administrava-se uma dose de análogo de prostaglandina F2 α (500 μ g de cloprostenol sódico; Sincrocio®; Ouro Fino Saúde Animal). No dia seguinte (D9) era realizada a indução da ovulação com benzoato de estradiol (2 mg; Sincrodiol; Ouro Fino Saúde Animal), sendo a ovulação prevista para ocorrer entre 36 e 42 horas, sendo a ocorrência da ovulação conferida por ultrasonografia 48h após a indução (Figura 1).

Os procedimentos de IA foram realizados no dia anterior ao momento previsto para a ovulação (D9) As TEs de embriões de FIV e de embriões clonados por SCNT foram realizadas sete dias após à ovulação (D18).

Figura 1 – Esquema do protocolo de sincronização de ovulação. Os quadrados tracejados representam os momentos em que foram realizados os procedimentos de IA (D10) ou TE (D18).

5.4. Estudo 1: “Abundância de expressão de genes estimulados pelo interferon tau (IFNT) em estágio inicial de prenhez oriundas de técnicas de reprodução assistida (ARTs) em bovinos”

No presente estudo foram realizadas amostragens de sangue na prenhez inicial em três grupos experimentais: gestações oriundas de inseminação artificial (AI, n = 10; 4 prenhes e 6 vazias), gestações de embriões de FIV (IVF, n = 12; 5 prenhes e 7 vazias) e gestações de embriões clonados por SCNT (SCNT, n = 17; 5 prenhes e 12 vazias). Em todos os grupos foram coletadas amostras de sangue da veia jugular (40 mL) nos dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 28 e 31 (dia 0 = ovulação) para isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) maternas.

Após cada coleta de amostras os animais foram examinados por ultrassonografia nos modos B e Doppler colorido para a avaliação da funcionalidade luteal, como previamente descrito (PUGLIESI et al., 2014). Animais que apresentaram queda na funcionalidade luteal, indicada por CL diminuído de tamanho e sem vascularização (sinais de regressão luteal), foram considerados não gestantes e eliminados das coletas posteriores. As prenhez foram confirmadas por ultrassonografia nos dias 26, 28, 31 e 45 por meio de detecção de um concepto viável (com embrião com batimentos cardíacos). As amostras de sangue em temperatura ambiente foram imediatamente submetidas ao protocolo de isolamento de PBMCs maternas.

5.4.1. Isolamento das PBMCs

As PBMCs foram isoladas do sangue total por meio de um gradiente de Ficoll. O volume de 40 mL de sangue total foi misturado com um mesmo volume de PBS, sendo essa solução adicionada de 15 mL de solução Ficoll-Paque (GE Healthcare) em dois tubos cônicos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 1.100 g por 30 min para a obtenção da camada de PBMCs, como previamente descrito (JIEMTAWEEBOON et al., 2011). As camadas de PBMCs foram coletadas por pipetagem e centrifugadas com PBS a 900 g por 15 min. O pellet formado foi então resuspendido em solução hipertônica por aproximadamente 10 min, promovendo a lise das hemácias presentes na amostra. A isotonicidade era restaurada pela suspensão das células em PBS e centrifugação a 900 g por 15 min. O pellet resultante era então resuspendido em PBS e a solução final transferida a um tubo cônico de 1,5 mL. As

PBMCs isoladas foram centrifugadas a 3300 g por 2 min, o sobrenadante foi removido e o pellet armazenado a -80°C. Para comprovação da pureza das amostras de PBMCs extraídas pelo método descrito, as amostras frescas isoladas foram submetidas à análise por citometria de fluxo, sendo encontrados valores acima de 99% de pureza, segundo a técnica previamente descrita (PUGLIESI et al., 2014).

5.4.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras de PBMCs foram descongeladas e imediatamente diluídas em buffer de lise do kit RNeasy Mini column (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante. A suspensão de PBMCs lisadas foi submetida à extração do sobrenadante líquido, evitando-se a parte gelatinosa, o qual era processado em colunas de RNeasy. Ao final da extração, 30 µl de água RNase-free foi adicionada à cada coluna para recuperação do RNA e a concentração do total de extratos de RNA foi mensurada utilizando um espectrofotômetro (NanoDrop; Thermo Scientific). O RNA extraído foi armazenado a -80°C, sendo o resfriamento e o transporte das amostras realizados em gelo seco (-95°C) para evitar a degradação do RNA.

Previamente à síntese de DNA, o RNA isolado (0,5 ou 1 µg) foi submetido à tratamento com DNase I (Life Technologies) por 15 min à temperatura ambiente (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante. Um volume de 10µl de máster mix contendo tampão de transcrição reversa, mix de deoxiribonucleotídeo trifosfato, primers aleatórios, inibidor de RNase e transcriptase reversa foram adicionados a 10 µl de RNA em suspensão em uma reação com volume de 80 µl para a transcrição reversa. Imediatamente após a mistura, as amostras foram incubadas a 25°C por 10 min e em seguida a 37°C por 2 h, sendo submetidas à inativação da transcriptase reversa a 85°C por 5 min e armazenadas a -20°C para posterior análise por qPCR.

5.4.3. Reação quantitativa de ligação da polimerase (qPCR)

Após a extração de RNA e síntese de cDNA, a abundância de expressão dos genes OAS1 e ISG15 foi mensurada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando primers descritos previamente para bovinos (GIFFORD et al., 2007; GREEN et al., 2010; Tabela 1)

para os genes alvo, sendo a ciclofilina utilizada como gene housekeeping para normalização dos dados.

Tabela 1 – Sequência dos primers dos genes alvo e de referência para análise utilizando qPCR.

Gene	GenBank	Forward primer	Reverse primer
OAS1	NM_001040606.1	TAGCCTGGAACATCAGGTC	TTTGGTCTGGCTGGATTACC
ISG15	NM_174366	GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT	ACCTCCCTGCTGTCAAGGT
Cyclophilin	BF230516.1	GCCATGGAGCGCTTTGG	CCACAGTCAGCAATGGTGATCT

A análise de qPCR foi realizada utilizando SYBR green (Life Technologies) e as reações de PCR em tempo real realizadas utilizando um aparato Step One Plus (Life Technologies). As reações foram feitas em triplicata em uma placa de 96 poços, seladas com película óptica adesiva MicroAmp (Life Technologies). Os dados brutos de fluorescência foram extraídos do aparato Step One Plus sem correção da linha de base e analisados utilizando o software LinReg PCR (www.hartfaalcentrum.nl/index.php?main-files&sub-LinRegPCR) para a correção da linha de base, determinação da eficiência do PCR e detecção dos valores de quantificação de ciclo por amostra, como descrito por Ruijter et al., 2009. A quantificação do ciclo foi obtida pelo software LinReg PCR. A porção log-linear da curva de amplificação utilizada para a análise foi determinada pelo software LinReg PCR contendo entre quatro a seis pontos com os maiores valores de R^2 . A quantificação relativa dos dados de qPCR para os três genes testados foi feita utilizando o programa Relative Expression Software Tool, sendo os resultados expressos em unidades relativas arbitrárias do gene ISG alvo e ciclofilina.

5.4.4. Análises estatísticas

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste Shapiro-Wilk, sendo dados não distribuídos normalmente transformados em logaritmos ou ranqueados. Split-plot ANOVA foi utilizado para analisar efeitos de grupo, dia e interação na abundância de ISG. Para dados repetidos no tempo, o procedimento SAS PROC MIXED (SAS versão 9.2) foi utilizado para definir a auto correlação entre vaca e mensurações sequenciais dentro de um grupo como uma

variável aleatória. O teste LSD foi utilizado para comparações entre dias dentro de um grupo. O procedimento PROC GLM (SAS versão 9.2) foi utilizado para determinar o efeito de grupo em variáveis independentes discretas pelo teste one-way ANOVA. Dados de proporções de ocorrências foram comparados pelo teste Qui-quadrado. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado como significativo e $0.05 < P < 0.1$ como tendência à significância.

Estudo 2: “Alterações morfológicas e vasculares no útero e ovários, e do estímulo da expressão de ISGs em PBMCs, em fêmeas gestantes de conceptos oriundos de clonagem e IA em bovinos”.

Trinta e uma prenhezes oriundas de conceptos clonados por SCNT foram escaneadas por ultrassonografia transretal no modo B e Doppler colorido utilizando o aparelho MyLab70 Vet Gold (Esaote Healthcare, Italy) equipado com uma probe linear multifrequencial. Os escaneamentos ultrassonográficos se iniciaram a partir do dia 14 pós-ovulação (D14), sendo realizados a cada 3 dias do D14 ao 35, ou até o momento da regressão luteal (ausência de sinais de fluxo sanguíneo no CL).

5.4.5. Análise das imagens

Foram obtidas gravações de vídeos dos exames ultrassonográficos em modo B e Doppler colorido contendo imagens de ambos os cornos uterinos, ovários e do concepto. Todas as imagens foram analisadas utilizando o software MyLabDesk (Esaote Healthcare, Italy), contendo as seguintes avaliações:

1. Corpo lúteo: área (cm²) e vascularização (%).
2. Cornos uterinos: ecotextura (edema; graus de 1 a 4) e vascularização endometrial (graus de 1 a 4).
3. Concepto inicial: presença de membranas, líquidos e embrião com batimentos cardíacos.

A mensuração de área do CL foi realizada de forma automática pelo software MyLabDesk tracejando toda a estrutura do CL no maior diâmetro obtido. Caso presente, a área da cavidade do CL era calculada da mesma forma e subtraída da área total do CL previamente calculada. A avaliação da vascularização luteal foi realizada pela estimativa subjetiva (%) da quantidade de sinais de vascularização observada nos vídeos de Doppler colorido do tecido luteal, como previamente descrito (GINTHER, 2007). A ecotextura uterina (grau de edema de 1 a 4) foi estimada subjetivamente pelo escaneamento em modo B de todo o útero e o grau de vascularização endometrial (1 a 4; SILVA & Ginther, 2010) foi avaliado subjetivamente em cada corno uterino por ultrassonografia no modo Doppler colorido. As

análises subjetivas foram realizadas por um único operador durante todo o experimento seguindo padrões utilizados anteriormente (SILVA & Ginther, 2010). A avaliação de estruturas do conceito foi realizada por ultrassonografia de toda a extensão do útero, a fim de localizar e descrever a presença de sinais de membranas, líquido e o embrião no lúmen uterino. A presença de batimentos cardíacos no embrião foi detectada em modo B e avaliada em modo Doppler colorido para confirmação da pulsatilidade.

5.4.6. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos ao teste de normalização Shapiro-Wilk, sendo dados não normalizados transformados em logaritmos naturais ou ranqueados. Os escores de vascularização por Doppler foram considerados não-paramétricos e analisados pelo procedimento de ranqueamento (CONOVER, 1999). Os escores ranqueados e dados paramétricos foram analisados pelo procedimento mixed do SAS (versão 8.2; SAS Institute, Inc., Cary, NC) para determinar os efeitos principais e interação, utilizando medidas repetidas no tempo para determinar autocorrelação entre mensurações sequenciais. O teste-*t* de Student pareado e não pareado foram utilizados para localizar diferenças em cada corno ou entre cornos, respectivamente, quando obtido significância em efeitos principais ou interação. Dados discretos foram analisados pelo teste-*t* de Student não pareado. Dados de proporções de ocorrências foram comparados pelo teste Qui-quadrado. Diferenças estatísticas significativas foram indicadas por $P \leq 0,05$ e tendência à significância por $0.05 < P < 0.1$. Todos os dados foram representados em porcentagem ou média $\pm$ erro padrão médio.

5.5. Estudo 3: “Dinâmica esteroidogênica do plasma sanguíneo periférico durante o último mês de gestação em prenhez bovina naturalmente e artificialmente concebidas, elucidada por espectrometria de massas LC-MS/MS multi-hormonal de alta resolução”

Amostras de sangue de vacas gestantes por inseminação artificial (CTRL, n = 4), fertilização *in vitro* (FIV, n = 4) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT, n = 5) foram coletadas no último mês de gestação. Nos grupos FIV e SCNT, em que o parto foi induzido e realizado por cesariana, as amostras foram coletadas no trigésimo dia antes do parto (D-30), no dia anterior ao parto (D-1) e no dia do parto. No grupo CTRL, no qual o parto foi espontâneo, as amostras foram coletadas semanalmente a partir do sétimo mês de gestação, sendo que no momento da aparente proximidade do parto, ou seja, sinais de repleção do úbere e início de produção de colostro, as amostras foram coletadas diariamente até o momento do parto. Todas as amostras foram coletadas utilizando EDTA como anticoagulante (Vacuette K3 EDTA, Greiner, Brazil), sendo imediatamente centrifugadas a 1500 x g por 15 min em centrífuga refrigerada a 4°C e armazenadas a -20°C.

5.5.1. Manejo perinatal

Devido às falhas na sinalização do parto, as receptoras de embriões clonados por SCNT foram submetidas a um protocolo de indução do parto. O protocolo foi constituído de administração de um corticosteróide sintético (acetonida de triamcinolona; 8 mg, i.m.) 3 dias antes do dia estimado para o parto (DEP, 285 dias de gestação), dexametasona (20 mg, i.m.) 36 h antes do DEP e d-cloprostenol (0,53 mg, i.m.) 12 h antes do DEP. Receptoras de embriões fecundados *in vitro* foram submetidas ao mesmo protocolo para comparação. Nos dois grupos o parto foi realizado por cesariana no dia 285 de gestação. Nos animais inseminados artificialmente não foi realizada a indução do parto, sendo este espontâneo.

5.5.2. Quantificação de hormônios esteroides

A concentração de 10 esteroides (progesterona, corticosterona, 17- α -OH-progesterona, 11-deoxicortisol, cortisol, androstenediona, estrona, sulfato de estrona, testosterona e 17- β -estradiol; Figura 2) foram determinados nas amostras de plasma sanguíneo.

Figura 2 – Representação esquemática da via de biossíntese de esteroides. As enzimas esteroidogênicas estão indicadas acima ou ao lado das setas. Hormônios esteroides representados em negrito foram quantificados por LC-MS/MS no presente estudo.

5.5.3. Composição e preparação das soluções padrão

Foram utilizados solventes HPLC-grade, ácido fórmico, hidróxido de amônia, sulfato de zinco, água ultrapura, plasma tratado duas vezes com carvão e padrões de esteroides. Soluções de estoque para todos os esteroides foram preparadas em metanol ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a solução de precipitação de estoque com sulfato de zinco foi preparada a 89 mg mL^{-1} . A solução de precipitação foi diluída 10 vezes em metanol e volumes apropriados de cortisol-d4, progesterona-d9, 17- α -hidroxypregesterona-d8 e sulfato de estrona-d4, obtendo concentrações finais de 10, 5, 5 e 5 ng mL^{-1} , respectivamente.

5.5.4. Instrumentação LC-MS/MS

A análise LC-MS/MS foi realizada em um espectrômetro de massas de tempo-de-voo quadrupolo híbrido TripleTOF® 5600 (AB SCIEX, Concord, Canada) acoplado com a proeminência Shimadzu HPLC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). O monitoramento das múltiplas reações em alta resolução (MRM^{HR}) foi realizada em ionização química em pressão atmosférica (APCI) e probes eletrospray (ESI) nos modos positivo e negativo, respectivamente. A fonte de parâmetros para o método APCI(+) foi a seguinte: nebulização de gás a 50 psi, cortina de gás a 30 psi, corrente na agulha a 3 µA e temperatura de dissolução de 500°C. Os seguintes parâmetros foram utilizados para o método ESI(1): nebulização de gás a 45 psi, aquecimento do gás a 55 psi, cortina de gás a 30 psi, voltagem de -4500 V para o capilar negativo de spray de íons e temperatura de dissolução de 650°C.

O método APCI(+) foi composto por 11 experimentos rápidos (tempo de acumulação: 50 ms cada) com um prévio escaneamento TOF-MS (m/z 100 a 1000). Os outros 10 experimentos consistiram em monitorar produtos de escaneamentos iônicos (m/z 50 a 1000) para os íons correspondentes às moléculas protonadas $[M + H]^+$ de cortisol, progesterona, testosterona, corticosterona, 17- α -hidroxypregesterona, androstenediona, e 11-deoxicortisol assim como para os padrões internos de cortisol-d4, progesterona-d9 e 17- α -hidroxypregesterona-d8. O produto dos escaneamentos iônicos foi ajustado para dissociar a m/z 255.1 do íon, a qual corresponde à molécula protonada desidratada $[M - H_2O + H]^+$. O método ESI(-) foi feito em 6 experimentos (tempo de acumulação: 50 ms cada), iniciando no escaneamento TOF-MS (m/z 100 - 1000). Os outros cinco experimentos foram ajustados como produtos de escaneamento iônico (mass range: m/z 50 - 1000) das moléculas protonadas $[M - H]^-$ de estradiol, estrona e sulfato de estrona, assim como os padrões internos deuterados de estrona-d4 e sulfato de estrona-d4.

Os tempos totais para os ciclos dos métodos APCI(+) e ESI(-) foram de 600 e 350 ms, respectivamente. A energia de colisão propagada foi utilizada em todos os experimentos para gerar uma melhor abundância de íons para quantificação e qualificação de transições. A Tabela 2 mostra as voltagens otimizadas para quantificação e qualificação de íons.

Tabela 2 – Parâmetros de detecção por espectrometria de massas utilizados nos métodos de monitoramento da reação de alta resolução (MRM^{HR}).

Esteróide	Q1 (<i>m/z</i>)	Produto iônico (<i>m/z</i>)	Melhor CE	Voltagens (V)			Ionização
				DP	CE	CES	
Estrona	269.1	145.07	-49	-210	-60	10	ESI –
		143.05	-66				
Sulfato de estrona	349.1	269.15	-42	-130	-50	10	ESI –
		145.08	-68				
Estradiol	271.1	145.07	-50	-50	-60	10	ESI –
		143.05	-68				
Estradiol	255.1	144.11	53	105	40	10	APCI +
		159.08	32				
Cortisol	363.1	121.06	34	120	45	10	APCI +
		105.07	57				
Progesterona	315.2	109.06	30	95	30	10	APCI +
		97.06	27				
Testosterona	289.1	97.06	29	125	30	10	APCI +
		109.06	30				
Corticosterona	347.1	91.05	77	121	57	20	APCI +
		121.06	35				
17- α -progesterona	331.0	97.06	31	122	35	10	APCI +
		109.06	35				
Androstenediona	287.1	109.06	38	118	40	10	APCI +
		97.06	40				
11-desoxicortisol	347.1	97.06	39	121	40	10	APCI +
		109.06	40				

DP = Potencial de dispersão; CE = Energia de colisão; CES = Energia de colisão propagada.

5.5.5. Preparação das amostras e condições cromatográficas

Todos os esteroides foram extraídos de um total de 600 μL de plasma utilizando dois procedimentos de extração.

5.5.6. Procedimento de extração #1 (análise ESI(-))

Estradiol e estrona foram extraídos de 440 μL de plasma após a amostra ser pipetada com 20 μL de solução de padrão interno. A extração líquido/líquido com 3,0 mL de hexano/acetato etílico (90/10) foi feita utilizando um vortex por 1 min. Após a extração, as amostras foram congeladas a -20°C por 1 h. A parte superficial da camada orgânica foi transferida em um tubo limpo e o solvente foi evaporado até a secagem em temperatura ambiente com nitrogênio. As amostras foram reconstituídas em 100 μL de metanol/água (50/50), transferidas a tubos de 250 μL e posteriormente injetadas em um volume de 80 μL no LC-MS/MS. Os hormônios analisados pelo ESI(1) foram separados utilizando a coluna Phenomenex C6-Phenyl Gemini (3,0 μm , 50 x 2 mm) em uma taxa de fluxo na fase móvel de $550 \mu\text{Lmin}^{-1}$. A fase móvel era constituída de 0,05% de solução de hidróxido de amônia (A) e metanol com 0,05% de solução de hidróxido de amônia (B). O gradiente de separação foi definido da seguinte forma: a composição inicial (10% de fase B) foi rapidamente adicionada a 80% da fase B em 2,5 min, seguida de uma adição lenta em 90% da fase B por 5 min. A composição inicial foi adicionada rapidamente entre 5,0 a 5,3 min e mantida até o final da corrida (6,0 min). O tempo de balanceamento intercorridas foi de 1,0 min.

5.5.7. Procedimento de extração #2 (análise APCI(+) e ESI(-) de sulfato de estrona)

O segundo protocolo foi utilizado para extrair todos os componentes analisados no modo APCI(+) (progesterona, cortisol, estradiol, testosterona, corticosterona, 17- α -hidroxiprogesterona, androstenediona, e 11-desoxicortisol) e para extrair sulfato de estrona, o qual foi analisado pelo modo ESI(-). Amostras de plasma foram preparadas por precipitação de proteína com solução de sulfato de zinco contendo os padrões internos. Uma alíquota de 160 μL de plasma foi adicionado em um mesmo volume da solução de precipitação e vortexado por 1 min. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 4°C (3000 rpm) por 10 min, sendo o sobrenadante transferido para um tubo de 250 μL . Os volumes de injeção das

amostras foram de 100 μL e 50 μL para os métodos APCI(+) e ESI(-), respectivamente. Os hormônios foram analisados pelo método APCI(+) e ESI(-), respectivamente. Os hormônios analisados pelo modo APCI(+) foram separados utilizando a coluna Phenomenex Kinetex C18 (2.6 μm , 100 x 3 mm) com a taxa de fluxo da fase móvel de 550 μLmin^{-1} . A fase móvel era constituída de água (A) e metanol (B) ausente de aditivos. A Tabela 3 apresenta a separação cromatográfica dos gradientes.

Tabela 3 – Programa de gradiente cromatográfico utilizado no método APCI(+).

Tempo	Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Fase A (%)	Fase B (%)
2.0	550	90	10
3.0	550	90	10
5.0	550	60	40
7.0	550	30	70
10.0	550	20	80
10.1	550	5	95
12.8	550	5	95
13.0	550	0	100
13.5	550	0	100
13.6	550	90	10
16.5	550	90	10

5.5.8. Análises estatísticas

Para determinar diferenças estatísticas foi realizada ANOVA e as médias comparadas utilizando o teste t-student. As variáveis consideradas no modelo foram origem do embrião

(CTRL, IVF ou SCNT), dias em relação ao parto (D-30, D-1 e D0) e interação. Devido ao fato de conjuntos de dados sobre o mesmo hormônio serem submetidos a múltiplas comparações, a correção da taxa de descoberta falsa (FDR) (BENJAMINI & HOCHBERG, 1995) foi utilizada para controlar erros family wise. O valor de 5% de significância foi considerado como estatisticamente significativo em todas as comparações.

6. RESULTADOS

6.1. Estudo 1: “Abundância de expressão de genes estimulados pelo interferon tau (IFNT) em estágio inicial de prenhez oriundas de técnicas de reprodução assistida (ARTs) em bovinos”

Os dados médios de abundância dos transcritos dos genes OAS1 e ISG15 nas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) em animais prenhes e não-prenhes oriundos de inseminação artificial (AI), fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT) foram submetidos à análise de variância para detecção dos efeitos principais de grupo, tempo e interação entre grupo e tempo. Os valores das probabilidades para cada efeito podem ser visualizados nas Figuras 3 e 4.

A comparação entre animais prenhes e não-prenhes em todos os grupos mostraram uma maior abundância de transcritos para ambos os genes a partir do dia 18 pós-ovulação nos animais prenhes. Entretanto, no grupo SCNT a abundância de transcritos para o gene ISG15 foi maior desde o dia 15 ($P < 0,05$) nos animais prenhes, como mostrado na Figura 4.

Em animais prenhes, o aumento temporal da abundância de transcritos para o gene ISG15 iniciou-se no dia 15 em todos os grupos, e um aumento semelhante ocorreu para o gene OAS1 nos grupos IA e FIV, mas não para o grupo SCNT, no qual o aumento ocorreu somente após o dia 18. Para ambos os genes, os animais não gestantes mantiveram níveis baixos de abundância de transcritos durante os dias 15 ao 20. Entretanto, em animais não-prenhes no grupo FIV ocorreu um pequeno aumento na abundância de transcritos para o gene ISG15 do dia 18 ao 20, o qual pode ter sido ocasionado por uma pequena liberação de IFNT anteriormente a uma perda embrionária precoce, ou por uma variação da técnica de qPCR.

Figura 3 – Média $\pm$ EPM da abundância de transcritos para os genes OAS1 nos animais gestantes (+) e não gestantes (-) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18 e 20 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção das médias (aumento ou diminuição) durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas (a e b) representam diferença entre grupos em um determinado tempo. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Figura 4 – Média $\pm$ EPM da abundância de transcritos para os genes ISG15 nos animais gestantes (+) e não gestantes (-) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18 e 20 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção das médias (aumento ou diminuição) durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas (a e b) representam diferença entre grupos em um determinado tempo. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Durante a prenhez, a análise da abundância de transcritos para OAS1 mostrou efeitos de tempo ($P < 0,0001$) e interação entre grupo e tempo ($P=0,0062$; Figura 5). No grupo IA, foi notado um aumento do dia 15 ao 20, uma queda transitória no dia 24 e uma ressurgência seguida de nova queda no dia 26. No grupo FIV, ocorreu um pico de abundância de transcritos para o gene OAS1 no dia 20, seguido de uma queda gradual até o dia 31. No grupo SCNT, um aumento da abundância de transcritos para OAS1 ocorreu do dia 15 ao 20, seguido de uma manutenção semelhante a um platô até o dia 26, após o qual ocorreu uma queda até o dia 31. Em três momentos específicos a abundância de transcritos para o gene OAS1 foi diferente entre os grupos. O primeiro momento foi no dia 24, no qual o grupo IA mostrou uma queda transitória e ficou abaixo dos outros dois grupos. O segundo e terceiro momentos ocorreram nos dias 28 e 31, respectivamente, sendo que em ambos os momentos os níveis de abundância de transcritos para o gene OAS1 foram menores no grupo IA comparado com o FIV, estando o grupo SCNT intermediário entre os dois.

Figura 5 – Média $\pm$ EPM da abundância de transcritos para os genes OAS1 e ISG15 nos animais gestantes (+) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 27 e 31 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção das médias (aumento ou diminuição) durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas (a e b) representam diferença entre grupos em um determinado tempo. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Semelhante ao gene OAS1, a abundância de transcritos para o gene ISG15 mostrou efeitos significativos de tempo e interação entre grupo e tempo ($P < 0,0001$ e $P=0,0028$, respectivamente; Figura 5). O grupo IA mostrou um aumento gradual na abundância de transcritos de ISG15 atingindo um pico no dia 24, seguido de uma queda transitória no dia 26 e ressurgência no dia 28, após o qual os níveis foram mantidos até o dia 31. O grupo FIV mostrou um pico no dia 20 seguido de uma queda transitória aparente, mas não significativa, no dia 22, a qual foi sucedida por um decréscimo no dia 24. No grupo SCNT foi notado um pico no dia 18 e um decréscimo gradual até o dia 31. Foram encontradas diferenças entre grupos em dois momentos para o gene ISG15, no dia 18 e 28. No dia 18, o grupo SCNT apresentou um pico de abundância de transcritos para o gene de ISG15 atingindo níveis mais elevados que no grupo FIV. No dia 28, o grupo IA apresentou uma ressurgência da expressão de ISG15 atingindo níveis mais elevados que o grupo FIV.

Os valores máximos da abundância de transcritos para os genes OAS1 e ISG15, assim como o dia de ocorrência dos valores máximos para cada grupo, estão representados na Tabela 4. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos com relação ao dia de ocorrência para o valor máximo ($P < 0,05$). Entretanto, independente do dia, a média dos valores máximos de abundância de transcritos para o gene ISG15 foi maior ($P < 0,05$) no grupo SCNT (unidade arbitrária/ISG15 = $0,059 \pm 0,008$) do que no grupo IA (unidade arbitrária/ISG15 = $0,037 \pm 0,003$).

Tabela 4 – Média $\pm$ EPM do valor máximo de abundância de transcritos e dia de ocorrência em prenhez oriundas de inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV), e clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT). Diferenças entre médias estão representadas por letras minúsculas (a e b). $P < 0.05$ foi considerado significativo.

Grupos	IA	FIV	SCNT
Dia de ocorrência do valor máximo			
OAS1	20,50 $\pm$ 0,96	20,80 $\pm$ 0,49	22,40 $\pm$ 0,75
ISG15	23,00 $\pm$ 1,00	21,60 $\pm$ 0,98	20,80 $\pm$ 1,36
Valores máximos			
OAS1	0,41 $\pm$ 0,065	0,535 $\pm$ 0,070	0,454 $\pm$ 0,053
ISG15	0,04 $\pm$ 0,003 b	0,044 $\pm$ 0,007 ab	0,059 $\pm$ 0,008 a

Individualmente, dois diferentes perfis temporais foram encontrados com relação à abundância de transcritos para o gene OAS1 e para o gene ISG15, sendo eles representados por somente um pulso (um único pico) ou múltiplos pulsos (dois ou mais picos). Tais perfis não foram descritos em trabalhos prévios, sendo que no presente trabalho, devido à frequência de ocorrência dos diferentes perfis (Tabela 5), tal achado sugeriu ser este um fenômeno importante. Na comparação entre os grupos não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre a frequência de ocorrência dos dois perfis (Tabela 5), provavelmente devido ao pequeno número experimental por grupo, assim como entre a fold-change nos picos e nadires dos pulsos com relação ao D15 e dia de ocorrência dos picos (Tabelas 6 e 7). Vale ser ressaltado que nenhum animal do grupo SCNT e nenhum do grupo IA apresentou um único pico para os genes OAS1 e ISG15, respectivamente, ou seja, o comportamento encontrado nesses dois grupos é oposto para esses dois genes.

Tabela 5 – Porcentagem de ocorrência de pulsos únicos ou múltiplos (dois ou mais pulsos) na mensuração temporal de abundância de transcritos para os genes OAS1 e ISG15 em prenhez bovina oriundas de inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) durante os dias 15 e 31 pós-ovulação.

Grupo	Número de picos	Porcentagem de ocorrência	
		OAS1	ISG15
IA (n=4)	Únicos	25%	0%
	Múltiplos	75%	100%
FIV (n=5)	Únicos	20%	60%
	Múltiplos	80%	40%
SCNT (n=5)	Únicos	0%	40%
	Múltiplos	100%	60%

Tabela 6 – Fold change de valores comparados com o dia 15 e com o dia médio de ocorrência de pulsos únicos ou múltiplos na abundância de transcritos para o gene OAS1 em prenhez bovina oriundas de inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) durante os dias 15 e 31 pós-ovulação. Não foram detectadas diferenças significativas considerando o valor de $P < 0,05$.

OAS1	Fold change com relação ao D15				
	1º pico (fold change)	Ocorrência (dia)	2º pico (fold change)	Ocorrência (dia)	Dia 31 (fold change)
Único pico					
IA (n=1)	7,30	22,00	.	.	1,28
FIV (n=1)	2,28	22,00	.	.	.
Múltiplos picos					
IA	6,58 ± 1,28 n=3	20,00 ± 1,15 n=3	3,56 ± 0,30 n=3	26,00 ± 0,00 n=3	1,37 ± 0,18 n=3
FIV	5,06 ± 1,56 n=4	20,05 ± 0,50 n=4	3,65 ± 1,01 n=4	26,50 ± 0,50 n=4	2,08 ± 0,69 n=4
SCNT	6,01 ± 2,47 n=5	21,60 ± 0,75 n=5	6,34 ± 3,36 n=5	25,50 ± 0,96 n=5	1,21 ± 0,41 n=5
Valor de P	0,89	0,37	0,64	0,59	0,46

Tabela 7 – Fold change de valores comparados com o dia 15 e com o dia médio de ocorrência do pico de pulsos únicos ou múltiplos na abundância de transcritos para o gene ISG15 em prenhez bovina oriundas de inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e transferência nuclear de células somáticas (SCNT) durante os dias 15 e 31 pós-ovulação. Não foram detectadas diferenças significativas considerando o valor de $P < 0,05$.

OAS1	Fold change com relação ao D15				
	1º pico (fold change)	Ocorrência (dia)	2º pico (fold change)	Ocorrência (dia)	Dia 31 (fold change)
Único pico					
FIV (n=3)	13,13 ± 4,72	20,00 ± 0,00	.	.	2,73 ± 0,91
SCNT (n=1)	2,45	20	.	.	0,35
Valor de P	0,38	.	.	.	0,32
Múltiplos picos					
IA (n=4)	8,53 ± 3,41	20,00 ± 1,41	7,43 ± 2,10	26,00 ± 1,15	4,19 ± 1,24
FIV (n=2)	5,61 ± 1,19	20,00 ± 0,00	7,53 ± 2,30	24,00 ± 0,00	1,85
SCNT (n=3)	5,87 ± 2,27	18,00 ± 0,00	4,01 ± 1,99	27,33 ± 0,67	1,24 ± 0,59
Valor de P	0,75	0,18	0,48	0,2	0,24

Considerando os dois diferentes perfis, os primeiros e segundos picos foram centralizados com relação à média de ocorrência no respectivo grupo. Após a centralização, os dados do primeiro e segundo pulsos foram mesclados para uma visualização mais apropriada durante o tempo, como mostrado na Figura 6 para os genes OAS1 e ISG15. Para o gene OAS1, o grupo SCNT apresentou um atraso em 2 dias para o primeiro pico quando comparado com os grupos IA e FIV (dia 22 versus dia 20), sendo a abundância de transcritos no dia 20 mais baixa no grupo SCNT do que no FIV. O segundo pico de OAS1 ocorreu no dia 26 em todos os grupos, sendo encontrados valores mais baixos no grupo IA quando comparado com o FIV no dia 28. Para o gene ISG15, ocorreu um avanço de 2 dias na ocorrência do primeiro pico no grupo SCNT quando comparado com o IA e FIV (dia 18 versus dia 20), sendo representado por níveis mais elevados de abundância de transcritos no grupo SCNT quando comparado com IA. O segundo pico de ISG15 ocorreu dois dias após no grupo IA quando comparado com FIV e SCNT (dia 26 versus dia 24), mas não foram notadas

diferenças estatísticas significativas na abundância de transcritos entre os grupos durante esse período.

Figura 6 – Média $\pm$ EPM da abundância de transcritos em cada pulso (aumento seguido de diminuição) para os genes OAS1 e ISG15 nos animais gestantes (+) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 27 e 31 pós-ovulação. Para uma melhor visualização das variações os dados de cada pulso foram centralizados no dia médio de ocorrência do pico e mesclados com os dados do pulso subsequente no seu respectivo grupo. Anéis representam mudança de direção das médias (aumento ou diminuição) durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas (a e b) representam diferença entre grupos em um determinado tempo. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Devido às diferenças do padrão temporal da abundância de transcritos entre os genes *OAS1* e *ISG15*, foi calculada a média geométrica (MG) entre os dois genes a fim de fortalecer os achados da análise indireta da liberação de IFNT pelo conceito. A média geométrica é representada pela fórmula $\sqrt{OAS1 \times ISG15}$, no qual a sigla dos genes representam o valor arbitrário do respectivo gene, sendo utilizada para demonstrar a variação média entre valores com diferentes escalas numéricas. Nessa abordagem, o aumento da abundância de transcritos é representada simultaneamente por dois genes, reforçando a análise indireta do efeito do IFNT. Na comparação entre os animais gestantes, não foram notadas diferenças entre os grupos, sendo detectado um pico da MG no D20 para todos os grupos. Entretanto, no D24 notou-se maiores valores da MG para os animais gestantes nos grupos FIV e SCNT quando comparados com IA, e no D28 maiores valores de MG para o grupo FIV quando comparado com o IA sendo o SCNT intermediário entre os dois (Figura 7). Na comparação entre animais gestantes e não gestantes, todos os grupos exibiram um perfil temporal semelhante de valores de MG, demonstrando um aumento iniciando-se no D15 e maiores valores de MG no grupo gestante do que no não gestante nos dias 18 e 20 (Figura 8).

Figura 7 – Média $\pm$ EPM da média geométrica da abundância de transcritos entre os genes OAS1 e ISG15 nos animais gestantes (+) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18, 20, 22, 24, 26, 27 e 31 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção das médias (aumento ou diminuição) durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas (a e b) representam diferença entre grupos em um determinado tempo. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Figura 8 – Média $\pm$ EPM da média geométrica da abundância de transcritos entre os genes OAS1 e ISG15 nos animais gestantes (+) e não gestantes (-) para os grupos IA, FIV e SCNT durante os dias 15, 18 e 20 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção das médias (aumento ou diminuição) durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas (a e b) representam diferença entre grupos em um determinado tempo. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Estudo 2: “Alterações morfológicas e vasculares no útero e ovários, e do estímulo da expressão de ISGs em PBMCs maternas, em fêmeas gestantes de conceptos oriundos de clonagem e IA em bovinos”

O presente estudo descreveu mudanças morfológicas e vasculares no útero e ovários de fêmeas bovinas gestando conceptos clonados por SCNT e produzidos por IA. Também avaliou o estímulo desses conceptos na expressão de ISGs em PBMCs maternas, como no estudo 1, a fim de indiretamente mensurar a produção de IFNT. No caso dos conceptos clonados por SCNT, dois diferentes fenótipos gestacionais aberrantes foram detectados por exame ultrassonográfico e foram denominados de gestação anembrionada e de receptora com CL persistente. A descrição do desenvolvimento do conceito foi definida por ultrassonografia transretal nos modos-B e Doppler colorido, considerando a presença de membranas do conceito, embrião com batimentos cardíacos e manutenção da funcionalidade do CL. Tanto a funcionalidade do corpo lúteo quanto à vitalidade do conceito foram definidas pela presença de fluxo sanguíneo visualizado nestas estruturas por ultrassonografia no modo Doppler-colorido. Os três fenótipos gestacionais de clones bovinos por SCNT foram previamente descritos e definidos por Jardim (2016), como: (1) gestações de clones normais (CNG; $n = 31$) nas quais foi localizada na imagem ultrassonográfica a vesícula embrionária com membranas preenchidas por líquido, embrião com batimentos cardíacos e presença de um CL ativo, (2) gestações de clones anembrionadas (CAG; $n = 13$) as quais apresentavam a vesícula preenchida por líquido, ausência do embrião e presença de CL ativo, e (3) receptoras de clone com CL persistente (CPCL; $n = 16$) as quais não apresentavam a vesícula e embrião, mas tinham um CL ativo. O grupo controle (CTRL; $n = 6$) foi formado por animais gestantes após IA. Em todas os grupos estudados, a função luteal foi mantida por mais de 25 dias.

A Tabela 8 mostra os dias de ocorrência de perda gestacional (ausência de batimentos cardíacos no embrião) e regressão luteal após a perda gestacional no grupo CNG e da regressão luteal nos grupos CAG e CPCL. Dezenove animais (14 CNG; 4 CAG; e 1 CPCL) foram retirados do experimento ou receberam análogo de prostaglandina antes da detecção da regressão luteal, sendo, portanto, excluídos da comparação representada na Tabela 8. No grupo CNG, foi comparado o tempo entre a perda gestacional e regressão luteal em perdas que ocorreram antes ou depois de 35 dias de gestação. Em perdas que ocorreram após o dia 35 de gestação, a manutenção luteal foi prolongada ($P < 0,05$; 28.40 ± 8.62 dias) quando comparada com perdas que ocorreram antes do dia 35 (9.22 ± 2.12 dias), sugerindo um bloqueio da luteólise mais persistente no avançar da gestação. Nos fenótipos aberrantes (CAG

e CPCL), o dia da regressão luteal foi similar às perdas gestacionais anteriores ao dia 35, ocorrendo em média no dia 42 de gestação.

Tabela 8 – Média $\pm$ EPM do dia da perda gestacional, regressão luteal e dias entre a perda gestacional e regressão luteal em prenhez de conceitos clonados (grupo CNG) e fenótipos aberrantes em gestações anembrionadas (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) durante o desenvolvimento de conceitos clonados. O grupo CNG foi dividido em dois subgrupos com relação ao período de perda gestacional, anteriormente e posteriormente ao dia 35 pós-ovulação, assim como foi detectado o período entre a perda gestacional e regressão luteal no grupo e cada subgrupo. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre os grupos utilizando o valor de $P < 0.05$.

Grupo	Subgrupo	Dias pós-ovulação		Dias Entre perda gestacional e regressão luteal
		Perda gestacional	Regressão luteal	
	Todas as prenhezes	45.00 $\pm$ 9.75	63.00 $\pm$ 9.44	17.80 $\pm$ 5.51
CNG (n = 10)	Perdas gestacionais < D35 (n = 5)	31.00 $\pm$ 0.41 a	40.00 $\pm$ 2.48 ab	9.22 $\pm$ 2.12 a
	Perdas gestacionais > D35 (n = 5)	39.80 $\pm$ 1.93 b	68.20 $\pm$ 6.87 c	28.40 $\pm$ 8.62 b
CAG (n = 9)			48.00 $\pm$ 7.74 ab	
CPCL (n = 15)			38.27 $\pm$ 2.21 b	

A área do CL mostrou efeito principal de grupo ($P = 0,023$), sendo as médias nos grupos CNG e CTRL maiores ($P < 0,05$) do que no grupo CPCL, enquanto que o grupo CAG apresentou-se similar aos outros três (Figura 9). O fluxo sanguíneo do CL apresentou efeito principal de tempo ($P < 0,0001$), sendo que, quando combinados os grupos, foi demonstrado um aumento ($P < 0,05$) do D14 ao 23 seguido de uma manutenção do fluxo sanguíneo luteal (Figura 9).

Figura 9 – Média $\pm$ EPM para os valores de área e fluxo sanguíneo do CL na comparação entre prenhez (grupo CNG), gestação anembrionada (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceptos clonados e prenhez oriundas de IA (grupo CTRL) durante os dias 14 e 35 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção (aumento ou diminuição) dos valores durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas representam diferenças entre grupos no determinado tempo e letras maiúsculas diferença entre tempos quando os grupos foram combinados. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

A ecotextura endometrial foi diferente entre os grupos ($P = 0,025$), sendo maior em CAG e CPCL, intermediária em CNG e menor em CTRL (Figura 10). Do mesmo modo, o fluxo sanguíneo endometrial do corno ipsolateral ao CL apresentou diferença entre os grupos ($P = 0,007$), representado por valores médios na seguinte ordem do maior para o menor: CTRL, CNG, CAG e CPCL. Nos grupos CNG, CAG e CPCL, mas não no CTRL, ocorreu uma queda ($P < 0,05$) do fluxo sanguíneo endometrial do dia 14 ao 20. Além disso, foi notado um aumento ($P < 0,05$) do fluxo sanguíneo endometrial a partir do D20 nos grupos CNG, CAG e CTRL, mas não no CPCL (Figura 10). No grupo CPCL um pequeno, embora significativo ($P < 0,05$), aumento ocorreu entre os dias 23 e 32.

Figura 10 – Média $\pm$ EPM para os valores de ecotextura e fluxo sanguíneo endometrial na comparação entre prenhez (grupo CNG), gestação anembrionada (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceitos clonados e prenhez oriundas de IA (grupo CTRL) durante os dias 14 e 35 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção (aumento ou diminuição) dos valores durante o tempo em cada grupo. Letras maiúsculas representam diferenças durante o tempo no respectivo grupo indicado. O valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo.

Em todos os grupos, o fluxo sanguíneo endometrial foi avaliado individualmente para cada corno uterino, sendo os dados classificados em corno ipsolateral ao CL e contralateral ao CL. Quando as comparações foram feitas entre cornos, foi notada diferença significativa nos grupos CNG ($P = 0,0428$) e CTRL ($P = 0,0537$), respectivamente. Em todos os grupos foi encontrado efeito principal de tempo ($0,0012 < P < 0,0001$), sendo observada uma queda do D14 ao 20 em ambos os cornos nos grupos CNG, CAG e CPCL, seguido de um aumento. No grupo CTRL um aumento ($P < 0,05$) ocorreu no corno ipsolateral a partir do D20 e foi observado no corno contralateral a partir do D32 (Figura 11).

Figura 11 – Média $\pm$ EPM para os valores de fluxo sanguíneo endometrial na comparação entre os grupos prenhes (CNG), gestação anembrionada (CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceitos clonados e prenhez oriundas de IA (grupo CTRL) durante os dias 14 e 35 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção (aumento ou diminuição) dos valores durante o tempo em cada grupo. Asteriscos indicam diferença entre cornos nos dias indicados. O valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo.

A fim de detectar a liberação de interferon tau (IFNT) pelo conceito das gestações normais (CNG e CTRL) e dos fenótipos anormais (CAG e CPCL), foi feita a mensuração por PCR em tempo real da abundância de transcritos de dois genes estimulados pelo IFNT (ISGs) presentes em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) maternas, sendo eles o OAS1 e ISG15 (Figura 12). O resultado do gene OAS1 apresentou efeito de tempo ($P < 0,0001$) e interação entre grupo e tempo ($P = 0,0187$). Quando os grupos foram combinados, foi detectado um aumento ($P < 0,05$) do dia 15 ao 20, seguido de uma queda ($P < 0,05$) até o dia 31. No dia 24, os grupos CNG e CPCL apresentaram valores mais elevados ($P < 0,05$) do que o CTRL estando o CAG semelhante aos outros dois grupos.

Figura 12 – Média $\pm$ EPM para os valores arbitrários dos genes OAS1 e ISG15 na comparação entre prenhez (grupo CNG), gestação anembrionada (grupo CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceitos clonados e prenhez oriundas de IA (grupo CTRL) durante os dias 14 e 35 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção (aumento ou diminuição) dos valores durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas (a, b e c) representam diferenças entre grupos no determinado tempo e letras maiúsculas (A, B, C, D e E) representam mudanças durante o tempo quando os grupos foram combinados. O valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo.

Para a abundância de transcritos para o gene ISG15 foram encontrados efeitos de grupo ($P = 0,0376$), tempo ($P < 0,0001$) e interação ($P = 0,0046$). Os grupos CNG e CTRL apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) do que o grupo CPCL, sendo o grupo CAG similar entre eles. Do dia 15 ao 18, os grupos CNG e CAG apresentaram um aumento, o qual diminuiu rapidamente no grupo CAG até o dia 20 e mais lentamente no grupo CNG até o dia

31. Além disso, foi notada uma aparente ressurgência ($P > 0,05$) no grupo CAG entre os dias 26 e 28. O grupo CPCL apresentou um leve aumento ($P < 0,05$) do dia 15 ao 20, seguido de uma queda ($P < 0,05$) até o dia 26, após o qual foi mantido aparentemente em níveis basais. No grupo CTRL foi notado um aumento gradual ($P < 0,05$) até o dia 24, seguido de uma queda ($P < 0,05$) transitória no dia 26 e ressurgência ($P < 0,05$) no dia 28, após o qual os níveis foram mantidos elevados até o dia 31. Nos dias 22 e 24, o grupo CNG apresentou níveis elevados ($P < 0,05$) quando comparado com os demais grupos. A ressurgência notada no grupo CAG resultou em níveis mais elevados ($P < 0,05$) do que o grupo CPCL nos dias 26 e 28. A diminuição momentânea ($P < 0,05$) no grupo CTRL no dia 26 atingiu valores baixos e similares ao grupo CPCL, embora nos dias 28 e 31 os níveis tenham sido reestabelecidos a valores similares ao do dia 24. No grupo CPCL, o início da queda nos valores a partir do dia 20 resultou em níveis abaixo ($P < 0,05$) do grupo CNG nos dias 22, 24 e 26, abaixo do grupo CAG nos dias 26 e 28, abaixo do grupo CTRL nos dias 24, 28 e 31.

Devido à evidente diferença no perfil dos dois genes utilizados, assim como o n experimental limitado entre os grupos, optou-se pela utilização da média geométrica entre os valores arbitrários para cada gene, representada pela fórmula $\sqrt{OAS1 \times ISG15}$, utilizada para demonstrar a variação média entre os valores com diferentes escalas numéricas. Pelo fato da expressão dos dois genes ser estimulada pelo mesmo fator, o IFNT, a média geométrica apresentou-se como mais representativa da avaliação indireta da produção de IFNT pelo conceito (Figura 13). Na comparação entre os grupos, foi encontrado apenas efeito principal de tempo ($P < 0,0001$), representado por aumento do D15 ao 18, seguido de queda a partir do D24 quando os grupos foram combinados. Esse achado demonstra que todos os grupos apresentaram um estímulo à expressão de ISGs durante o período estudado, com intensidade semelhante.

Figura 13 – Média $\pm$ EPM para a média geométrica dos valores arbitrários entre os genes OAS1 e ISG15 nos grupos de gestações normais de clone (CNG), gestação anembrionada (CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceitos clonados e prenhez oriundas de IA (CTRL) durante os dias 15 e 35 pós-ovulação. Letras maiúsculas (A, B, C, D e E) representam mudanças durante o tempo quando os grupos foram combinados. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Além da comparação entre os grupos, durante os dias 15 ao 20, foi feita para cada grupo a comparação da média geométrica dos genes entre animais que mantiveram o CL após o dia 25 (+) e aqueles que regrediram o CL anteriormente ao dia 25 (-), representada pela figura 14. Os grupos CNG e CTRL apresentaram efeito de grupo ($P < 0,03$), tempo ($P < 0,03$) e interação ($P < 0,004$), representado por maiores valores nos animais que mantiveram o CL, CNG(+) e CTRL(+), do que aqueles que regrediram o CL até o dia 25, CNG(-) e CTRL(-), sendo detectado um aumento gradual nos animais dos grupos CNG(+) e CTRL(+) do dia 15 ao 20, sendo os valores maiores ($P < 0,05$) do que o grupo CNG(-) e CTRL(-), respectivamente, do dia 18 ao 20. O grupo CAG não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos CAG(+) e CAG(-). No grupo CPCL foi encontrado efeito de tempo ($P = 0,0001$), representado por um aumento do dia 15 ao 18 quando os grupos CPCL(+) e CPCL(-) foram combinados (Figura 14).

Figura 14 – Média $\pm$ EPM para a média geométrica dos valores arbitrários entre os genes OAS1 e ISG15 na comparação entre os animais gestantes e não gestantes nos grupos de gestações normais de clone (CNG), gestação anembrionada (CAG) e CL persistente (CPCL) de receptoras portando conceitos clonados e prenhez oriundas de IA (CTRL) durante os dias 14 e 20 pós-ovulação. Anéis representam mudança de direção (aumento ou diminuição) dos valores durante o tempo em cada grupo. Letras minúsculas (a, b e c) representam diferenças entre grupos no determinado tempo e letras maiúsculas (A, B, C, D e E) representam mudanças durante o tempo quando os grupos foram combinados. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

6.2. Estudo 3: “Dinâmica esteroidogênica do plasma sanguíneo periférico durante o último mês de gestação em prenhez bovina naturalmente e artificialmente concebidas, elucidada por espectrometria de massas LC-MS/MS multi-hormonal de alta resolução”

O presente trabalho demonstrou a utilização da técnica de espectrometria de massa pelo método *LC-MS/MS* para mensuração simultânea de dez esteroides durante o último mês de gestação em bovinos. Prenhez oriundas de clonagem por SCNT e FIV foram comparadas com gestações naturalmente concebidas a fim de detectar diferenças na cascata esteroidogênica devido à aplicação das duas técnicas de reprodução assistida.

6.2.1. Desenvolvimento e validação do método LC-MS/MS

A maior parte dos esteroides foi separada e forneceram picos cromatográficos entre 0,2 min. Mesmo após volumes maiores de injeção serem utilizados, não ocorreu efeito negativo na performance da separação. O espectrômetro de massas foi regulado para um escaneamento rápido em todos os experimentos MRM^{HR} para obter aproximadamente 10 a 15 pontos entre os picos cromatográficos para a quantificação. Nas Figuras 15 e 16 estão representados os cromatogramas da extração de íons obtidos para os esteroides utilizando os métodos APCI(+) e ESI(-). As validações dos métodos foram feitas levando-se em conta a sensibilidade, linearidade, precisão, recuperação, carreamento, efeito de matriz e seletividade (interferência de matriz).

Figura 15 – Representação dos cromatogramas de íons extraídos (XIC) em cada esteroide analisado pelo método APCI (+).

Figura 16 – Representação dos cromatogramas de íons extraídos (XIC) em cada esteroide analisado pelo método ESI (-).

6.2.1.1. Limite de Detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

O limite de quantificação (LOQ) para todos os esteroides foi definido como a menor concentração do composto que pode ser determinada com uma razão do sinal até o som (S/N) de 5 ou maior, assim como uma imprecisão máxima de 20%. O limite de detecção (LOD) foi

determinado como a quantidade mínima de amostra injetada que produziu uma razão S/N de 3.

6.2.1.2. Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, seis pontos de calibração foram obtidos por injeção de amostras com concentrações variando entre o valor de LOQ e mil vezes o valor de LOQ. Todos os esteroides mostraram uma dinâmica de linearidade dentro de três ordens de magnitude e as curvas de calibração na variação de trabalho foram construídas utilizando seis pontos de calibração pela regressão linear e ajuste de peso de $1/x$ ou $1/x^2$ para priorizar os pontos com baixa concentração. Curvas analíticas foram traçadas por taxas de respostas e mostrarão valores de r^2 iguais ou maiores do que 0,99 (Tabela 9).

Tabela 9 – Resumo da performance e resultado dos métodos ESI (-).

Esteróide	Nível de QC (ng mL ⁻¹)	Taxa de calibração (ng mL ⁻¹)	Intra-ensaios (N=5)				Inter-ensaios (N=15)				LOQ (ng mL ⁻¹)
			Média (ng mL ⁻¹)	SD (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Precisão (%)	Média (ng mL ⁻¹)	SD (ng mL ⁻¹)	RSD (%)	Precisão (%)	
Estradiol	0,4		0,34	0,025	7,46	84,9	0,35	0,023	6,63	87,1	
	4,0	0,10 – 15,0	3,45	0,140	4,05	86,3	3,54	0,155	4,39	88,5	0,10
	12,0		10,9	0,367	3,36	91,1	11,1	0,638	5,74	92,7	
Estrona	0,1		0,08	0,009	11,2	83,1	0,09	0,007	7,46	88,1	
	0,4	0,025 - 3,75	0,34	0,027	7,9	84,6	0,33	0,013	4,05	82,8	0,025
	3,0		2,78	0,184	6,6	92,7	2,89	0,097	3,36	96,4	
Sulfato de estrona	4,0		3,85	0,339	8,8	96,2	3,92	0,267	6,80	98,1	
	16,0	1 - 150	15,73	1,132	7,2	98,3	15,4	0,787	5,11	96,5	1,00
	120,0		124,4	5,724	4,6	103,7	123,4	3,022	2,45	102,8	
Cortisol	4,0		3,27	0,152	4,65	81,6	3,27	0,146	4,48	81,7	
	40,0	1,00 – 150,0	35,3	2,254	6,39	88,2	35,8	1,227	3,43	89,4	1,00
	120,0		110,5	5,711	5,17	92,1	108,8	2,600	2,39	90,7	
Progesterona	0,4		0,36	0,027	7,48	89,9	0,36	0,010	2,86	90,4	
	4,0	0,10 – 15,0	3,50	0,181	5,16	87,5	3,54	0,083	2,35	88,5	0,10
	12,0		10,7	0,417	3,89	89,3	10,6	0,240	2,26	88,5	
Testosterona	0,4		0,34	0,029	8,46	84,2	0,34	0,014	4,08	84,6	
	4,0	0,10 – 15,0	3,53	0,224	6,34	88,3	3,58	0,165	4,61	89,5	0,10
	12,0		11,2	0,537	4,81	93,1	11,0	0,495	4,49	91,9	
Corticosterona	0,2		0,17	0,030	18,2	83,6	0,17	0,028	16,8	82,5	
	2,0	0,05 – 7,50	1,76	0,295	16,7	88,2	1,81	0,269	14,9	90,4	0,05
	6,0		5,45	0,676	12,4	90,8	5,18	0,487	9,4	86,3	
17-OH-Progesterona	0,4		0,32	0,020	6,28	80,08	0,33	0,017	5,04	82,3	
	4,0	0,10 – 15,0	3,41	0,154	4,52	85,17	3,56	0,155	4,36	89,1	0,05
	12,0		10,9	0,279	2,56	90,7	11,1	0,447	4,02	92,7	
Androstenediona	0,1		0,11	0,014	12,32	91,4	0,12	0,005	4,56	96,7	
	1,2	0,03 – 4,50	1,18	0,104	8,8	98,0	1,19	0,055	4,63	98,8	0,025
	3,6		3,74	0,202	5,39	103,9	3,68	0,178	4,84	102,2	
11-desoxicortisol	0,1		0,16	0,031	19,89	131,6	0,15	0,028	19,1	124,2	
	1,2	0,03 – 4,50	1,35	0,127	9,43	112,5	1,40	0,087	6,2	116,3	0,025
	3,6		4,33	0,311	7,2	120,2	4,32	0,184	4,26	119,9	

* *estão expostos somente os resultados do método ESI(-).*

6.2.1.3. Precisão e recuperação

O valor de CV intra-dia variou de 2,56% (17-OH-progesterona) a 19,89% (11-desoxicortisol) para o método APCI(+) e de 3,36% (estradiol) a 11,2% (estrona) para o

método ESI(-). A maior imprecisão inter-dia foi observado para corticosterona (17%) e estrona (7,5%) nos métodos positivos e negativos, respectivamente. A recuperação foi calculada comparando concentrações teóricas para os três níveis de CQ. Todos os esteroides mostraram recuperação entre 80 e 120% em todas as concentrações, exceto para o 11-deoxycortisol, o qual exibiu 131,8% de recuperação na concentração baixa. Na Tabela 9 estão expostos os valores da precisão e recuperação intra- e inter-dia para os esteroides.

6.2.1.4. Seletividade

Amostras de plasma foram enriquecidas com padrões de esteroides com o respectivo nível de QC, extraídas e analisadas para checar picos de interferência nos tempos de retenção apropriados para os modos APCI(+) (Figura 15) e ESI(-) (Figura 16).

6.2.1.5. Efeito de matriz e transporte

O efeito de matriz foi investigado pela comparação entre os picos obtidos para as soluções padrões versus amostras enriquecidas com branco na mesma concentração nominal. Dois níveis diferentes de concentração foram verificados: o LOQ e dez vezes o LOQ. Nenhum efeito de matriz foi detectado para todos os esteroides nas áreas absolutas (<20%) ou na concentração correta para o padrão interno (<10%). O transporte foi avaliado e nenhuma amostra foi detectada para todos os esteroides após a injeção no ponto de maior concentração. Um programa de limpeza por 10 segundos utilizando uma solução composta de acetonitrila, isopropanol e 0,1% de ácido fórmico (1:1:1) foi utilizado para evitar transporte inter-injeção.

6.2.2. Concentração de progesterona e 17- α -OH-progesterona em fêmeas bovinas gestantes

A concentração de progesterona (P4) foi similar nos grupos CTRL, IVF e SCNT durante o último mês de gestação. Em todos os grupos, a concentração de P4 diminuiu no transcorrer da gestação até o parto. Nos grupos CTRL e IVF, as concentrações de P4 foram similares nos dias D-30 e D-1, mas menores no D0 quando comparadas com o D-30. No

grupo SCNT, as concentrações de P4 diminuíram do dia D-30 ao D-1, mas não ocorreu mudanças significativas no dia subsequente (Figura 17-A). Perfis similares foram observados para 17- α -OH-progesterona, notando-se uma queda nos níveis de P4 no transcorrer da gestação até o termo. Nos grupos SCNT e CTRL, os níveis de 17- α -OH-progesterona diminuíram do dia D-30 até D-1, sendo mantidos no dia subsequente. A concentração de 17- α -OH-progesterona foi diferente no D-30 para os grupos CTRL e IVF, sendo menor no grupo IVF. No grupo IVF, não se observou diferenças nos níveis de 17- α -OH-progesterona durante os dias D-30 e D-1, mas ocorreu uma queda no D0 (Figura 17-C).

6.2.3. Concentração de corticosteroides em fêmeas bovinas gestantes

As concentrações de corticosterona, 11-desoxicortisol e cortisol apresentaram uma redução marcante de 17,7, 3,5, e 10 vezes, respectivamente, no grupo SCNT do D-30 aos dias subsequentes, enquanto que nos demais grupos os níveis mantiveram-se constantes. As concentrações de corticosterona foram diferentes entre os grupos CTRL e IVF em todos os períodos, e entre os grupos CTRL e SCNT no D-1; para ambas comparações, as concentrações de corticosterona foram sempre altas no grupo CTRL ($P > 0.05$). No D-30, o grupo SCNT apresentou elevadas concentrações de 11-desoxicortisol quando comparado com o grupo controle e níveis mais elevados dos três esteroides quando comparados com o grupo FIV (Figuras 17-B, 17-D, 17-E)

6.2.4. Concentração de esteroides sexuais em fêmeas bovinas gestantes

O perfil da androstenediona revelou uma cinética diferente entre os grupos. Enquanto a androstenediona manteve-se constante durante o último mês de gestação nos grupos controle e FIV, ocorreu um aumento no grupo SCNT, de $0,11 \pm 0,03 \text{ ngmL}^{-1}$ no D-30 a $1,24 \pm 0,22 \text{ ngmL}^{-1}$ no D0; nesse momento o grupo SCNT diferiu significativamente dos grupos FIV e controle (Figura 17-F). Os níveis de testosterona mantiveram-se inalterados durante o último mês de gestação em todos os grupos e, embora tenham sido observadas diferenças numéricas, nenhuma diferença significativa ocorreu entre os grupos.

Os níveis plasmáticos de estrona e estradiol foram constantes nos grupos controle e FIV, enquanto que no grupo SCNT somente o estradiol manteve-se constante. No grupo

SCNT, entretanto, a concentração de estrona aumentou significativamente próximo ao final da gestação e no D0 os níveis de estrona atingiram uma concentração similar à do grupo FIV. Exceto por essa similaridade, as concentrações de estrona e estradiol foram consideravelmente elevadas no grupo FIV (Figura 17-G e 17-J). A concentração de sulfato de estrona aumentou do D-30 ao D-1 e D0 no grupo controle e do dia D-30 ao D-1 no grupo SCNT, enquanto que os níveis de sulfato de estrona foram semelhantes durante todo último mês de gestação e prenhezes de FIV. Foi observado baixos níveis de sulfato de estrona no grupo SCNT no D-30 quando comparado com o grupo FIV e no D0 quando comparado com o grupo CTRL (Figura 17-H).

Figura 17 – Níveis plasmáticos de moléculas da via dos corticosteroides (progesterona (A), corticosterona (B), 17- α -OH-progesterona (C), 11-deoxicortisol (D), cortisol (E) e da via dos esteroides sexuais (androstenediona (F), estrona (G), sulfato de estrona (H), testosterona (I), estradiol (J) e razão entre estrona (E1)/sulfato de estrona (E1S; K) em receptoras bovinas prenhes de conceitos controle (CTRL) ou conceitos derivados de FIV ou SCNT 30 dias (D-30) e 1 dia (D-1) anteriores ao parto e no dia do parto (D0). As letras diferentes acima das barras cinzas (a e b), pretas (a', b' e c') e brancas (a'' e b'') indicam diferenças significativas ($P < 0.05$) nos grupos CTRL, FIV e SCNT, respectivamente. Diferenças significativas ($P < 0.05$) estão marcadas por um colchete e asterisco para a comparação entre FIV e SCNT, um colchete e dois asteriscos para a comparação entre CTRL e FIV, e um colchete e três asteriscos para a comparação entre CTRL e SCNT. As setas tracejadas indicam uma redução da eficiência de conversão na placenta bovina.

7. DISCUSSÃO

7.1. Estudo 1: “Abundância de expressão de genes estimulados pelo interferon tau (IFNT) em estágio inicial de prenhez oriundas de técnicas de reprodução assistida (ARTs) em bovinos”

O interferon tau (IFNT) liberado pelo trofotoderma altera a expressão gênica no útero e permite o estabelecimento da prenhez (SPENCER et al., 2004). A produção de IFNT se inicia no estágio de blastocisto (HERNANDEZ-LEDEZMA et al., 1992) e aumenta com o alongamento do conceito (MANN & LAMMING 2001). A administração intrauterina de IFNT exógeno aumenta a expressão de genes estimulados pelo IFNT (ISGs) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) materno duas horas após sua administração, atingindo um pico após quatro horas, seguido de um decréscimo até níveis basais (MATSUYAMA et al., 2012), sendo esse efeito dose dependente. Seguindo esse contexto, o presente estudo avaliou indiretamente a sinalização do conceito pelo IFNT pela avaliação da abundância de transcritos de ISGs em PBMCs maternas em gestações oriundas de técnicas de reprodução assistida, sendo essas a inseminação artificial (IA), fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem por transferência nuclear de células somáticas (SCNT). A técnica de avaliação da abundância de transcritos para dois ISGs, sendo esses o OAS1 e ISG15, mostrou-se eficiente em avaliar o estímulo pelo IFNT, representado por uma maior abundância de transcritos em animais gestantes a partir do D18 e manutenção dos valores no D20 em todos os grupos. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores utilizando gestações naturalmente concebidas (PUGLIESI et al., 2014; KIZAKI et al., 2012; GREEN et al., 2010; MANJARI et al., 2016. GIFFORD et al., 2007; SOUMYA et al., 2016). Nesses estudos, os dias de gestação foram centralizados para o dia da inseminação artificial (dia anterior à ovulação), tendo uma diferença de aproximadamente um dia na definição dos dias gestacionais quando comparados com o presente trabalho.

A hipótese de que gestações de embriões clonados por SCNT apresentam uma baixa e mais tardia estimulação dos genes estimulados pelo interferon (ISG) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) quando comparadas com gestações de embriões produzidos *in vitro* e gestações naturalmente concebidas — não foi suportada para ambos os genes. O perfil de expressão encontrado neste estudo para o gene OAS1 apresentou uma

pequena diferença quando comparado com o perfil de expressão do gene ISG15. No caso do gene OAS1, o grupo SCNT gestante apresentou um atraso no aumento de abundância de transcritos (D18 versus D15), representando indiretamente um possível atraso na produção de IFNT. Para o gene ISG15 do grupo FIV vazia (Figura 4) foi encontrado um aumento de abundância de transcritos do D18 ao 20, o qual pode ter sido ocasionado por um possível desenvolvimento inicial do concepto com pouca liberação de IFNT, falha de técnica de análise ou interferência por ativação da imunidade individual das receptoras por possível infecção viral no momento descrito (LENSCHON et al., 2005; NAKAYA et al., 2001). Entretanto, todos os animais mativeram-se saudáveis durante todo o experimento, sendo a segunda hipótese pouco provável.

O perfil temporal da abundância de transcritos nos animais gestantes apresentou algumas particularidades para cada gene e grupo. Em todos os grupos, o gene OAS1 demonstrou um aumento da abundância de transcritos do dia 15 ao 20. No grupo IA, ocorreu uma queda no dia 24 seguido de uma ressurgência no dia 26, após o qual os valores descaíram gradativamente até o dia 31. No grupo FIV, uma queda gradativa ocorreu do dia 20 até o dia 31. No grupo SCNT, notou-se uma manutenção dos valores até o dia 26, após o qual ocorreu uma queda gradativa até o dia 31. A comparação entre os três perfis demonstrou que a sinalização do concepto apresentou dois aumentos no grupo IA, foi abrupta no grupo FIV e duradoura no grupo SCNT (Figura 5). Tais particularidades sugerem diferenças na produção de IFNT pelos conceptos em cada grupo, sendo essa mais evidente no grupo SCNT, podendo ser justificada por experimentos anteriores que descrevem uma grande variabilidade no desenvolvimento do concepto por essa técnica (CHAVATTE-PALMER et al., 2012)

No caso do gene ISG15, o perfil temporal da abundância de transcritos foi diferente do gene OAS1, demonstrado por um aumento tardio no grupo IA (D15 ao 24) e um antecipado aumento no grupo SCNT (D15 ao 18). Após o primeiro aumento, no grupo IA notou-se uma queda até o D26, após o qual ocorreu um aumento até o D28 seguido de uma queda, representando, portanto, uma ressurgência na expressão gênica, sugerindo indiretamente um segundo aumento na produção de IFNT. Um aparente aumento também ocorreu no grupo FIV no D24, mas não no grupo SCNT. Desse modo, o gene ISG15 demonstrou diferenças marcantes no perfil da expressão gênica quando comparado ao do gene OAS1. Os dois aumentos na expressão do gene ISG15 nos grupos IA e FIV foram semelhantes ao gene OAS1, entretanto o grupo SCNT apresentou uma antecipação na expressão de ISG15, seguido de uma queda brusca. Como comentado previamente, embora todos os animais tenham sido

mantidos saudáveis durante todo o experimento, infecções virais subclínicas podem ter ocorrido e influenciado os resultados. Sabe-se que em infecções virais a expressão de ISGs é estimulada (LENSHOW et al., 2005; NAKAYA et al., 2001), podendo a resposta antiviral ser diferenciada para cada ISG, sugerindo essa como uma das explicações para a marcante diferença encontrada entre os dois genes estudados.

Além do perfil da expressão gênica, foram avaliados os valores máximos da abundância de transcritos para cada gene, a fim de mensurar indiretamente o grau do estímulo pelo IFNT entre grupos. Não foram detectadas diferenças no dia de ocorrência do valor máximo entre grupos, demonstrando que todos os grupos apresentaram o estímulo pelo IFNT em um período semelhante. Entretanto, notou-se valores máximos de abundância de transcritos mais elevados no grupo SCNT do que no IA e estando o grupo FIV entre os dois. Há evidência de alterações de desenvolvimento placentário em gestações de SCNT e FIV, sendo essas alterações sugerida como a mais provável causa de ocorrência de fetos grandes (síndrome large offspring; BLOISE, FEWER & RINAUDO 2014). Desse modo, sugere-se que em gestações de conceitos clonados por SCNT ocorra uma maior estimulação da expressão gênica de ISGs em PBMCs maternas, podendo ser causada por maior tamanho do trofotoderma do conceito. Acredita-se que tais alterações são resultado da manipulação e meio de cultura *in vitro*, capazes de induzir mudanças epigenéticas durante a reprogramação gênica com possíveis alterações em todos os tecidos dos embriões (DENOME & MANN, 2012).

Como descrito em experimentos anteriores, esperava-se a ocorrência de um único aumento da expressão de ISGs entre os dias 18 e 20 (PUGLIESI et al., 2014; KIZAKI et al., 2012; GREEN et al., 2010; MANJARI et al., 2016. GIFFORD et al., 2007; SOUMYA et al., 2016). Entretanto, notou-se a ocorrência de mais de um aumento durante os dias 15 e 31 em todos os grupos. Quando analisados os pulsos, não foram encontradas diferenças entre os valores de picos e nadires entre grupos, provavelmente devido ao pequeno número de indivíduos estudados em cada grupo. Com relação ao gene OAS1, notou-se que o primeiro pico no grupo SCNT ocorreu dois dias após os demais grupos, e todos os grupos exibiram o segundo pico no mesmo dia, sendo o declínio após o segundo pico mais marcante no grupo IA do que nos demais. O gene ISG15, por outro lado, apresentou um avanço de dois dias no pico para o grupo SCNT e o segundo pico ocorreu dois dias após no grupo IA. Não foi possível explicar a ocorrência de um segundo pico nos grupos e a variação do dia de ocorrência do pico no grupo SCNT para cada um dos genes. Entretanto, nota-se que a

expressão gênica dos ISGs nos grupos FIV e SCNT aparenta ser mais duradoura do que no IA podendo ser resultado da maior atividade do trofotoderma dos conceptos produzidos por essas duas técnicas (BLOISE, FEWER & RINAUDO 2014).

Devido à variação entre os resultados de cada gene estudado, foi feita a média geométrica (MG) entre os genes para fortalecer os achados do estímulo pelo IFNT em cada grupo. Nos animais gestantes, o pico de estímulo ocorreu no dia 20, concordando com achados em experimentos anteriores (PUGLIESI et al., 2014; KIZAKI et al., 2012; GREEN et al., 2010; MANJARI et al., 2016. GIFFORD et al., 2007; SOUMYA et al., 2016), e nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada. O grupo IA apresentou valores da MG menores que os demais grupos no dia 24, demonstrando uma antecipada queda no estímulo pelo IFNT no grupo IA e um estímulo mais duradouro nos demais grupos. Com relação à comparação entre os animais gestantes e não gestantes, todos os grupos apresentaram valores mais elevados nos animais gestantes a partir do dia 18, sendo mantido até o dia 20. Nos animais não gestantes a expressão de ambos os genes permaneceu mínima durante os dias 15 a 20. Desse modo, a média geométrica entre os genes suportou o achado de um estímulo mais prolongado nos grupos FIV e SCNT quando comparados com o IA, sendo que ambos os grupos iniciaram o estímulo a partir do dia 18 com valores máximos no dia 20. Sendo assim, sugere-se que a placenta de conceptos oriundos de clonagem e FIV sejam maiores do que conceptos originários de IA, resultando em maior estímulo à expressão de ISGs pelo IFNT. Tal achado pode explicar as anormalidades gestacionais encontradas em ambas as técnicas, como por exemplo a síndrome “large offspring” (DROST, 2007).

7.2. Estudo 2: “Alterações morfológicas e vasculares no útero e ovários, e estímulo da expressão de ISGs em PBMCs maternas, em fêmeas portando conceptos oriundos de clonagem e IA em bovinos”

O presente estudo descreveu ultrassonograficamente mudanças morfológicas e vasculares do útero e CL em animais gestando conceptos normais produzidos por IA e clonagem por SCNT e dois fenótipos aberrantes de conceptos clonados por SCNT. Além disso, foi avaliado o grau de expressão de ISGs em PBMCs maternas, a fim de detectar indiretamente a produção de IFNT por essas categorias de conceito. As categorias de desenvolvimento do conceito foram baseadas na manutenção da vascularização do CL por mais de 25 dias, detecção de estruturas do conceito e batimento cardíaco do embrião, conforme previamente descrito por Jardim (2016). Desse modo foram definidos os grupos de gestação normal controle (CTRL), gestação normal de clone (CNG), gestação anembrionada de clone (CAG) e CL persistente de clone (CPCL). Além disso, nos conceptos normais de clonagem por SCNT foi detectada a morte embrionária, pela ausência de batimentos cardíacos do embrião.

A hipótese de que o conceito clonado por SCNT apresenta um menor estímulo sobre mudanças morfológicas e vasculares do complexo útero-ovário e ISGs em PBMCs maternas durante os primeiros 35 dias de gestação, quando comparado com conceptos oriundos de IA — foi parcialmente suportada, sendo que gestações normais de conceptos clonados por SCNT apresentam um semelhante estímulo, embora esse tenha sido menor nos fenótipos aberrantes de conceptos que resultaram em gestação anembrionada e CL persistente. A mensuração da vascularização do CL foi eficiente em detectar a manutenção da funcionalidade luteal em todos os grupos, como descrito em trabalhos anteriores para animais gestantes (BOLLWEIN et al., 2013; PUGLIESI et al., 2014, LUTTGENAU & BOLLWEIN 2014). Sabe-se que em animais cíclicos, a regressão luteal ocorre em média no dia 17 pós-ovulação (GINTHER & BEG, 2012), sendo o prolongamento da função luteal um indicativo de bloqueio da luteólise pelo conceito ou de falha na secreção de $\text{PGF2}\alpha$. Após perda gestacional, foi relatado em estudos anteriores o prolongamento da função luteal (KASTELIC, NORTHEY & GINTHER, 1990), sendo que a perda da função luteal durante a gestação resultou na expulsão do conceito no momento em que o animal se aproxima do estro. No presente trabalho, foi notado um prolongamento da função luteal (>25 dias) em animais com gestações normais e em

animais com estruturas do conceito aparentemente sem funcionalidade, como no caso das gestações anembrionadas (CAG) e CL persistente (CPCL). Não há relato na literatura de ocorrência desses dois tipos de fenótipos aberrantes em gestações naturalmente concebidas, embora sejam possivelmente perdas gestacionais iniciais. Vale ser ressaltado que os diagnósticos de gestação são realizados em sistemas de produção comercial entre os dias 30 e 35 e sabe-se que em gestações de conceitos clonados as falhas no desenvolvimento são achados frequentes, sendo detectado morte fetal, má placentação, fetos grandes, hidropsia e má sinalização do parto (CHAVATTE-PALMER et al., 2012; CHEN et al., 2013; DROST, 2007; MERIGHE, 2007; HEYMAN et al., 2004; EVERTS et al., 2008; CAMPBELL et al., 2007). Desse modo, no presente estudo, os fenótipos aberrantes foram encontrados devido à frequência de escaneamentos (a cada 3 dias a partir do D15), assim como pela elevada incidência de anormalidades no desenvolvimento de conceitos clonados por SCNT.

Não apenas nos fenótipos aberrantes, mas também nas gestações normais de clone foram detectadas falhas no desenvolvimento do conceito, resultando em perdas gestacionais. Na comparação entre as perdas gestacionais precoces (< 35 dias) e tardias (> 35 dias), foi possível notar o prolongamento da função luteal em casos de perdas gestacionais mais tardias. Esse achado sugere que em estágios mais avançados o bloqueio da luteólise persiste, possivelmente pelo avanço de mudanças estruturais e moleculares causadas pelo conceito em contato com o endométrio, o que prolonga o bloqueio da secreção de PGF2 α . No caso dos fenótipos de gestação anembrionada e persistência do CL, a regressão luteal ocorreu no período semelhante às perdas gestacionais mais precoces (anteriores ao dia 35), sugerindo que o conceito clonado das prenhez normais e dos dois fenótipos aberrantes foram capazes de liberar IFNT e bloquear a liberação de PGF2 α pelo endométrio, mas não estabeleceu a placentação adequada que mantivesse o bloqueio. Essa teoria é suportada por estudo anterior em que IFNT recombinante bovino foi infundido no útero de vacas cíclicas do dia 14 e 24 e resultou no prolongamento da vida média do CL de 21 para 30 dias, e na duração do intervalo interovulatório de 23 para 32 dias (MEYER et al., 1995). No presente estudo, a sobrevivência luteal média nos grupos com perdas gestacionais precoces (< 35 dias), gestações anembrionadas e CL persistente foi de 40, 48 e 38 dias, respectivamente, demonstrando um prolongamento da função luteal ainda maior do que os achados de Meyer et al. (1995), sugerindo a presença de outros fatores além do IFNT no bloqueio da luteólise.

A área do CL nos grupos CAG e CPCL demonstraram uma perda estrutural do CL quando comparados com os CNG e CTRL, demonstrando que, embora tenha sido mantida a

funcionalidade do CL, o bloqueio foi parcial nesses dois grupos, sendo mais evidente no grupo CPCL. Infelizmente, dosagens plasmáticas de progesterona não foram realizadas neste estudo para a confirmação direta dessas mudanças na função luteal, sendo de grande importância para estudos futuros. Nota-se que no grupo CPCL ocorreu redução da área do CL a partir do dia 20, sugerindo uma perda parcial do bloqueio luteolítico. No grupo CAG, embora não seja notada uma perda significativa no bloqueio da luteólise, a partir do dia 23 os valores de área do CL apresentam-se intermediários entre animais gestantes e com persistência do CL, sugerindo que a funcionalidade apresentou-se levemente comprometida quando comparada com animais gestantes. Com relação ao fluxo sanguíneo do CL, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos, embora visualmente os grupos CAG e CPCL demonstrem uma queda a partir do dia 23, sendo essa ainda mais evidente no grupo CPCL. Na combinação de todos grupos, nota-se que o fluxo sanguíneo do CL aumentou até o dia 20 e manteve-se estável até o dia 35.

Foi reportado em estudo anterior o pico de produção de IFNT pelo conceito no dia 20 (ROBERTS et al., 1999), sendo temporalmente associado ao aumento do fluxo sanguíneo luteal no presente estudo, sugerindo a possibilidade de um estímulo do IFNT sobre a funcionalidade luteal, fato que aparentemente não ocorreu nos fenótipos de conceito aberrantes. Entretanto, estudos anteriores não detectaram aumento da vascularização luteal em animais gestantes durante o mesmo período gestacional (SILVA & Ginther, 2010; HERZOG et al., 2011), sendo relatado uma manutenção da função luteal. Além disso, devido à característica subjetiva da análise da vascularização luteal por ultrassonografia no modo Doppler colorido, a precisão da avaliação torna-se comprometida, sendo necessário testes mais detalhados e precisos sobre a funcionalidade do CL, como por exemplo análises moleculares de tecido luteal, para reforçar a hipótese do aumento da vascularização durante o período descrito.

Do mesmo modo que nas características luteais, o útero apresentou particularidades entre as gestações e fenótipos aberrantes de conceitos. No presente estudo foram abordadas as mudanças na vascularização (SILVA & Ginther, 2010) e grau de ecotextura endometrial (edema uterino), (SILVA & Ginther, 2010; PIERSON & GINTHER, 1987). Por esses dois métodos é possível caracterizar indiretamente o estímulo do conceito sobre o aumento da vascularização endometrial e a ação estrogênica no endométrio, respectivamente. No presente estudo, o grau de ecotextura foi maior nos fenótipos aberrantes, intermediário nas prenhez de clone e mais baixo nas prenhez por IA. Sabe-se que o bloqueio de pulsos luteolíticos de

PGF2 α é feito pelo IFNT (SPENCER et al., 2004), responsável por manter a função luteal e, consequentemente, a prenhez. Desse modo, como representado na abundância de transcritos para o gene ISG15, sugere-se que falha na liberação de IFNT pelos conceptos com fenótipos aberrantes tenha permitido a liberação de pulsos luteolíticos de PGF2 α , resultando na perda da função luteal, declínio da progesterona, estímulo ao crescimento folicular e atividade estrogênica, a qual foi detectada no aumento do grau de edema uterino. Entretanto, isso não ocorreu para os genes OAS1 ou média geométrica. Além disso, uma segunda hipótese poderia ser a possível resposta inflamatória ao conceito malformado, também resultando na liberação de PGF2 α . Embora em menor intensidade, as prenhez de clone exibiram um aparente aumento do edema uterino, sugerindo que a falha no bloqueio da luteólise e/ou resposta inflamatória ao conceito não se resume apenas aos fenótipos aberrantes, podendo ser um indicativo de sinais precoces das futuras perdas gestacionais.

Para um estudo local do estímulo do conceito à vascularização endometrial, o fluxo sanguíneo foi avaliado separadamente para cada corno uterino. A separação da análise por cornos foi justificada por estudo anterior, no qual foi descrito o aumento diferenciado na vascularização endometrial em cada corno durante o alongamento do conceito (SILVA & Ginther, 2010), sugerindo o estímulo ser decorrente do contato entre as membranas do conceito e o endométrio. Por essa abordagem, foi notada maior vascularização endometrial no corno ipsolateral ao CL nos grupos CTRL e CNG, mas não nos grupos de fenótipos aberrantes. Outra característica importante foi o dia em que ocorreu o primeiro aumento da vascularização endometrial em cada um dos cornos uterinos nos grupos CTRL e CNG. No grupo CTRL o aumento da vascularização endometrial foi mais tardio no corno contralateral ao CL, iniciando-se 12 dias após o corno ipsolateral. No grupo CNG, a vascularização endometrial aumentou em ambos os cornos a partir do dia 20, embora no corno contralateral ao CL o aumento tenha sido mais lento. No caso dos fenótipos aberrantes, o aumento da vascularização endometrial ocorreu a partir do dia 20 em ambos os cornos na mesma intensidade. Desse modo, sugere-se que ambas as gestações controle e de embriões clonados por SCNT apresentam um estímulo à vascularização endometrial temporalmente associada ao alongamento do conceito. Entretanto, nas gestações de embriões clonados por SCNT o aumento da vascularização endometrial do corno contralateral ao CL foi antecipada e em sincronia com o corno ipsolateral, sugerindo diferenças no alongamento do conceito clonado quando comparado com o conceito naturalmente produzido.

A diferença entre cornos com relação ao aumento da vascularização endometrial pode estar relacionada a diferenças no momento em que ocorreu o contato íntimo entre as estruturas do conceito e o endométrio. Silva & Ginther, (2010), utilizando animais com concepção natural, relataram um aumento de vascularização do corno uterino ipsolateral ao CL 12 dias antes do corno contralateral, semelhante ao obtido no presente estudo para o grupo CTRL. Entretanto, no grupo CNG tal característica não ocorreu, sendo o estímulo simultâneo em ambos os cornos. Uma possível explicação para a ocorrência dessas diferenças entre os grupos CTRL e CNG seria o método utilizado para a obtenção das gestações, sendo esses a inseminação artificial e transferência de embrião, respectivamente. Na transferência de embrião, o embrião é depositado no corno ipsolateral ao CL, o mais próximo da ponta do corno uterino ipsolateral ao CL. Entretanto, após o procedimento de TE o embrião fica susceptível a se instalar próximo a bifurcação entre os cornos ou, em alguns casos, até mesmo no corno contralateral ao CL (MCMILLAN & PETERSON 1999), podendo resultar no alongamento para os dois cornos uterinos em uma proporção bem similar. Pelo procedimento de IA o embrião chega ao útero pela junção útero-tubárica, ou seja, a partir da ponta do corno, sendo necessário o alongamento do conceito por grande parte do corno uterino ipsolateral ao CL antes de entrar em contato com o corno contralateral. Em gestações naturalmente concebidas a ocorrência de desenvolvimento do conceito no corno contralateral ao CL é um evento raro (GALVAN, VALENCIA, CONSTANTINO, 1982). Em uma breve descrição do desenvolvimento do conceito por trabalhos *in situ*, revisados por Assis-Neto et al., (2009), é descrito o aparecimento de células gigantes no trofoblasto do córion entre os dias 16 e 18 (dia 0 = estro) (GREENSTEIN et al., 1958), sendo esse o momento inicial para a preparação para a implantação. Do dia 18 a 19, ocorre a aposição entre microvilos do trofoblasto e epitélio endometrial, resultando em adesão no dia 21 (LEISER, 1975). No dia 27, ambos os cornos se apresentam em contato com o córion alongado, resultando em uma estrutura repleta de líquido no dia 30 (MELTON et al., 1951; ASSIS-NETO et al., 2009). Entre os dias 31 e 33 inicia-se a formação de vilos coriônicos (MELTON et al., 1951; GREENSTEIN et al., 1958), sendo possível a visualização dos placentônios a partir do dia 37. Seguindo essa cronologia de desenvolvimento, as mudanças detectadas na vascularização endometrial em gestações obtidas por IA apresentaram-se em sincronia com o descrito desenvolvimento fisiológico do conceito. Entretanto, nas gestações de embriões clonados por SCNT e nos dois fenótipos aberrantes, sugere-se que as diferenças no estímulo de aumento da vascularização endometrial estejam relacionadas a falhas em diferentes etapas do desenvolvimento do conceito.

Entretanto, estudos anatômicos mais detalhados, envolvendo análises moleculares da viabilidade tecidual do concepto, são necessários para testar essa hipótese.

Para estudar indiretamente a funcionalidade de tecidos do concepto, foi mensurada a abundância de transcritos para os genes estimulados pelo interferon tau (ISGs) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) maternas, a fim de mensurar a ação do IFNT produzido pelo concepto em células da mãe. Para isso foram escolhidos os genes OAS1 e ISG15, pelo fato de serem bastante expressos durante o período de produção de IFNT pelo concepto em prenhez naturalmente produzidas (PUGLIESI et al., 2014). Os resultados do gene OAS1 não mostrou diferença entre os grupos, sendo notado um aumento do dia 15 ao 20, seguido de uma diminuição, demonstrando que todos os grupos apresentaram um estímulo da expressão do gene OAS1. Entretanto, no dia 24, foi notado que os grupos CNG e CPCL mantiveram altos valores de expressão para o gene OAS1, enquanto que o CTRL apresentou níveis abaixo de todos os grupos, estando o CAG intermediário entre eles. Desse modo, concluiu-se que, para o gene OAS1, o IFNT é produzido por todos os grupos, sendo que nos grupos CNG e CPCL esse aumento aparentou ser mais prolongado.

Com relação ao gene ISG15, embora todos os grupos também apresentem um aumento na abundância de transcritos como no gene OAS1, o perfil foi diferente entre eles. Os grupos CNG e CAG apresentaram um aumento brusco na expressão de ISG15, sendo esse mais lento no CTRL e em menor amplitude no CPCL. Além disso, após o pico no dia 18, foi notada uma queda brusca no grupo CAG e lenta no CNG, sendo notada uma aparente ressurgência no CAG entre os dias 26 e 28. O grupo CTRL apresentou um perfil inesperado, demonstrado por um aumento lento até o dia 24, após o qual ocorreu uma queda transitória no dia 26 seguido de uma ressurgência a níveis elevados nos dias 28 e 31. O grupo CPCL demonstrou um aumento em menor intensidade até o dia 20, após o qual se iniciou uma queda, atingindo níveis aparentemente basais a partir do dia 26. O contraste entre os grupos demonstra que os grupos CNG e CTRL exibiram uma maior expressão de ISG15 durante o período estudado, sendo essa mais baixa no grupo CPCL e intermediária no grupo CAG. A inesperada ressurgência não foi associada com algum evento fisiológico do desenvolvimento do concepto nos grupos CTRL e CAG, sendo sugerido uma possível falha de técnica ou influência de infecção viral subclínica no momento descrito (LENSCHON et al., 2005; NAKAYA et al., 2001), sendo necessários novos estudos para comprovar o achado.

Para reforçar os achados a partir de duas variáveis, foi utilizada a média geométrica (MG) entre os genes OAS1 e ISG15. Não foram encontradas diferenças entre grupos com relação à MG, demonstrando que todos os grupos podem estar estimulando a expressão de ISGs na mesma intensidade. Quando todos os grupos foram combinados, foi notado um aumento do dia 15 ao 18, seguido de uma queda a partir do dia 24. Na comparação entre animais gestantes e fenótipos aberrantes com animais não gestantes, a MG foi maior somente nos animais gestantes, mas não nos fenótipos aberrantes. Esses resultados sugerem que, embora todos os grupos tenham apresentado um aumento na expressão de ISGs, ocorreu um atraso e/ou menor intensidade no estímulo de IFNT nos fenótipos aberrantes de conceito, quando comparado com animais gestantes. O atraso na liberação de IFNT aparenta ser a possível causa da falha no estabelecimento da prenhez nos fenótipos aberrantes. Entretanto, deve ser levado em conta que os fenótipos aberrantes podem representar falhas no desenvolvimento do conceito que ocorreram após o início da liberação de IFNT. Em trabalhos anteriores foi demonstrado a estimulação da expressão de ISGs em receptoras de embrião que prolongaram a função luteal (>24 dias) embora não tenham apresentado sinais da presença do conceito por ultrassonografia no dia 30 (MATSUYAMA et al., 2012). Desse modo, acredita-se que o prolongamento da função luteal em todos os grupos seja resultado da liberação de IFNT em algum momento durante o período de reconhecimento materno da gestação.

Portanto, o presente trabalho descreveu a relação entre útero, conceito e CL na presença de conceitos naturalmente produzidos e conceitos clonados por SCNT normais e com diferentes falhas no desenvolvimento. Em conceitos aparentemente normais, foram detectadas perdas gestacionais, as quais quando ocorreram mais tardiamente mantiveram a função luteal por mais tempo. Os fenótipos aberrantes de conceito, definidos como gestação anembrionada e CL persistente, demonstraram uma perda de funcionalidade luteal, representada pela queda estrutural e vascular, assim como menor grau de vascularização endometrial e expressão de ISGs, quando comparados com gestações normais. Como conclusão, o presente estudo demonstrou que o conceito é responsável por manter e/ou estimular a funcionalidade uterina e luteal, a fim de formar um ambiente propício para um adequado desenvolvimento, mediado aparentemente pelo principal fator no estabelecimento da prenhez, o IFNT.

7.3. Estudo 3: “Dinâmica esteroidogênica do plasma sanguíneo periférico durante o último mês de gestação em prenhez bovina naturalmente e artificialmente concebidas, elucidada por espectrometria de massas LC-MS/MS multi-hormonal de alta resolução”

O presente trabalho descreveu a validação analítica do método LC-MS/MS para a quantificação simultânea de 10 esteroides no plasma bovino. Esse método foi utilizado para estudar a dinâmica de corticosteroides e hormônios sexuais na proximidade do parto em gestações naturalmente concebidas ou em gestações derivadas de FIV e clonagem por SCNT. Uma característica importante do método foi que a instrumentação propiciou uma coleta rápida de múltiplos escaneamentos de íons para cada esteroide. A habilidade de extrair uma estreita janela de massa (m/z 0,025) para os fragmentos correspondentes geraram transições MRM_{HR} que poderiam ser utilizadas individualmente ou assumidas para a quantificação. A seleção de íons após a aquisição permitiu a escolha em utilizar a transição mais abundante e com menor ruído na transição para cada componente presente na amostra (ANDREWS et al., 2011). A alta resolução e escaneamento preciso de MS (determinação de energia de 30 000) também foram utilizados simultaneamente para a aquisição de toda a informação da amostra. A MRM_{HR} ofereceu a vantagem da otimização mínima do método e um alto alcance linear dinâmico para a quantificação de múltiplos componentes em diferentes concentrações.

O presente estudo determinou a concentração absoluta de hormônios esteroidogênicos no plasma de fêmeas bovinas gestantes, contendo hormônios sintetizados pela placenta, glândulas fetais adrenais, e adrenais e ovários maternos, assim como os efeitos do metabolismo desses esteroides. A figura 2 ilustra a cascata de síntese de esteroides, entretanto não foi possível mensurar certos esteroides na cascata metabólica como o colesterol, pregnenolona, 17 β -OH pregnenolona, DHEA, androstenediol, estriol e aldosterona, embora sejam mencionados na discussão.

Os resultados da utilização do método LC-MS/MS despertou o questionamento em sua utilização em fêmeas bovinas não gestantes, em particular para os resultados da avaliação de estradiol e progesterona, esteroides cruciais em estudos durante o ciclo estral. Em trabalhos anteriores utilizando a técnica de radioimunoensaio a variação na concentração de estradiol foi de 1 a 7 pg/mL (0,001 a 0,007 ng/mL) (GINTHER et al., 2013) e de progesterona de 0,1 a 10 ng/mL (SILVA & GINTHER, 2010) em fêmeas bovinas cíclicas. No presente trabalho, o valor de quantificação mínima tanto para estradiol quanto progesterona foi de 0,1 ng/mL.

Desse modo, a técnica de mensuração pelo método LC-MS/MS para estudos durante o ciclo estral mostra-se eficiente somente para a progesterona, mas não para o estradiol. No caso do estradiol, vacas cíclicas apresentam níveis 100 vezes a baixo do valor de quantificação mínima pela técnica LC-MS/MS. O sucesso da técnica no presente trabalho pode ser justificado pelo estado fisiológico dos animais estudados, os quais eram fêmeas bovinas prenhez e próximas ao parto. Durante esse estado fisiológico, a concentração sérica de estradiol apresenta-se bastante elevada por atividade da placenta, que além de produzir diretamente estrógeno (HOFFMAN & SCHULER 2002), também atua na conversão de andrógenos em estrógeno no momento em que o animal se aproxima do parto (ANDERSON, FLINT & TURNBULL 1975). Por outro lado, durante o ciclo estral a concentração sistêmica de estradiol provém majoritariamente de folículos ovarianos, resultando em níveis sistêmicos mais baixos.

Para as gestações derivadas de ART, os dados apresentados suportam a hipótese de que a concepção artificial altera a regulação esteroidogênica, resultando em níveis alterados de corticosteroides e esteroides sexuais em gestações artificialmente concebidas. As concentrações de corticosterona, 11-deoxicortisol e cortisol em animais gestantes de embriões oriundos de SCNT, FIV e naturalmente concebidos foram diferentes durante o fim da gestação. O perfil desses corticosteroides no grupo SCNT foi similar e diminuíram em 3,5 a 17,7 vezes no momento do parto quando comparado com os 30 dias anteriores. Nos grupos FIV e CTRL, os níveis de corticosteroides foram constantes durante todo o último mês de gestação. Esse resultado sugere que em gestações derivadas de SCNT ocorre uma upregulation da via dos corticosteroides 30 dias antes do parto, como resultado da hiperativação das enzimas P450_{C11} e P450_{C21}; sendo que em prenhez derivadas de FIV, ocorre uma baixa atividade da enzima P450_{C11} durante todo o último mês de gestação.

Os perfis dos esteroides sexuais também foram alterados nas gestações derivadas de ART quando comparado com gestações naturalmente concebidas, com exceção da testosterona. No grupo FIV, níveis elevados de estrona e estradiol foram detectados durante todo o último mês de gestação quando comparado com os grupos SCNT e CTRL. No grupo SCNT, ocorreu um aumento da estrona e androstenediona do dia -30 até o parto. Sendo assim, o grupo FIV demonstra claramente uma hiperativação da enzima aromatase. No grupo SCNT, entretanto, dois possíveis mecanismos podem ter resultado no aumento gradual da androstenediona e estrona: a hiperativação gradual da enzima P450_{C17} ou o aumento do suprimento pela via DHEA (não avaliado). Devido ao fato de bovinos serem menos

competentes na via $\Delta 4$, a 17α -OH- progesterona é um substrato pobre para a síntese de andrógeno e estrógeno nessa espécie (CONLEY et al., 1992; LUND et al., 1992). Mais além, devido ao fato da concentração de androstenediona, a qual é sintetizada pela enzima P45_{C17}, não ter se igualado com a 17α -OH-progesterona, o suprimento de androstenediona pela via DHEA (via 17α -OH-pregnenolona) aparenta ser a explicação mais plausível para o aumento de androstenediona. Além disso, o aumento de estrona no grupo SCNT aparenta ser consequência do aumento de androstenediona (substrato de estrona), pelo fato dos dois esteroides serem positivamente correlacionados no momento do parto e por ter sido observado um aumento paralelo na concentração de estradiol, o qual também é sintetizado pela aromatase.

A queda nos níveis de progesterona na proximidade do parto é considerada um dos eventos endócrinos mais importantes associados com o nascimento. Em todas as prenhez derivadas de ART e naturalmente concebidas, a progesterona diminuiu gradualmente durante o último mês de gestação até o termo, como esperado em partos naturais e induzidos por dexametasona na proximidade do termo (SHENAVAI et al., 2012; KINDAHL et al., 2002). A declínio da progesterona foi acompanhado pelo declínio da 17α -OH-progesterona, sugerindo que a progesterona foi metabolizada pela P450_{C17} em 17α -OH-progesterona na proximidade do termo (SHENAVAI et al., 2012; KINDAHL et al., 2002). Em prenhez derivadas de SCNT, foi previamente reportado que a razão entre formas ativas/inativas de estrógenos maternos era baixa durante o período pré-parto, sugerindo uma ativação da enzima sulfotransferase de estrógeno (HIRAYAMA et al., 2008). Entretanto, no presente estudo, não houveram diferenças na razão das formas ativas/inativas de estrógenos maternos (estrona/sulfato de estrona) entre os grupos CTRL, SCNT e FIV. A concentração de sulfato de estrona no grupo SCNT foi menor do que no grupo FIV 30 dias antes do parto e menor que no grupo CTRL a termo, o que indica uma disfunção placentária no grupo SCNT quando comparado com o FIV e CTRL. Semelhante aos nossos achados, em prenhez naturalmente concebidas, a concentração de sulfato de estrona é levemente menor 30 a 50 dias antes do parto do que nos últimos dias antecedentes ao nascimento, com um pequeno aumento no momento do parto (KORNMATITSUK et al., 2004). No presente estudo, não ocorreu um aumento gradual no sulfato de estrona nos grupos SCNT e FIV quando comparados com o CTRL, como descrito anteriormente (KORNMATITSUK et al., 2004). Um pequeno declínio no sulfato de estrona antes do parto está relacionado à ocorrência de natimortalidade (KORNMATITSUK et al., 2004), indicando um potencial uso do sulfato de estrona para

monitorar a vitalidade fetal em animais com alto risco de natimortalidade. A falha na preparação para o parto observada previamente em gestações de clones (MEIRELLES et al., 2010) juntamente com os presentes achados, sugere que prenhez derivadas de SCNT podem apresentar uma placenta menos funcional.

Hipóteses podem ser formuladas para explicar as diferenças observadas na dinâmica dos esteroides em prenhez derivadas de ART. Estudos anteriores em roedores (COLLIER et al., 2009, RAUNIG et al., 2011) revelaram um metabolismo alterado em prenhez derivadas de ART. Esses estudos propuseram que as anormalidades na circulação sistêmica de esteroides em prenhez concebidas por ART são resultado da alteração no fluxo de difusão/fluxo entre a mãe e feto (RAUNIG et al., 2011), assim como um aumento do clearance e metabolismo de esteroides pela placenta (COLLIER et al., 2009). Entretanto, bovinos e camundongos apresentam diferenças na estrutura e perfil de expressão gênica placentário (BARRETO et al., 2011), sendo essa sinepiteliocorial em ruminantes e hemocorial em roedores, impossibilitando a direta tradução de achados de uma espécie para a outra.

O mesmo protocolo foi utilizado para induzir o parto em todas as prenhez derivadas de SCNT e FIV para prevenir a perda ao nascimento por insuficiente maturidade fetal (MEIRELLES et al., 2010), assim como pela deficiência na sinalização do parto em prenhez derivadas de SCNT (HIRAYAMA et al., 2008). A dexametasona é utilizada para indução da maturidade fetal antes do parto, por aumentar a secreção de surfactante nos pulmões do feto (DEKRUIF & BENEDICTUS 1993). No presente estudo, a administração de dexametasona pode ter interferido na análise do perfil de esteroides. Em estudos anteriores foram reportados resultados conflitantes, os quais demonstram que a indução do parto com dexametasona aumenta a concentração do total de estrógeno (HARTMAN et al., 2013) ou o parto induzido por dexametasona e o natural apresentam uma similar expressão da aromatase e perfil de estrógeno plasmático no pré-parto (SHENAVAI et al., 2012). Entretanto, como achado mais importante, as concentrações mais elevadas de corticosteroides em prenhez derivadas de clone 30 dias antes do parto e altos níveis de estrógeno em prenhez derivadas de FIV durante todo o último mês de gestação não foram afetadas pela dexametasona, pois foram detectadas antes da administração de dexametasona.

Entre as diversas hipóteses que podem explicar nossos achados, mudanças epigenéticas causada pela manipulação de gametas e embriões durante a FIV e SCNT devem ser consideradas. É amplamente conhecido que as ARTs modificam marcas epigenéticas

(metilação do DNA, modificação de histonas e expressão aberrante de microRNA) em oócitos e embriões, resultando em fenótipos anormais (DENOME & MANN 2012). A epigenética providencia os mecanismos moleculares para a interação entre o gene e ambiente, o qual pode permanentemente alterar a expressão genica em células germinativas e embriões expostos (FEIL & FRAGA 2012). A metilação das células germinativas de linhagem feminina é estabelecida durante estágios finais do desenvolvimento oocitário (LUCIFERO et al., 2004). Desse modo, em ART, os oócitos são imaturos quando coletados e são artificialmente induzidos a desenvolver em um ambiente *in vitro* não natural. Durante o desenvolvimento inicial, os embriões são cultivados em um ambiente extremamente modificado no momento em que os genomas parentais estão passando por uma disseminada reprogramação epigenética, submetendo os oócitos e embriões manipulados a grandes chances de apresentar distúrbios epigenéticos (HAJJ & HAFF 2013).

Em prenhez derivadas de SCNT as desordens epigenéticas são exacerbadas devido ao fato de, em adição às condições *in vitro*, conceitos clonados acumulam efeitos de uma falsa reprogramação epigenética de um núcleo somático para um núcleo embrionário (SMITH et al., 2012; HOSSAIN et al., 2014; CHAVATTE-PALMER et al., 2012). Durante o período pré-parto, os corticosteroides circulantes se originam primariamente do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal do feto como resultado da atividade das enzimas P450_{C11} e P450_{C21}, enquanto que a principal fonte de estrógenos é pela atividade da aromatase em tecidos placentários. Desse modo, é tentador especular que essas enzimas ou fatores regulatórios de transcrição são epigeneticamente desregulados nas glândulas adrenais do feto e na placenta, respectivamente. Essa hipótese é plausível pelo fato das ART estarem claramente associadas com distúrbios epigenéticos disseminados nos tecidos fetais e placentários (HOSSAIN et al., 2014; CHAVATTE-PALMER et al., 2012) e por existirem vários indicadores que fatores epigenéticos controlam a esteroidogênese (FURBASS, SELIMYAN & VANSELOW 2008; DA SILVA et al., 2011; HOIVIK, BJANESØY & BAKKE 2013).

8. CONCLUSÃO GERAL

A sequência de três estudos forneceu achados inéditos durante as etapas iniciais e finais das gestações produzidas por reprodução assistida em bovinos, em especial na aplicação de clonagem por SCNT e fecundação *in vitro*. As principais conclusões obtidas estão descritas a seguir, para cada estudo.

Estudo 1

1. Os valores máximos de abundância de transcritos para o gene ISG15, independente do dia de ocorrência, foi mais elevado no grupo SCNT, intermediário no grupo FIV e menor no grupo IA. Esse achado sugere indiretamente uma maior estimulação da expressão de ISGs pelo IFNT em conceitos oriundos de ARTs, em especial os produzidos por clonagem por SCNT.
2. A média geométrica entre os valores de abundância de transcritos obtidos para os dois genes demonstrou que o estímulo à expressão de ISGs foi mais duradoura nos grupos FIV e SCNT, quando comparados com o grupo IA.

Estudo 2

1. Após a perda gestacional, a função luteal foi mantida por uma média de 18 dias, sendo essa manutenção mais prolongada em perdas de gestações mais avançadas do que 35 dias (28 versus 9 dias em média).
2. Fenótipos aberrantes de conceitos clonados por SCNT, como gestação anembrionada e CL persistente, são capazes de prolongar a função luteal por terem produzido IFNT, embora resultem futuramente em regressão luteal e expulsão do conceito anômalo.
3. A vascularização endometrial aumentou simultaneamente em ambos os cornos uterinos em gestações normais de conceitos clonados por SCNT. Em gestações produzidas por IA o aumento no corno contralateral ao CL ocorreu 12 dias após o ipsolateral.

-
4. Tanto as gestações normais de conceitos controle e clonados por SCNT quanto a de conceitos com fenótipos aberrantes apresentaram estímulo de ISGs em PBMCs maternas. Esse achado justifica o prolongamento da atividade luteal, conhecidamente mantida pelo bloqueio exercido pelo IFNT.

Estudo 3

1. Foi desenvolvido e validado o método de espectrometria de massas LC-MS/MS para a quantificação simultânea de 10 esteroides no plasma bovino.
2. A sensibilidade obtida para o método LC-MS/MS demonstrou-se eficiente para a mensuração da progesterona, mas não para o estradiol, na avaliação de esteroides durante o ciclo estral de fêmeas bovinas.
3. A concepção pelas técnicas de FIV e clonagem por SCNT altera a regulação esteroidogênica, possivelmente por causar alterações epigenéticas.
4. Gestações produzidas por SCNT apresentaram uma upregulation das vias dos corticosteroides 30 dias antes do parto, como resultado da hiperativação das enzimas P450_{C11} e P450_{C21}.
5. Gestações produzidas por FIV apresentaram uma downregulation da via dos esteroides sexuais durante todo o último mês de gestação, como resultado da baixa atividade da enzima P450_{C11}.

Como conclusão geral, gestações oriundas de ARTs como FIV e clonagem por SCNT apresentam anormalidade tanto no período inicial quanto final de gestação. Durante o período inicial, a expressão de ISGs em PBMCs maternas aparenta ser semelhante a gestações naturais, embora perdurem por 4 dias a mais, sugerindo uma estimulação de ISGs mais prolongada. Fenótipos anômalos de conceitos clonados por SCNT, como gestação anembrionada e CL persistente, apresentam um aumento na expressão de ISGs, sugerindo indiretamente a produção de IFNT, justificando o prolongamento da função luteal embora tenham sido detectados por ultrasonografia conceitos possivelmente afuncionais. Na

proximidade do parto, ambas as ARTs apresentam alteração na cascata esteroidogênica, representada por aumento de esteróides sexuais durante todo o último mês em gestações oriundas de FIV e aumento de corticosteróides um mês antes do parto em gestações oriundas de clonagem por SCNT.

9. REFERÊNCIAS

- AMOROSO, E.C. Placentation. In Marshall's Physiology of Reproduction., Logmans Green and Co, London, v. 2, e. 3, p. 127-311, 1952.
- ANDERSON, A.B.; FLINT, A.P.; TURNBULL, A.C. Mechanism of action of glucocorticoids in induction of ovine parturition: effect on placental steroid metabolism. *J Endocrinol*, v. 66, p. 61–70, 1975.
- ANDREWS, G.L.; SIMONS, B.L.; YOUNG, J.B.; HAWKRIDGE, A.M.; MUDDIMAN, D.C. Performance Characteristics of a New Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal Chem*, v. 83, p. 5442–5446, 2011.
- ASHWORTH, C.J.; BAZER, F.W. Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. *Biol Reprod*, v. 40, p. 425–433, 1989.
- ASSIS NETO, A.C.; PEREIRA, F.T.V.; SANTOS, T.C.; AMBROSIO, C.E.; LEISER, R.; MIGLINO, M.A. Morpho-physical Recording of Bovine Conceptus (*Bos indicus*) and Placenta from Days 20 to 70 of Pregnancy. *Reprod Dom Anim*, v. 45, p. 760–772, 2010.
- BARRETO, R.S.; BRESSAN, F.F.; OLIVEIRA, L.J.; PEREIRA, F.T.; PERECIN, F.; AMBRÓSIO, C.E.; MEIRELLES, F.V.; MIGLINO, M.A. Gene expression in placentation of farm animals: an overview of gene function during development. *Theriogenology*, v. 76, p. 589–597, 2011.
- BAZER, F. W.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A. Interferons and uterine receptivity. *Semin Reprod Med*, v. 27, p. 90–102, 2009.
- BAZER, F. W.; WU, G.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol Hum Reprod*, v. 16, p. 135–152, 2010.
- BAZER, F.W.; SONG, G.; THATCHER, W.W. Roles of conceptus secretory proteins in establishment and maintenance of pregnancy in ruminants. *Asian-Aust J Anim Sci*, v. 25, p. 1-16, 2012.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistic Soc*, v. 57, p. 289–300, 1995.
- BERTOLINI, M.; MASON, J.B.; BEAM, S.W.; CARNEIRO, G.F.; SWEEN, M.L.; KOMINEK, D.J.; MOYER, A.L.; FAMULA, T.R.; SAINZ, R.D.; ANDERSON, G.B. Morphology and morphometry of in vivo- and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology*, v. 58, p. 973-994, 2002.
- BETTERIDGE, K.J.; EAGLESOME, M.D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P.F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *J Anat*, v. 135, p. 191-209, 1982.

BETTERIDGE, K.J.; FLÉCHON, J.E. The anatomy and physiology of pre-attachment bovine embryos. *Theriogenology*, v. 29, p. 155-187, 1988.

BLOISE, E.; FEUER, S.K.; RINAUDO, P. F. Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human reproductive medicine and animal breeding. *Hum Reprod Up*, v.20, p. 822–839, 2014.

BOLLWEIN, H.; LUTTGEMAU, J.; HERZOG, K. Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. *Reprod Fertil Devel*, v. 25; p. 71–79, 2013.

BOTT, R.C.; ASHLEY, R.L.; HENKES, L.E.; ANTONIAZZI, A.Q.; BRUEMMER, J.E.; NISWENDER, G.D.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; SMIRNOVA, N.P.; ANTHONY, R.V.; HANSEN, T.R. Uterine Vein Infusion of Interferon Tau (IFNT) Extends Luteal Life Span in Ewes. *Biol Reprod*, v. 82, p. 725–735, 2010.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*, v. 27, p. 147–158, 1982.

BRESSAN, F.F. Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – USP, Brasil. 2013a.

BRESSAN, F.F.; MIRANDA M.S.; BAJGELMAN M.C.; PERECIN F.; MESQUITA L.G.; FANTINATO-NETO P.; MERIGHE G.F.K.; STRAUSS B.E.; MEIRELLES F.V. Effects of long-term *in vitro* culturing of transgenic bovine donor fibroblasts on cell viability and *in vitro* developmental potential after nuclear transfer. *In Vitro Cell Dev Biol*, v. 49, p. 250–259, 2013b.

BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E.; CHARNOCK-JONES, D.S. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. *Placenta*, v. 28 Suppl, p. 64-69, 2007.

CAMPBELL, K.H.S.; FISHER, P.; CHEN, W.C.; CHOI, I.; KELLY, R.D.W; LEE, J.H.; XHU, J. Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology*, v. 68, p. 214–231, 2007.

CHALLIS, J.; SLOBODA, D.; MATTHEWS, S.; HOLLOWAY, A.; ALFAIDY, N.; HOWE, D.; FRASER, M.; NEWNHAM, J. Fetal hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) development and activation as a determinant of the timing of birth, and of postnatal disease. *Endocrinol Res*, v. 26, p. 489-504, 2000.

CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta*, v. 25, p. 103-113, 2004.

CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; MONGET, P.; LEBOURHIS, D.; KANN, G.; CHILLIARD, Y.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 1596–1603, 2002.

CHAVATTE-PALMER, P.; CAMOUS, S.; JAMMES, H.; LE CLEAC'H, N.; GUILLOMOT, M.; LEE, R.S.F. P. Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta*, Suppl. 33, p. 99-104, 2012.

CHEN, W.Y.; WENG, J.H.; HUANG, C.C.; CHUNG, B.C. Histone deacetylase inhibitors reduce steroidogenesis through SCF-mediated ubiquitination and degradation of steroidogenic factor 1 (NR5A1). *Mol Cell Biol*, v. 27, p. 7284–7290, 2007.

CHEN, Z.; ROBBINS, K.M.; WELLS, K.D.; RIVERA, R.M. Large offspring syndrome: A bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. *Epigenetics*, v. 8, p. 591–601, 2013.

COLLIER, A.C.; MIYAGI, S.J.; YAMAUCHI, Y.; WARD, M.A. Assisted reproduction technologies impair placental steroid metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 116, p. 21–28, 2009.

CONLEY, A.J.; MASON, J.I. Placental steroid hormones. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, v. 4, p. 249–272, 1990.

CONLEY, A.J.; HEAD, J.R.; STIRLING, D.T.; MASON, J.I. Expression of steroidogenic enzymes in the bovine placenta and fetal adrenal glands throughout gestation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v. 130, p. 264–2650, 1992.

CONLEY, A.J.; PATTISON, J.C.; BIRD, I.M. Variations in adrenal androgen production among (nonhuman) primates. *Semin Reprod Med*, v. 22, p. 311–326, 2004.

CONOVER, C.B. Practical nonparametric statistics. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, e. 3, 1999.

CONSTANT, F.; GUILLOMOT, M.; HEYMAN, Y.; VIGNON, X.; LAIGRE, P.; SERVELY, J.L.; RENARD, J.P.; CHAVATTE-PALMER, P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biology of Reproduction*, v. 75, p. 122–130, 2006.

DA SILVA, A.M.; DE FREITAS, M.A.; RIOS, A.F.; RENZI, A.; LÔBO, R.B.; GALERANI, M.A.; VILA, R.A.; RAMOS, E.S. Identification of a DNA methylation point in the promoter region of the bovine CYP21 gene. *Genet Mol Res*, v. 10, p.1409–1415, 2011.

DEKRUIF, A.; BENEDICTUS, G. Perinatal mortality and the birth of weak calves. *Tijdschr Diergeneeskde*, v. 118, p. 684–688, 1993.

DENOMME, M.M.; MANN, M.R. Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during ARTs. *Reproduction*, v. 144, p. 393–409, 2012.

DICZFALUSY, E. Endocrine functions of the human fetoplacental unit. *Fed Proc*, v. 23, p. 791–798, 1964.

DROST, M. Complications during gestation in the cow. *Theriogenology*, v. 68, p. 487–491, 2007.

EDWARDS J.L.; SCHRICK F.N.; MCCracken M.D.; VAN AMSTEL S.R.; HOPKINS F.M.; WELBORN M.G.; DAVIES C.J. Cloning adult farm animals: a review of the possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *AJRI*, v. 50, p. 113–123, 2003.

EVERTS, R.E.; CHAVATTE-PALMER, P.; RAZZAK, A.; HUE, I.; GREEN, C.A.; OLIVEIRA, R.; VIGNON, X.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; TIAN, X.C.; YANG, X.; RENARD, J.P.; LEWIN, H.A. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiol Genom*, v. 33, p. 65–77, 2008.

FARIN, C.E.; IMAKAWA, K.; ROBERTS, R.M. In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Mol Endocrinol*, v. 3, p. 1099–1107, 1989.

FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A.; FARIN, C.E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos *Theriogenology*, v. 65, p. 178–191, 2006.

FEIL, R.; FRAGA, M.F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet*, v. 13, p. 97–109, 2012.

FEVOLD, H.R.; LORENCE, M.C.; MACCARTHY, J.L.; TRANT, J.M.; KAGIMOTO, M.; WATERMAN, M.R.; MASON, J.I. Rat P450 (17 alpha) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions. *Mol Endocrinol*, v. 3, p. 968–975, 1989.

FÜRBASS, R.; SELIMYAN, R.; VANSELOW, J. DNA methylation and chromatin accessibility of the proximal Cyp 19 promoter region 1.5/2 correlate with expression levels in sheep placentomes. *Mol Reprod Dev*, v. 75, p. 1–7, 2008.

GALVAN, A.; VALENCIA, .I; CONSTANTINO, D.L. Observations on genital organs of beef cows slaughtered at an abattoir. *Veterinaria Mexico*, v. 13, p. 7–12, 1982.-

GIFFORD, C.A.; RACICOT, K.; CLARK, D.S.; AUSTIN, K.J.; HANSEN, T.R.; LUCY, M.C.; DAVIES, C.J.; OTT, T.L. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *J Dairy Sci*, v. 90, p. 274–280, 2007.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: book 4, color-Doppler ultrasonography, Equiservices Publishing, 2007.

GINTHER, O.J.; SILVA, L.A.; ARAUJO, R.R.; BEG, M.A. Temporal Associations among Pulses of 13,14-Dihydro-15-keto-PGF2alpha, Luteal Blood Flow, and Luteolysis in Cattle. *Biol Reprod*, v. 76, p. 506–513, 2007.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A. The hour of transition into luteolysis in horses and cattle: A species comparison *Theriogenology*, v. 77, p. 1731–1740, 2012.

GREEN, J.C.; OKAMURA, C.S.; POOCK, S.E.; LUCY, M.C. Measurement of interferon tau (IFN-tau) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, v. 121, p. 24–33, 2010a.

GREEN, J.C.; OKAMURA, C.S.; MATHEW, D.J.; NEWSOM, E.M.; LUCY, M.C. Hot topic: successful fixed-time insemination within 21 d after first insemination by combining chemical pregnancy diagnosis on d 18 with a rapid resynchronization program. *J Dairy Sci*, v. 93, p. 5668–5672, 2010b.

GREENSTEIN, J.S.; MURRAY, R.W.; FOLEY, R.C. Observations on the morphogenesis and histochemistry of the bovine pre-attachment placenta between 16 and 33 days of gestation. *Anatomical Rec*, v. 132, p. 321–341, 1958.

GYOMOREY, S.; GUPTA, S.; LYE, S.J.; GIBB, W.; LABRIE, F.; CHALLIS, J.R. Temporal expression of prostaglandin H synthase type 2 (PGHS-2) and P450(c17) in ovine placentomes with the natural onset of labour. *Placenta*, v. 21, p. 478–486, 2000.

HAJJ, N.; HAAF, T. Epigenetic disturbances in *in vitro* cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril*, v. 99, p. 632–641, 2013.

HAN, H.; AUSTIN, K.J.; REMPEL, L.A.; HANSEN, T.R. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *J Endocrinol*, v. 191, p. 505–512, 2006.

HANSEN, T.R.; AUSTIN, K.J.; PERRY, D.J.; PRU, J.K.; TEIXEIRA, M.G.; JOHNSON, G.A. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*, v. 54, p. 329–339, 1999.

HANSEN, T. R.; HENKES, L.K.; ASHLEY, R.L.; BOTT, R.C.; ANTONIAZZI, A.Q.; HAN, H. Endocrine actions of interferon tau in ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v. 67, p. 325–340, 2010.

HARTMANN, D.; HONNENSA, Ä.; PIECHOTTAA, M.; LÜTTGENAU, J.; NIEMANN, H.; RATH, D.; BOLLWEIN, H. Effects of a protracted induction of parturition on the incidence of retained placenta and assessment of uterine artery blood flow as a measure of placental maturation in cattle. *Theriogenology*, v. 80, p.176–184, 2013.

HASHIZUME, K.; ISHIWATA, H.; KIZAKI, K.; YAMADA, O.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; PATEL, O.V.; AKAGI, S.; SHIMIZU, M.; TAKAHASHI, S. et al. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. *Cloning and Stem Cells*, v.4, p. 197–209, 2002.

HERNANDEZ-LEDEZMA, J.J.; SIKES, J.D.; MURPHY, C.N.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A.; ROBERTS, R.M. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by *in vitro* techniques. *Biol Reprod*, v. 47, p. 374–380, 1992.

HERZOG, K.; VOSSA, C.; KASTELIC, J.P.; BEINDORFF, N.; PAUL, V.; NIEMANN, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v. 75, p. 549–554, 2011.

HEYMAN, Y.; CHVATTE-PALMER, P.; LEBOURTHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*, v. 66, p. 6–13, 2002.

HEYMAN, Y.; RICHARD, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LAZZARI, G.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIGNON, X.; GALLI, C. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: Preliminary results. *Cloning and Stem Cells*, v. 6, p. 111–120, 2004.

HILL, J.R.; ROUSSEL, A.J.; CIBELLI, J.B.; EDWARDS, J.F.; HOOPER, N.L.; MILLER, M.W.; THOMPSON, J.A.; LOONEY, C.R.; WESTHUSIN, M.E.; ROBL, J.M. et al. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*, v. 51, p. 1451–1465, 1999.

HILL, J.R.; BURGHARDT, R.C.; JONES, K.; LONG, C.R.; LOONEY, C.R.; SHIN, T.; SPENCER, T.E.; THOMPSON, J.A.; WINGER, Q.A.; WESTHUSIN, M.E. Evidence for Placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*, v. 63, p.1787–1794, 2000.

HILL, J.R.; CHAVATTE-PALMER, P. Pregnancy and neonatal care of cloned animals. In “Principles of Cloning”. Academic Press: New York, p. 247–266, 2002.

HIRAYAMA, H.; SAWAI, K.; MORIYASU, S.; HIRAYAMA, M.; GOTO, Y.; KANEKO, E.; MIYAMOTO, A.; USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; MINAMIHASHI, A. Excess estrogen sulfoconjugation as the possible cause for a poor sign of parturition in pregnant cows carrying somatic cell clone fetuses. *Reproduction*, v. 136, p. 639–647, 2008.

HOFFMAN, B.; WAGNER, W.C.; HIXON, J.E.; BAHR, J. Observations concerning the functional status of the corpus luteum and the placenta around parturition in the cow. *Animal Reproduction Science*, v. 2, p. 253–266, 1979.

HOFFMANN, B.; FALTER, K.; VIELEMEIER, A.; FAILING, K.; SCHULER, G. Investigations on the activity of bovine placental oestrogen sulfotransferase and -sulfatase from midgestation to parturition. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v. 109, p. 294–301, 2001.

HOFFMANN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta.; a source and target of steroid hormones: Observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol*, v. 23, p. 309–320, 2002.

HOIVIK, E.A.; BJANESØY, T.E.; BAKKE, M. Epigenetic regulation of the gene encoding steroidogenic factor-1. *Mol Cell Endocrinol*, v. 22, p. 133–139, 2013.

HOSSAIN, M.M.; , TESFAYE, D.; SALILEW-WONDIM, D.; HELD, E.; PRÖLL, M.J.; RINGS, F.; KIRFEL, G.; LOOFT, C.; THOLEN, E.; UDDIN, J.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Massive deregulation of miRNAs from nuclear reprogramming errors during trophoblast differentiation for placentogenesis in cloned pregnancy. *BMC Genomics*, v. 15, p. 43, 2014.

HUNTER, J.T.; FAIRCLOUGH, R.J; PETERSON, A.J.; WELCH, R.A. Foetal and maternal hormonal changes preceding normal bovine parturition. *Acta Endocrinologica*, v. 84, p. 653–662, 1977.

IZABELLE, B.J. Eficiência de um programa de clonagem bovina por SCNT e diferentes tipos de apresentações gestacionais. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo – USP, Brasil. 2016.

JENKIN, G.; YOUNG, I. R. Mechanisms responsible for parturition; the use of experimental models. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82–83, p. 567–581, 2004.

JIEMTAWEEBOON, S.; SHIRASUNA, K.; NITTA, A.; KOBAYASHI, A.; SCHUBERTH, H.J.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow. *Reprod Biol Endocrinol*, v. 9, p. 79, 2011.

KASTELIC, J.P.; NORTHEY, D.L.; GINTHER, O.J. Spontaneous embryonic death on days 20 to 40 in heifers. *Theriogenology*, v. 35, p. 351–363, 1991.

KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M.; CHARNOCK-JONES, D.S. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta*, v. 25, p. 114–126, 2004.

KINDAHL, H.; KORNMATITSUK, B.; KÖNIGSSON, K.; GUSTAFSSON, H. Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. *Domest Anim Endocrinol*, v. 23, p. 321–328, 2002.

KING, G.J.; ATKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Development of the bovine placentome during the second month of gestation. *J Reprod Fertil*, v. 55, p. 173–180, 1979.

KING, G.J.; ATKINSON, B.A.; ROBERTSON, H.A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. *J Reprod Fertil*, v. 31(Suppl), p. 17–30, 1982.

KIZAKI, K.; SHICHIJO-KIZAKI, A.; FURUSAWA, T.; TAKAHASHI, T.; HOSOE, M.; HASHIZUME, K. Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. *Rep Biol Endocrinol*, p. 11–6, 2013.

KORNMATITSUK, B.; DAHL, E.; ROPSTAD, E.; BECKERS, J.F.; GUSTAFSSON, H.; KINDAHL, H. Endocrine profiles, haematology and pregnancy outcomes of late pregnant Holstein dairy heifers sired by bulls giving a high or low incidence of stillbirth. *Acta Vet Scand*, v. 45, p. 47–68, 2004.

LEISER, R. Development of contact between trophoblast and uterine epithelium during the early stages of implantation in the cow. *Anat Histol Embryol*, v. 4, p. 63–86, 1975.

LENSCHOW, D.J.; GIANNAKOPOULOS, N.V.; GUNN, L.J.; JOHNSTON, C.; O'GUIN, A. K.; SCHMIDT, R. E.; LEVINE, B.; VIRGIN IV, H.W. Identification of Interferon-Stimulated Gene 15 as an Antiviral Molecule during Sindbis Virus Infection In Vivo. *J Virol*, p. 13974–13983, 2005.

LUCIFERO, D.; MANN, M.R.; BARTOLOMEI, M.S.; TRASLER, J.M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet*, v. 13, p. 839–849, 2004.

LUND, J.; FAUCHER, D.J.; FORD, S.P.; PORTER, J.C.; WATERMAN, M.R.; MASON, J.I. Developmental expression of bovine adrenocortical steroid hydroxylases regulation of P-450(17 alpha) expression leads to episodic fetal cortisol production. *J Biol Chem*, v. 263, p. 16195–16201, 1988.

LÜTTGENAU, J.; BOLLWEIN, H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography. *Repr Biol*, v. 14, p. 103–109, 2014.

MANJARI, P.; REDDI, S.; ALHUSSIEN, M.; MOHAMMED, S.; DE, S.; MOHANTY, A.K.; SIVALINGAM, J.; KUMAR DANG, A. Neutrophil gene dynamics and plasma cytokine levels in dairy cattle during peri-implantation period. *Vet Immunol Immunop*, v. 173, p. 44–49, 2016.

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.

MASON, J.I.; FRANCE, J.T.; MAGNESS, R.R.; MURRY, B.A.; ROSENFELD, C.R. Ovine placental steroid 17 α -hydroxylase/C-17,20-lyase, aromatase and sulphatase in dexamethasone-induced and natural parturition. *J Endocrinol*, v. 122, p. 351–359, 1989.

MATSUYAMA, S.; KOJIMA, T.; KATO, S.; KIMURA, K. Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET. *Reprod Biol Endocrinol*, v. 10, p. 21, 2012.

MAYHEW, T.M.; CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta*, v. 25, p. 127–139, 2004.

MCMILLAN, W.H.; PETERSON, A.J. Transuterine embryo migration in recipient cattle. *Theriogenology*, v. 51, p. 1577–1586, 1999.

MEIRELLES, F.V.; BIRGEL JR., E.; PERECIN, F.; BERTOLINO, M.; TRALDI, A.S.; PIMENTEL, J.R.; KOMNIOU, E.R.; SANGALLI, J.R.; FANTINATO NETO, P.; NUNES, M.R.; POGLIANI, F.C.; MEIRELLES, F.D.P.; KUBRUSLYC, F.S.; VANNUCCHI, C.I.; SILVA, L.C.G. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, p. 88–97, 2010.

MELTON, A.A.; BERRY, R.O.; BUTLER, O.D. The interval between the time of ovulation and attachment of the bovine embryo. *J Anim Sci*, v. 10, p. 993–1005, 1951.

MERIGHE, G.K.F. Passagem celular, sexo e transcrição X-específica interferem no desenvolvimento embrionário e fetal de bovinos produzidos por transferência nuclear. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, Brasil. 2007.

MESIANO, S.; JAFFE, R.B. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*, v. 18, p. 378–403, 1997.

MEYER, M.D.; HANSEN, P.J.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R.M.; LI, J.; OTT, T.L.; BAZER, F.W. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin f2a of cows in response to recombinant interferon-T. *J Dairy Sci*, v. 78, p. 1921–1931, 1995.

NAKAYA, T.; SATO, M.; HATA, N.; ASAGIRI, M.; SUEMORI, H.; NOGUCHI, S.; TANAKA, N.; TANIGUCHI, T. Gene Induction Pathways Mediated by Distinct IRFs during Viral Infection. *Bioch Biophys Res Com*, v. 283, p. 1150–1156, 2001.

PACE, M.M.; AUGENSTEIN, M.L.; BETTHAUSER, J.M.; CHILDS, L.A.; EILERTSEN, K.J.; ENOS, J.M.; FORSBERG, E.J.; GOLUEKE, P.J.; GRABER, D.F.; KEMPER, J.C.; KOPPANG, R.W.; LANGE, G.; LESMEISTER, T.L.; MALLON, K.S.; MELL, G.D.; MISICA, P.M.; PFISTER-GENSKOW, M.; STRELCHENKO, N.S.; VOELKER, G.R.; WATT, S.R.; BISHOP, M.D. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod*, v. 67, p.334–339, 2002.

PASHEN, R.L.; ALLEN, W.R. The role of the fetal gonads and placenta in steroid production, maintenance of pregnancy and parturition in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*, v. 27, p. 499–509, 1979.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonographic appearance of the bovine uterus during the estrous cycle. *J Am Vet Med Assoc*, v. 190, p. 995–1001, 1987.

POWELL, A.M.; TALBOT, N.C.; WELLS, K.D.; KERR, D.E.; PURSEL, V.G.; WALL, R.J. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 210–216, 2004.

PUGLIESI, G.; MIAGAWA, B.T.; PAIVA, Y.N.; FRANÇA, M.R.; SILVA, L.A.; BINELLI, M. Conceptus-Induced Changes in the Gene Expression of Blood Immune Cells and the Ultrasound-Accessed Luteal Function in Beef Cattle: How Early Can We Detect Pregnancy? *Biol Reprod*, v. 91, p. 1–12, 2014.

RAUNIG, J.M.; YAMAUCHI, Y.; WARD, M.A.; COLLIER, A.C. Assisted reproduction technologies alter steroid delivery to the mouse fetus during pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 126, p. 26–34, 2011.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; VONNAHME, K.A.; JOHNSON, M.L.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A.; CATON, J.S. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J Physiol*, v. 565, p. 43–58, 2005.

REYNOLDS, L.P.; FERREL, C.L.; ROBERTSON, D.A.; FORD, S.P. Metabolism of the gravid uterus, foetus and uteroplacenta at several stages of gestation in cows. *J Agric Sci*, v. 106, p. 437–444, 1986.

REYNOLDS, L.P.; CATON, J.S.; REDMER, D.A.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; VONNAHME, K.A.; BOROWICZ, P.P.; LUTHER, J.C.; WALLACE, J.M.; WU, G.; SPENCER, T.E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J Physiol*, v. 572, p. 51–58, 2006.

ROBERTS, R.M.; EALY, A.D.; ALEXENKO, A.P.; HAN, C.S.; EZASHI, T. Trophoblast interferons. *Placenta*, v. 20, p. 259–264, 1999.

SANGALLI, J.R.; DE BEM, T.H.C.; PERECIN, F.; CHIARATTI, M.R.; OLIVEIRA, L.J.; ARAÚJO, R.R.; PIMENTEL, J.R.V.; SMITH, L.C.; MEIRELLES, F.V. Treatment of nuclear-donor cell or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cell Reprogram*, v. 14, p. 235–247, 2012.

SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci*, v. 60–61, p. 145–160, 2000.

SCHULER, G.; HARTUNG, F.; HOFFMANN, B. Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. *Exp Clin Endocrinol*, v. 102, p. 169–74, 1994.

SCHULER, G.; OZALP, G.R.; HOFFMANN, B.; HARADA, N.; BROWNE, P.; CONLEY, A.J. Reciprocal expression of 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase and aromatase cytochrome P450 during bovine trophoblast differentiation: a two-cell system drives placental oestrogen synthesis. *Reproduction*, v. 131, p. 669–679, 2006.

SHENAVAI, S.; PREISSING, S.; HOFFMANN, B.; DILLY, M.; PFARRER, C.; ÖZALP, G.R.; CALISKAN, C.; SEYREK INTAS, K.; SCHULER, G. Investigations into the mechanisms controlling parturition in cattle. *Reproduction*, v. 144, p.: 279–292, 2012.

SHIRASUNA, K.; MATSUMOTO, H.; KOBAYASHI, E.; NITTA, A.; HANEDA, S.; MATSUI, M.; KAWASHIMA, C.; KIDA, K.; SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Upregulation of interferon-stimulated genes and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. *J Reprod Dev*, v. 58, p. 84–90, 2012.

SILVA, L.A.; GINTHER, O.J. Local effect of the conceptus on uterine vascular perfusion during early pregnancy in heifers. *Reproduction*, v. 139, p. :453–463, 2010.

SMITH, L.C.; SUZUKI, J.R. J.; GOFF, A.H.; FILION, F.; THERRIEN, J.; MURPHY, B.D.; KOHAN-GHADR, H.R.; LEFEBVRE, R.; BRISVILLE, A.C.; BUCZINSKI, S.; FECTEAU, G.; PERECIN, F.; AND MEIRELLES, F.V. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod Dom Anim*, v. 47 (Suppl.), p. 107–114, 2012.

SOUMYA, N.P.; DAS, D.N.; JEYAKUMAR, S.; MONDAL, S.; MOR, A.; MUNDHE, U.T. Differential expression of ISG 15 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of nulliparous and multiparous pregnant versus non-pregnant *Bos indicus* cattle. *Reprod Dom Anim*, p. 1–10 2016.

SPENCER, T.E.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy *Anim Reprod Sci*, v. 82–83, p.537–550, 2004.

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

TAKENOUCHI, N.; OSHIMA, K.; SHIMADA, K.; TAKAHASHI, M. The development of a sensitive enzyme immunoassay for the determination of estrone and estradiol-17 β in bovine blood plasma based on the same homologous combination with antiserum and steroid-enzyme conjugate. *J Vet Med Sci*, v. 66, p. 1315–1321, 2004.

TORRY, D.S.; LEAVENWORTH, J.; CHANG, M.; MAHESHWARI, V.; GROESCH, K.; BALL, E.R.; TORRY, R.J. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet*, v. 24, p. 303–315, 2007.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of in vitro Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, p. 661–674, 2010.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Animal Reproduction*, v. 9, p. 12–18, 2012.

VIGNON, X.; CHESNE, P.; LE BOURHIS, D.; FLECHON, J.E.; HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences – Series III*, v. 321, p. 735–745, 1998.

WITTLE, W.L.; HOLLOWAY, A.C.; LYE, S.J.; GIBB, W.; CHALLIS, J.R. Prostaglandin production at the onset of ovine parturition is regulated by both oestrogen-independent and oestrogen-dependent pathways. *Endocrinology*, v. 141, p. 3783–3791, 2000.

YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews of Reproduction*, v. 3, p. 155–163, 1998.

ZYGMUNT, M.; HERR, F.; MÜNSTEDT, K.; LANG, U.; LIANG, O.D. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v. 110, p. 10–18, 2003.

10. APÊNDICE

Reprodução autorizada pela Endocrine Society, protocolo número 4018821323809.

Fonte: Endocrinology 155, 5011–23 (2014). DOI: 10.1210/en.2013-2166

Artigo: “Plasma Steroid Dynamics in Late- and Near-term Naturally and Artificially Conceived Bovine Pregnancies as Elucidated by Multihormone High-resolution LC-MS/MS”

Martins-Junior HA, Pinaffi FLV, SImas RC, Tarouco AK, Ferreira CR, Silva LA, Nogueira GP, Meirelles FV, Eberlin MN, Perecin F.

Abstract

The plasma levels of corticosteroids and sex steroids during pregnancy are key indicators of mammalian placental function and the onset of parturition. Steroid hormones are believed to be disturbed in pregnancies produced using assisted reproductive technologies (ARTs) due to placental dysfunction and the frequently observed lack of parturition signals. To elucidate the plasma steroid dynamics, a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed and used to determine the levels of corticosteroids (corticosterone, 11-deoxycortisol, and cortisol) and their direct precursors (progesterone and 17-OH-progesterone) as well as sex steroids (androstenedione, estrone, estrone sulfate, testosterone, and 17-estradiol) in bovine plasma. The levels of these 10 steroids in recipient cows carrying naturally conceived (control), in vitro fertilized (IVF), or cloned (somatic cell nuclear transfer) conceptuses were compared during late-term pregnancy (30 days before parturition), during nearterm pregnancy (1 day before parturition), and on the day of parturition (day 0).

Significant differences were observed among the corticosteroid levels: higher levels of corticosterone, 11-deoxycortisol, and cortisol were detected in cloned pregnancies at day 30; lower levels of corticosterone were observed in ART-derived pregnancies at days 1 and 0; and estrone and estradiol levels were higher in IVF pregnancies throughout the final development. These results suggested an upregulation of the P450C11 and P450C21 enzymes 30 days before parturition in somatic cell nuclear transfer pregnancies and an overactivation of the aromatase enzyme in IVF pregnancies. Taken together, the monitoring of multiple steroid hormones revealed that the pregnancies obtained using ART exhibited plasma steroid concentration dynamics compatible with the dysregulation of steroidogenic tissues.

Introduction

Endocrinological changes that occur throughout pregnancy are necessary for pregnancy maintenance and successful delivery. Several outcomes of assisted reproductive technologies (ARTs), such as prolonged gestation and poor parturition signaling, support the hypothesis that altered steroid dynamics in ART-derived pregnancies may be related to unfavorable outcomes. The endocrine status during bovine pregnancy and parturition has been previously described (1–5), but the dynamics of and the relationships between the various hormones in the steroidogenic cascade during the final stages of pregnancy and at parturition are not completely understood. Moreover, it is unknown whether and to what extent steroid dynamics are impaired by ARTs.

The most relevant steroid hormones that fluctuate in the final month of gestation in bovines are progesterone, corticosteroids, and estrogens. Progesterone, which is produced by the placenta and the corpus luteum (6–10), decreases abruptly from 2.5 days before parturition

caused mainly by prepartal luteolysis (11). Corticosteroids, and particularly cortisol, are primarily regulated by the mature fetal hypothalamus-pituitary-adrenal axis and gradually increase over the last month of gestation (12, 13), enhancing the conversion of androgens to estrogens via aromatase within the placenta (14–16). The estrogens that are synthesized in the placental membranes include 17β -estradiol and estrone (17), which play important roles in the onset of parturition by regulating uterine contractions (18), cervical dilation (19), and the subsequent opening of the birth canal. In addition to acting as the main source of estrogens, the placenta also regulates estrogen activity and excretion via sulfoconjugation, which is catalyzed by sulfotransferases; sulfoconjugated estrogens exhibit an impaired ability to bind to nuclear receptors and are excreted (20).

The steroidogenic cascade comprises cytochrome P450 (CYP genes) enzymes and hydroxysteroid dehydrogenases that are differentially localized and expressed in maternal, placental, and fetal tissues. Steroidogenic enzyme expression is considerably lower in placental tissue than in the fetal adrenal glands; however, variations in total tissue mass can significantly affect steroidogenic activity (13). Steroidogenesis can follow 2 pathways, the $\Delta 4$ pathway (in which 17α -OH-progesterone is the main intermediate) and the $\Delta 5$ pathway (in which 17α -OH-pregnenolone and dehydroepiandrosterone [DHEA] are the main intermediates). Both the $\Delta 4$ and $\Delta 5$ pathways are present in placental tissue and the fetal adrenal glands, but it has been suggested that steroidogenic enzymes within the bovine placenta are more $\Delta 5$ -competent than $\Delta 4$ -competent (21). Indeed, in bovines, the 17α -OH-progesterone is a poor substrate for androstenedione and subsequent estrogens synthesis (22, 23). The bovine placenta has the complete enzymatic cascade necessary to produce estrogens from pregnenolone via the $\Delta 5$ pathway (13, 22), and it has been demonstrated that in bovines the rise of estrogen levels toward parturition is sustained by placental synthesis using pregnenolone as substrate (22). Substrate sources for estrogens synthesis in the placenta vary

among species. Due to the lack of P450C17 activity in human and equine placenta, these species are dependent upon androgen substrates (DHEA and DHEA sulfate) from the fetal adrenal gland (humans) or from the fetal gonads (equine) to synthesize estrogens (24–27), whereas bovine, ovine, and swine placenta convert progestogens to estrogens without the need of fetal substrates (22, 28, 29).

The transcription of genes encoding steroidogenic enzymes is regulated by transcription factors (30). Recently, a second layer of regulation that involves epigenetic marks is believed to play a role in steroidogenesis. This influence of epigenetic marks is supported by the identification of DNA methylation sites in the promoter regions of CYP genes (31, 32); by the determination that the expression of steroidogenic factor-1, a master regulator of steroidogenesis, is controlled by DNA methylation (33); and by observations of altered steroid synthesis in response to chromatin-modifying agents, such as inhibitors of histone deacetylases (34–36).

ARTs, such as in vitro fertilization (IVF) and somatic cell nuclear transfer (SCNT), are often associated with gestational disturbances attributed to epigenetic changes resulting from the nonphysiological oocyte and embryo manipulation (37–40). Gestational disturbances are associated with SCNT, and to a much lesser extent with IVF, and include placental dysfunction, immature lungs (41, 42), and prolonged gestation and a lack of parturition signaling at the estimated date of parturition (39, 43–45); this set of disturbances is compatible with altered steroidogenesis. Indeed, in a murine model, links between ARTs and impaired placental steroid metabolism (46) and steroid delivery to the fetus (47) have already been established. Considering that the steroidogenic cascade can be controlled by epigenetic mechanisms and that ARTs lead to epigenetic modifications, it is reasonable to hypothesize that artificially conceived pregnancies might not exhibit the perfect balance of steroid hormones necessary to maintain pregnancy and to undergo parturition.

Various analytical techniques can be used to measure endogenous steroids. Immunoassays are most commonly used because they are rapid and easy to perform, although they have dubious reliability due to a lack of specificity caused by cross-reactivity with other endogenous steroids and lipids, matrix effects, and the use of human-specific kits for animal species (48–50).

Steroid dynamics involves multiple hormones at low concentrations (picograms per milliliter) and of similar chemical structure, making liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) the most accurate and reliable analytical approach for comparing absolute plasma steroid concentrations (51). LC-MS/MS offers high specificity, even in complex matrices, because of the selectivity provided by multiple reactions monitoring (MRM), leading to specific fragments or a set of fragment ions that unambiguously allow for the chemical identification of the analytes. Specific LC-MS/MS methods must be developed to analyze steroids in different biological matrices to achieve the highest specificity. In contrast to immunoassays, in which a single steroid can be measured, LC-MS/MS also has the advantage of enabling the quantitation of multiple steroids with simplified sample preparation (52). This analytical strategy also has the benefit of being able to simultaneously evaluate the hormones in the steroid pathway, providing an ideal tool for studying normal and pathological processes. LC-MS/MS is suitable for routine use and has high-throughput capability (53–55). For LC-MS/MS, triple-quadrupole instruments are the gold standard, but similar results have also been obtained with hybrid quadrupole time-of-flight (TOF) instruments (56).

The present study reports the development and validation of an analytical protocol for the simultaneous determination of 10 steroids (progesterone, corticosterone, 17α -OH-progesterone, 11-deoxycortisol, cortisol, androstenedione, estrone, estrone sulfate, testosterone, and 17β -estradiol) in bovine plasma using a hybrid quadrupole-TOF mass spectrometer. This method was used to determine the changes in steroid dynamics in naturally

and artificially conceived bovine pregnancies approaching parturition to test the hypothesis that artificial conception alters steroid dynamics, thereby changing the levels of corticosteroids and sex steroid hormones compared with normally conceived pregnancies.

Material and Methods

All in vitro procedures were performed at 38.5°C under 5% CO₂ in air and maximum humidity.

Oocyte collection and maturation

Follicles (3–8 mm) of abattoir-derived ovaries from crossbred cows were aspirated, and cumulus-oocyte complexes with at least 4 layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm were selected for in vitro maturation as previously described (57).

In vitro fertilization

Expanded cumulus-oocyte complexes matured for 24 hours were incubated in 100-μL drops of Tyrode's albumin lactate and pyruvate-IVF medium supplemented with 6 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 30 μg/mL heparin, 18μM penicillamine, 10μM hypotaurine, 1.8μM epinephrine, and 0.2mM sodium pyruvate. Semen from a Nellore bull was used at a final concentration of 1×10^5 live spermatozoa per drop. Oocytes and sperm cells were coincubated for 22 hours. After coincubation, presumptive zygotes were transferred to embryo culture medium.

Somatic cell nuclear transfer

Skin fibroblasts from 3 Nellore (*Bos indicus*) animals were used as the source of nuclear donors. Donor cells were serum-starved (0.5% fetal bovine serum) for 72 hours before micromanipulation to induce synchronization at the G1/G0 stages of the cell cycle. In vitro maturation, oocyte enucleation, reconstruction, and activation were performed as previously described (57).

Establishment of IVF- and SCNT-derived pregnancies

Embryo culture was performed in microdrops containing 100 μ L synthetic oviductal fluid with aminoacids supplemented with 5 mg/mL fatty acid-free BSA and 2.5% (vol/vol) fetal bovine serum overlaid with mineral oil. Groups of 20 embryos were cultured together for 7 days, until the blastocyst stage.

Individual IVF- and SCNT-derived blastocysts were nonsurgically transferred to the uteruses of previously estrous-synchronized recipient cows. The pregnancies were allowed to develop to term.

Perinatal management

Due to the lack of parturition signals, recipients carrying SCNT-derived fetuses underwent a protocol to induce parturition. This protocol consisted of administering triamcinolone acetonide (8 mg, im) 3 days before the delivery due date (DDD, 285 days gestation) followed by dexamethasone (20 mg, im) 36 hours before the DDD and d-cloprostenol (0.53 mg, im) 12 hours before the DDD. Parturition was induced in animals

carrying IVF-derived fetuses using the same protocol, and these animals served as the comparison group. Calves were delivered by cesarean section in both groups on day 285 of gestation. Animals carrying naturally conceived pregnancies without induction of parturition and with spontaneous delivery were used as the control (CTRL) group.

Sample collection and preparation

Blood samples from recipients carrying IVF- or SCNT-derived conceptuses were collected 30 to 34 days before the due date (day 30), on the day before the DDD (day 1), and on the day of delivery (day 0). Blood samples from the CTRL group were collected daily until spontaneous delivery. The samples corresponding to days 30, 1, and 0 were analyzed in this study. All the samples were collected using EDTA as the anticoagulant (Vacuette K3 EDTA; Greiner, Brazil). The samples were immediately centrifuged at 1500g at 4°C for 15 minutes in a refrigerated centrifuge and were stored at -20°C.

Steroid hormone quantitation

Plasma steroid levels (progesterone, corticosterone, 17 α -OH-progesterone, 11-deoxycortisol, cortisol, androstenedione, estrone, estrone sulfate, testosterone, and 17 β -estradiol; Figure 1) were determined in plasma samples from 4 CTRL animals, 4 animals with IVF-derived pregnancies, and 5 animals with SCNT-derived pregnancies.

Chemicals and the preparation of standard solutions

HPLC-grade solvents and formic acid were purchased from J. T. Baker. Ammonium

hydroxide and zinc sulfate heptahydrate were acquired from Merck. Ultrapurified water was generated using a Milli-Q Integral system (Merck-Millipore). Double charcoal-treated plasma was purchased from Golden West Biologicals. The steroid standards were acquired from Sigma-Aldrich.

Stock solutions of all the steroids were prepared in methanol (100 µg/mL), and the stock precipitation solution of zinc sulfate was prepared at 89 mg/mL. This precipitation solution was diluted 10-fold with methanol, and appropriate volumes of cortisol-d4, progesterone-d9, 17 α -OH-progesterone-d8, and estrone sulfate-d4 at final concentrations of 10.0, 5.0, 5.0, and 50.0 ng/mL, respectively, were added to make the working solutions. Six matrix-matched calibration standards were prepared daily for the calibration curve, and 3 quality control (QC) sample concentrations (low, medium, and high) were analyzed on 3 sequential days.

LC-MS/MS instrumentation

The LC-MS/MS analysis was performed on a hybrid quadrupole TOF TripleTOF 5600 mass spectrometer (AB SCIEX) coupled with a Shimadzu Prominence HPLC (Shimadzu Corporation). High-resolution MRM (MRMHR) was conducted with atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI) probes in positive and negative ion modes, respectively. The source parameters for the APCI(+) method included the following: nebulizing gas at 50 psi, curtain gas at 30 psi, needle current at 3 µA, and desolvation temperature of 500°C. The following parameters were used for the ESI(−) method: nebulizing gas at 45 psi, heater gas at 55 psi, curtain gas at 30 psi, negative ion spray capillary voltage at −4500 V, and desolvation temperature of 650°C.

The APCI(+) method was composed of 11 fast experiments (accumulation time 50 milliseconds each) with an initial TOF-MS scan (mass to charge ratio [m/z] 100–1000). The

other 10 experiments consisted of monitoring the product ion scans (m/z 50–1000) for the ions corresponding to the protonated molecules $[M + H]^+$ of cortisol, progesterone, testosterone, corticosterone, 17α -OH-progesterone, androstenedione, and 11-deoxycortisol as well as for the cortisol-d4, progesterone-d9, and 17α -OH-progesterone-d8 internal standards. The product ion scan for estradiol was set to dissociate the m/z 255.1 ion, which corresponds to the dehydrated protonated molecule $[M - H_2O + H]^+$. The ESI(–) method was built with 6 experiments (accumulation time 50 milliseconds each), starting with a TOF-MS scan (m/z 100–1000). The other 5 experiments were set as product ion scans (m/z 50–1000) for the deprotonated molecules $[M - H]^-$ of estradiol, estrone, and estrone sulfate and the estrone-d4 and estrone sulfate-d4 deuterated internal standards.

A collision-energy spread was used in all experiments to generate the best ion abundance for quantifier and qualifier transitions. Table 1 presents the optimized voltages for the ions.

Sample preparation and chromatographic conditions

All the steroids were extracted from a total of 600 μ L plasma using 2 extraction procedures.

Extraction procedure 1: ESI(–) analysis

Estradiol and estrone were extracted from 440 μ L plasma after spiking the sample with 20 μ L internal standard solution. Liquid/liquid extraction with 3.0 mL hexane/ethyl acetate (90/10) was performed for 1 minute using a vortex. After extraction, the samples were frozen at -20°C for 1 hour. The top organic layer was transferred to a clean tube, and the solvent was evaporated to dryness at room temperature with nitrogen. The samples were

reconstituted in 100 μ L methanol/water (50/50), transferred to a vial with a 250- μ L insert, and then injected (80 μ L) into the LC-MS/MS. The hormones analyzed by ESI(–) were separated using a Phenomenex C6-Phenyl Gemini column (3.0 μ m, 50 $\times$ 2 mm) at a mobile phase flow rate of 550 μ L/min. The mobile phase consisted of 0.05% ammonium hydroxide solution (A) and methanol with 0.05% ammonium hydroxide (B). The separation gradient was defined as the following: the initial composition (10% phase B) was ramped to 80% phase B in 2.5 minutes, and a second ramp was applied until 5.0 minutes to 90% phase B. The starting composition was applied from 5.0 to 5.2 minutes and was held until the end of the run (6.0 minutes). The inter-run equilibration time was 1.0 minute.

Extraction procedure 2: APCI(+) analysis and ESI(–) analysis of estrone sulfate

The second protocol was used to extract all the compounds analyzed in APCI(+) mode (progesterone, cortisol, estradiol, testosterone, corticosterone, 17 α -OH-progesterone, androstenedione, and 11-deoxycortisol) and to extract estrone sulfate, which was analyzed in ESI(–) mode. The plasma samples were prepared by protein precipitation with zinc sulfate solution containing the internal standards. An aliquot of 160 μ L plasma was mixed with the same volume of the precipitation solution and vortexed for 1 minute. After extraction, the samples were centrifuged at 4°C (3000 rpm) for 10 minutes, and the supernatant was transferred to a vial with a 250- μ L insert. The sample injection volumes were 100 and 50 μ L for the APCI(+) and ESI(–) methods, respectively. The hormones analyzed in APCI(+) mode were separated using a Phenomenex Kinetex C18 column (2.6 μ m, 100 $\times$ 3 mm) with a mobile phase flow rate of 550 μ L/min. The mobile phase consisted of water (A) and methanol (B) with no additives. Table 2 presents the chromatographic separation gradient.

Statistical analysis

To determine significant differences, ANOVA was performed and the means were compared using Student's t test. Variables considered in the model were embryo origin (CTRL, IVF, or SCNT), days to delivery (days 30, 1, and 0), and interactions. Because the same hormone datasets were subjected to multiple comparisons, false discovery rate correction (58) was used to control for family-wise errors. A 5% significance level was considered for all comparisons.

Results

LC-MS/MS method development and validation

Most of the steroids were separated and provided chromatographic peak widths narrower than 0.2 minutes. Even when the largest injection volumes were used, there was no negative impact on separation performance. The mass spectrometer was set to fast scanning in all the MRMHR experiments to obtain approximately 10 to 15 points across the thinner chromatographic peaks for quantitation. Figures 2 and 3 display representative extracted ion chromatograms obtained for the steroids using the APCI(+) and ESI(−) methods. The method validation was performed by evaluating the sensitivity, linearity, precision, recovery, carryover, matrix effect, and selectivity (matrix interference).

Limit of detection and limit of quantitation

The limit of quantitation (LOQ) for all the steroids was defined as the lowest

concentration of the compound that could be determined with a signal-to-noise ratio of 5 or greater and with a maximum imprecision of 20%. The limit of detection was determined as the minimum injected amount of the steroid that produced a signal-to-noise ratio of 3.

Linearity

To evaluate the method linearity, 6 calibration points were acquired by injecting samples over a concentration range from the LOQ to 1000 times the LOQ. All the steroids showed a linear dynamic range over 3 orders of magnitude, and the calibration curves at the working range were constructed using 6 calibration points through linear regression and fit weighting of $1/x$ or $1/x^2$ to prioritize the low concentration points. Analytical curves were plotted by response ratios and showed r^2 values equal to or greater than 0.99 (Table 3).

Precision and recovery

The intra-day CV ranged from 2.56% (17 α -OH-progesterone) to 19.89% (11-deoxycortisol) for the APCI(+) method and from 3.36% (estradiol) to 11.2% (estrone) for the ESI(–) method. The maximum inter-day imprecision was observed for corticosterone (17%) and estrone (7.5%) in the positive and negative ion mode methods, respectively. The recovery was calculated by comparing the theoretical concentration to the 3 QC levels. All the steroids showed recoveries between 80% and 120% at all concentrations, except for 11-deoxycortisol, which exhibited 131.8% recovery at the low concentration. Table 3 displays the intra-day and inter-day precision and recovery for the steroids.

Selectivity

Plasma samples were spiked with steroid standards at their own QC level, extracted, and analyzed to check for interfering peaks at the appropriate retention times for both the APCI(+) (Figure 2) and ESI(−) modes (Figure 3).

Matrix effect and carryover

The matrix effect was investigated by comparing the peak areas obtained for the standard solutions vs the spiked blank samples at the same nominal concentration. Two different concentration levels were verified: the LOQ and 10 times the LOQ. No significant matrix effect was observed for any of the steroids at the absolute areas (<20%) or at the concentration corrected by the internal standard (<10%) (data not shown). The carryover was evaluated, and no detectable amounts of any steroid were found after injection at the highest calibration point concentration. A 10-second rinsing program of flushing with a solution composed by acetonitrile, isopropanol, and 0.1% formic acid (1:1:1) was used to avoid interinjection carryover.

Concentrations of progesterone and 17 α -OH-progesterone in pregnant bovines

Progesterone levels were similar in the CTRL, IVF and SCNT groups during the final gestational period. In all the groups, progesterone levels decreased as the pregnancy progressed to term. For the CTRL and IVF pregnancies, the progesterone levels were similar at day 30 and at day 1 but were lower at day 0 than at day 30. In the SCNT group, progesterone levels decreased from day 30 to day 1, but there was no change on the subsequent day (Figure 4A and Supplemental Table 1). Similar profiles were observed for 17 α -OH-progesterone; the concentration decreased as the pregnancy progressed toward the parturition day. In cloned and naturally conceived gestations, 17 α -OH-progesterone levels decreased from day 30 to day 1, but the levels were similar on the next day. The 17 α -OH-

progesterone concentrations were different on day 30 between the CTRL and IVF groups, with a lower concentration in the IVF group. In the IVF group, there were no differences in 17α -OH-progesterone levels from day 30 to day 1, but the 17α -OH-progesterone concentration decreased on day 0 (Figure 4C and Supplemental Table 1).

Concentration of corticosteroids in pregnant bovines

The corticosterone, 11-deoxycortisol and cortisol concentrations exhibited marked 17.7-, 3.5- and 10-fold reductions, respectively, in the SCNT group from day 30 to the subsequent days, whereas the levels remained constant during the month before delivery in the CTRL and IVF groups. The corticosterone levels were different between the CTRL and IVF groups at all timepoints and between the CTRL and SCNT groups at day 1; for both comparisons, the corticosterone levels were always higher in the CTRL group ($P < .05$). At day 30, animals carrying SCNT conceptuses had significantly higher plasma levels of 11-deoxycortisol compared with the CTRL animals and higher levels of the three corticosteroids compared with the IVF animals (Figure 4, B, D, and E, and Supplemental Table 1).

Concentration of sex steroids in pregnant bovines

The androstenedione profiles revealed different kinetics among the CTRL, IVF, and SCNT groups. Whereas the androstenedione levels remained constant during the last month of gestation in the CTRL and IVF groups, they increased in the SCNT group, from 0.11 ± 0.03 ng/mL on day 30 to 1.24 ± 0.22 ng/mL on day 0; at this time point, SCNT pregnancies differed significantly from IVF and CTRL pregnancies (Figure 4F and Supplemental Table 1). Testosterone levels remained unaltered during the final month before parturition in all

groups; despite the numerical variations, no differences were detected among the groups (Figure 4I and Supplemental Table 1).

The estrone and estradiol levels were constant in the plasma samples from animals in the CTRL and IVF groups, and the estradiol levels were constant in the SCNT group. For the SCNT group, however, the estrone concentration significantly increased toward the end of gestation, and at day 0, the estrone levels reached a similar concentration as that measured in the IVF group. Except for this similarity, the estrone and estradiol concentrations were consistently higher in the IVF group (Figure 4, G and J, and Supplemental Table 1). Estrone sulfate increased from day 30 to day 1 and day 0 in the CTRL group and from day 30 to day 1 in the cloned group, whereas estrone sulfate levels were similar throughout the final gestational month of IVF pregnancies. Lower estrone sulfate levels were observed in the SCNT group at day 30 compared with the IVF group and at day 0 compared with the CTRL group (Figure 4H and Supplemental Table 1). Despite numerical variations, no differences were detected in the Estrone to estrone sulfate ratio during late-term pregnancy (Figure 4K and Supplemental Table 1).

Discussion

This work describes the development and analytical validation of an LC-MS/MS method to simultaneously quantify 10 steroids in bovine plasma. This method was used to study the corticosteroid and sex hormone dynamics in normally conceived or in IVF- and SCNT-derived pregnancies approaching parturition. An important feature of our method is

that the instrumentation enables the rapid collection of multiple product ion scans of each steroid. The ability to extract a narrow mass window (m/z 0.025) of the corresponding fragments generates MRMHR transitions that can be used individually or can be summed for quantitation. Postacquisition product ion selection allows for the choice of using the most abundant and lowest noise transition for each compound present in the sample (56). High-resolution and accurate MS scans (resolving power of 30 000) were also used to simultaneously acquire all the sample information. MRMHR offers the advantage of minimum method optimization and a wide linear dynamic range to quantify multiple compounds at different concentrations.

The present experiment determined the absolute concentrations of the steroidogenic hormones in the plasma from surrogates, encompassing the hormones synthesized within the placenta, in the fetal adrenal glands, and in the maternal adrenals and ovaries, and the effects of steroid metabolism. Figure 1 illustrates the steroid synthesis cascade. Certain steroids in the metabolic cascade could not be measured, such as cholesterol, pregnenolone, 17α -OH-pregnenolone, DHEA, androstenediol, estriol, and aldosterone, but are mentioned in the discussion.

For ART-derived pregnancies, our data supported the hypothesis that artificial conception alters steroidogenic regulation, leading to different corticosteroid and sex steroid hormone levels in artificially conceived pregnancies. The concentrations of corticosterone, 11-deoxycortisol, and cortisol in animals carrying SCNT-, IVF- or naturally derived pregnancies differed during final gestational development. The profiles of these corticosteroids in the SCNT group were similar and decreased by 3.5- to 17.7-fold from 30 days prepartum to parturition. In the IVF and CTRL groups, the corticosteroid levels were constant throughout the last month of gestation, and low corticosterone levels were observed in the IVF group throughout the last month of gestation. These results suggested that in

SCNT-derived pregnancies, there is an upregulation of the corticosteroid pathway 30 days before parturition as a result of increased activity of the P450C11 and P450C21 enzymes; in IVF-derived pregnancies, there is generally lower P450C11 activity throughout the last month of gestation.

The sex steroid profiles were also altered in ART-derived pregnancies compared with naturally conceived pregnancies, with the exception of testosterone. In the IVF group, high levels of estrone and estradiol were detected throughout the last month of gestation compared with the SCNT and CTRL groups. In the SCNT group, androstenedione and estrone levels increased from 30 days prepartum to parturition. Taken together, the hormonal profiles of animals carrying ART-derived pregnancies clearly demonstrated a hyperactivation of aromatase in the IVF group. In the SCNT group, however, 2 possible alternative mechanisms could have resulted in the gradual increases in androstenedione and estrone: gradual hyperactivation of P450C17 or increasing supply from the DHEA pathway (not evaluated). Because bovines are less $\Delta 4$ -pathway-competent (21), 17α -OH-progesterone is a poor substrate for androgen and estrogen synthesis in this species (13, 59). Furthermore, because the concentration of androstenedione, which is also synthesized by P450C17, failed to parallel that of 17α -OH-progesterone, the DHEA pathway (via 17α -OH-pregnenolone) supply for androstenedione appears to be a more reasonable explanation for the increase in androstenedione. In addition, the estrone increase in the SCNT group appeared to be a consequence of increased androstenedione (estrone substrate) because the 2 steroids were positively correlated at term (Supplemental Table 2) and because no parallel increase in the concentration of estradiol, which is also synthesized by aromatase, was observed.

The reduction of progesterone levels toward parturition is considered one of the main endocrine events associated with delivery. In both ART-derived and naturally derived pregnancies, the progesterone concentration gradually decreased during the last month of

gestation until term, as is expected for natural or dexamethasone-induced pregnancies approaching parturition (2, 4). The progesterone decline was accompanied by a decrease in 17 α -OH-progesterone, suggesting that progesterone was metabolized by P450C17 to 17 α -OH-progesterone when pregnancy approached term (2, 4).

In SCNT-derived pregnancies, it was previously reported that the ratio of the active/inactive forms of maternal estrogens was low during the prepartum period, suggesting an upregulation of estrogen sulfotransferase (60). However, in the present study, there were no differences in the ratio of the active/inactive forms of maternal estrogens (estrone/estrone sulfate) among the CTRL, SCNT, and IVF groups. The estrone sulfate concentration in the SCNT group was lower than that in the IVF group 30 days before parturition and was lower than that in the CTRL group at term, which may indicate placental dysfunction in the SCNT group compared with the IVF and CTRL groups. Similar to our findings, for naturally conceived animals, the estrone sulfate concentration is slightly lower during the 30 to 50 days before parturition than during the final days of gestation, with a low-magnitude increase at the time of parturition (5). In the present study, there was no gradual increase in estrone sulfate in the SCNT and IVF groups compared with the CTRL group, as has been described by others (5). A slight decrease in estrone sulfate before parturition is related to stillbirth (5), indicating the potential use of estrone sulfate to monitor fetal well-being in animals at a high risk of being stillborn. The previously observed lack of preparation for parturition in cloned pregnancies (61) together with the present findings suggest that SCNT-derived pregnancies may have a less functional placenta.

Hypotheses can be formulated to explain all the observed differences in steroid dynamics in ART-derived pregnancies. Previous studies in rodents (46, 47) revealed altered steroid metabolism in ART-derived pregnancies. These studies proposed that abnormalities in the systemic circulation of steroids in pregnancies conceived by ART result from altered

steroid diffusion/flow from the mother to the fetus (47) as well as increased clearance and metabolism of steroids by the placenta (46). Bovines and mice exhibit differences in placental structure, which is synepitheliochorial in ruminants and hemochorial in rodents, and in placental gene expression profiles (62) that hinder the direct translation of findings from one species to another.

The same protocol was used to induce labor in all the SCNT- and IVF-derived pregnancies to prevent newborn loss due to the lack of fetal maturity (61) and because SCNT-derived pregnancies are deficient at signaling parturition (60). Dexamethasone is used to induce fetal maturity before parturition, mainly by increasing the secretion of surfactant into the lungs (63). In our study, dexamethasone may have interfered with the steroid profile analysis. Previous studies reported conflicting results because it has been demonstrated that parturition induction with dexamethasone increases the total estrogen concentration (64) or that dexamethasone-induced and normal parturition have similar placental aromatase expression and prepartum plasmatic estrogen profiles (2). However, the most important findings, higher corticosteroid levels in cloned pregnancies 30 days before parturition and higher estrogen levels in IVF-derived pregnancies during the last month of development, were not affected by dexamethasone because they were detected before the dexamethasone treatment.

Among the several hypotheses that potentially explain our findings, epigenetic changes caused by manipulating gametes and embryos during IVF and SCNT must be considered. It is widely known that the use of ART modifies epigenetic marks (DNA methylation, histone modification, and aberrant microRNA expression) in oocytes and embryos, resulting in abnormal phenotypes (65). Epigenetics provides the molecular mechanisms for the gene-environment interaction that can permanently alter gene expression in exposed germ cells and embryos (66). Female germline methylation is established during

later stages of oocyte development (67); therefore, in ART, oocytes are immature when collected and are artificially induced to develop in an unnatural in vitro environment. During the initial development, embryos are cultured in a dramatically modified environment at a time when parental genomes are undergoing widespread epigenetic reprogramming, rendering oocytes and embryos manipulated by ART highly prone to epigenetic disturbances (40). In SCNT, the epigenetic disorders are magnified because in addition to the in vitro conditions, cloned conceptuses accumulate the effects of the faulty epigenetic reprogramming of somatic nuclei to embryonic nuclei (38, 68, 69). During the prepartum period, circulating corticosteroids originate primarily from the fetal hypothalamus-pituitary-adrenal axis as a result of P450C11 and P450C21 activity, whereas the major source of estrogens is aromatase activity in placental tissue. Therefore, it is tempting to speculate that these enzymes or regulatory transcription factors are epigenetically deregulated in fetal adrenal glands and in the placenta, respectively. This hypothesis is plausible because ART is clearly associated with massive epigenetic disturbances within the fetal and placental tissues (68, 69) and because there are several indications that epigenetic factors control steroidogenesis (31–33).

Conclusions

The simultaneous measurement of 10 steroids by LC-MS/MS provided detailed analysis of the corticosteroid and sex steroid pathways. The determination of steroid levels before parturition induction revealed higher levels of corticosterone, 11-deoxycortisol, and cortisol in cloned pregnancies compared with naturally and/or in vitro conceived pregnancies and higher levels of estrogens in IVF pregnancies compared with cloned or naturally conceived counterparts. After parturition induction, the level of estrogens remained equally

higher in IVF pregnancies, whereas levels of 11-deoxycortisol and cortisol showed no differences among groups. Corticosterone levels were higher in naturally conceived compared with ART-derived pregnancies, and this result can be due to the form of conception, the parturition induction, or both. Therefore, we observed alteration in both sex steroid and corticosteroid hormone profile of ART-derived pregnancies that were persistent or nonpersistent after parturition induction, respectively. Taken together, these findings suggest that ART-derived pregnancies, associated or not with parturition induction, have steroid profiles compatible with the dysregulation of steroidogenic tissues.

Table 1. Mass Spectrometer Detection Parameters Used in the MRM^{HR} Methods

Steroid	Q1 (<i>m/z</i>)	Product Ion (<i>m/z</i>)	Best CE	Voltages (V)			Ionization
				DP	CE	CES	
Estrone	269.1	145.0656 143.0500	−49 −66	−210	−60	10	ESI (−)
Estrone sulfate	349.1	269.1548 145.0660	−42 −68	−130	−50	10	ESI (−)
Estradiol	271.1	145.0655 143.0505	−50 −68	−50	−60	10	ESI (−)
Estradiol	255.1	144.1104 159.0804	53 32	105	40	10	APCI (+)
Cortisol	363.1	121.0648 105.0702	34 57	120	45	10	APCI (+)
Progesterone	315.2	109.0649 97.0654	30 27	95	30	10	APCI (+)
Testosterone	289.1	97.0656 109.0652	29 30	125	30	10	APCI (+)
Corticosterone	347.1	91.0555 121.0649	77 35	121	57	20	APCI (+)
17 α -OH-Progesterone	331.0	97.0654 109.0652	31 35	122	35	10	APCI (+)
Androstenedione	287.1	109.0650 97.0655	38 40	118	40	10	APCI (+)
11-Deoxycortisol	347.1	97.0654 109.0650	39 40	121	40	10	APCI (+)

Abbreviations: CE, collision energy; CES, collision energy spread; DP, declustering potential.

Table 2. The Chromatographic Gradient Program Used With the APCI(+) Method

Table 2. The Chromatographic Gradient Program Used With the APCI(+) Method			
Time, min	Flow, μL/min	Phase A, %	Phase B, %
2.0	550	90	10
3.0	550	90	10
5.0	550	60	40
7.0	550	30	70
10.0	550	20	80
10.1	550	5	95
12.8	550	5	95
13.0	550	0	100
13.5	550	0	100
13.6	550	90	10
16.5	550	90	10

Table 3. Summary of LC-MS/MS Method Performance and Major Results^a

Table 3. Summary of LC-MS/MS Method Performance and Major Results ^a											
Steroid	QC Level, ng/mL	Calibration Range, ng/mL	Intra-assay (n = 5)				Interassay (n = 15)				LOQ, ng/mL
			Mean, ng/mL	SD, ng/mL	RSD, %	Accuracy, %	Mean, ng/mL	SD, ng/mL	RSD, %	Accuracy, %	
Estradiol	0.4	0.10–15.0	0.34	0.025	7.46	84.9	0.35	0.023	6.63	87.1	0.10
	4.0		3.45	0.140	4.05	86.3	3.54	0.155	4.39	88.5	
	12.0		10.9	0.367	3.36	91.1	11.1	0.638	5.74	92.7	
Estrone	0.1	0.025–3.75	0.08	0.009	11.2	83.1	0.09	0.007	7.46	88.1	0.025
	0.4		0.34	0.027	7.9	84.6	0.33	0.013	4.05	82.8	
	3.0		2.78	0.184	6.6	92.7	2.89	0.097	3.36	96.4	
Estrone sulfate	4.0	1–150	3.85	0.339	8.8	96.2	3.92	0.267	6.80	98.1	1.00
	16.0		15.73	1.132	7.2	98.3	15.4	0.787	5.11	96.5	
	120.0		124.4	5.724	4.6	103.7	123.4	3.022	2.45	102.8	
Cortisol	4.0	1.00–150.0	3.27	0.152	4.65	81.6	3.27	0.146	4.48	81.7	1.00
	40.0		35.3	2.254	6.39	88.2	35.8	1.227	3.43	89.4	
	120.0		110.5	5.711	5.17	92.1	108.8	2.600	2.39	90.7	
Progesterone	0.4	0.10–15.0	0.36	0.027	7.48	89.9	0.36	0.010	2.86	90.4	0.10
	4.0		3.50	0.181	5.16	87.5	3.54	0.083	2.35	88.5	
	12.0		10.7	0.417	3.89	89.3	10.6	0.240	2.26	88.5	
Testosterone	0.4	0.10–15.0	0.34	0.029	8.46	84.2	0.34	0.014	4.08	84.6	0.10
	4.0		3.53	0.224	6.34	88.3	3.58	0.165	4.61	89.5	
	12.0		11.2	0.537	4.81	93.1	11.0	0.495	4.49	91.9	
Corticosterone	0.2	0.05–7.50	0.17	0.030	18.2	83.6	0.17	0.028	16.8	82.5	0.05
	2.0		1.76	0.295	16.7	88.2	1.81	0.269	14.9	90.4	
	6.0		5.45	0.676	12.4	90.8	5.18	0.487	9.4	86.3	
17 α -OH- Progesterone	0.4	0.10–15.0	0.32	0.020	6.28	80.08	0.33	0.017	5.04	82.3	0.05
	4.0		3.41	0.154	4.52	85.17	3.56	0.155	4.36	89.1	
	12.0		10.9	0.279	2.56	90.7	11.1	0.447	4.02	92.7	
Androstenedione	0.1	0.03–4.50	0.11	0.014	12.32	91.4	0.12	0.005	4.56	96.7	0.025
	1.2		1.18	0.104	8.8	98.0	1.19	0.055	4.63	98.8	
	3.6		3.74	0.202	5.39	103.9	3.68	0.178	4.84	102.2	
11-Deoxycortisol	0.1	0.03–4.50	0.16	0.031	19.89	131.6	0.15	0.028	19.1	124.2	0.025
	1.2		1.35	0.127	9.43	112.5	1.40	0.087	6.2	116.3	
	3.6		4.33	0.311	7.2	120.2	4.32	0.184	4.26	119.9	

Abbreviation: RSD, relative standard deviation.

^a Results are shown only for ESI(–) method.

Figure 1. Schematic representation of the steroid biosynthesis pathway. Steroidogenic enzymes are indicated above or beside the arrows. Steroid hormones depicted in black were quantified by LC-MS/MS in this study. Abbreviation: HSD, hydroxysteroid dehydrogenase.

Figure 2. Representative extracted ion chromatograms of steroids analyzed using the APCI(+)-MS/MS method.

Figure 3. Representative extracted ion chromatograms of steroids analyzed using the ESI(-)-MS/MS method.

Figure 4. Plasma levels of molecules in the corticosteroid pathway (A, progesterone; B, corticosterone; C, 17 α -OH-progesterone; D, 11-deoxycortison; E, cortisol) and in the sex steroid pathway (F, androstenedione; G, estrone; H, estrone sulfate; I, testosterone; J, estradiol; and K, estrone [E1] to estrone sulfate [E1S] ratio) in bovine recipients carrying CTRL conceptuses or IVF- or SCNT-derived conceptuses 30 days (D-30) and 1 day (D-1) before parturition and on the day of parturition (D0). The bars represent the mean, and the whiskers represent the SEM. The different letters above the gray bars (a and b), the black bars (a', b', and c') and the white bars (a'' and b'') indicate significant differences ($P < .05$) in the CTRL, IVF, and SCNT groups, respectively. Significant differences ($P < .05$) are as follows: *, IVF vs SCNT comparison; **, CTRL vs IVF comparison; ***, CTRL vs SCNT comparison. The dashed arrow indicates reduced conversion efficiency within the bovine placenta.

REFERENCES

1. **Bazer FW, First NL** 1983 Pregnancy and parturition. *J Anim Sci.* 57 Suppl 2:425-460
2. **Shenavai S, Preissing S, Hoffmann B, Dilly M, Pfarrer C, Özalp GR, Caliskan C, Seyrek Intas K, Schuler G** 2012 Investigations into the mechanisms controlling parturition in cattle. *Reproduction* 144: 279–292
3. **Kindahl H, Kornmatitsuk B, Gustafsson H** 2004 The cow in endocrine focus before and after calving. *Reprod Dom Anim* 39:217–221
4. **Kindahl H, Kornmatitsuk B, Königsson K, Gustafsson H** 2002 Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. *Domest Anim Endocrinol* 23:321–328
5. **Kornmatitsuk B, Dahl E, Ropstad E, Beckers JF, Gustafsson H, Kindahl H** 2004 Endocrine profiles, haematology and pregnancy outcomes of late pregnant holstein dairy heifers sired by bulls giving a high or low incidence of stillbirth. *Acta Vet Scand* 45:47–68
6. **Robertson HA** 1972 Sequential changes in plasma progesterone in the cow during the estrus cycle, pregnancy, at parturition and postpartum. *Can J Anim Sci* 52:645–658
7. **Johnson WH, Manns JG, Adams WM, Mapletoft RJ** 1981 Termination of pregnancy with cloprostenol and dexamethasone in intact or ovariectomized cows. *Can Vet J* 22:288–290
8. **Pimmentel SM, Pimentel MV, Weston PG, Hixon JE, Wagner WC** 1986 Progesterone secretion by the bovine fetoplacental unit and responsiveness of corpora lutea to steroidogenic stimuli at two stages of gestation. *Am J Vet Res* 47:1967–1971

-
9. **Ullmann MB, Reimers TJ** 1989 In: Proceedings of a workshop on maternal recognition of pregnancy and maintenance of the corpus luteum. *J Reprod Fertil Suppl* 37:173–179
 10. **Wilden SR, Day ML** 1991 Placental progesterone production in mid to late-gestation in the beef cow. *Beef-Cattle-Research-Report – Ohio-Agricultural-Research-and-Development-Center* 91- 2;73–83
 11. **Edqvist L-E, Ekman L, Gustafsson B, Johansson EDB** 1973 Peripheral plasma levels of oestrogens and progesterone during late bovine pregnancy. *Acta Endocrinol* 72:81–88.
 12. **Hunter JT, Fairclough RJ, Peterson AJ, Welch RAS** 1977. Foetal and maternal hormonal changes preceding normal bovine parturition. *Acta Endocrinol* 84:653–662
 13. **Conley AJ, Head JR, Stirling DT, Mason JI** 1992 Expression of steroidogenic enzymes in the bovine placenta and fetal adrenal glands throughout gestation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 130:264–2650
 14. **Takenouchi N, Oshima K, Shimada K, Takahashi M** 2004 The development of a sensitive enzyme immunoassay for the determination of estrone and estradiol-17b in bovine blood plasma based on the same homologous combination with antiserum and steroid-enzyme conjugate. *J Vet Med Sci* 66:1315–1321
 15. **Wathes DC, Porter DG** 1982 Effect of uterine distension and oestrogen treatment on gap junction formation in the myometrium of the rat. *J Reprod Fertil* 65:497–505
 16. **Anderson AB, Flint AP, Turnbull AC** 1975 Mechanism of action of glucocorticoids in induction of ovine parturition: effect on placental steroid metabolism. *J Endocrinol* 66:61–70

-
17. **Hoffmann B, Schuler G** 2002 The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: Observations during the second half of gestation. *Domest Anim Endocrinol* 23:309–320
 18. **Breeveld-Dwarkasing VNA, Struijk PC, Lotgering FK, Eijskoot F, Kindahl H, van derWeijden GC, Taverne MAM** 2003 Cervical dilatation related to uterine electromyographic activity and endocrinological changes during prostaglandin F2a-induced parturition in cows. *Biol Reprod* 68:536–542
 19. **Schuler G, Ozalp GR, Hoffmann B, Harada N, Browne P, Conley AJ** 2006 Reciprocal expression of 17a-hydroxylase-C17,20-lyase and aromatase cytochrome P450 during bovine trophoblast differentiation: a two-cell system drives placental oestrogen synthesis. *Reproduction* 131:669–679
 20. **Hoffmann B, Falter K, Vielemeier A, Failing K, Schuler G** 2001 Investigations on the activity of bovine placental oestrogen sulfotransferase and -sulfatase from midgestation to parturition. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109(5):294–301
 21. **Fevold HR, Lorence MC, MacCarthy JL, Trant JM, Kagimoto M, Waterman MR, Mason JI** 1989 Rat P450 (17 alpha) from testis: characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both delta 4- and delta 5-steroid-17,20-lyase reactions. *Mol Endocrinol* 3:968–975
 22. **Schuler G, Hartung F, Hoffmann B** 1994 Investigations on the use of C-21-steroids as precursors for placental oestrogen synthesis in the cow. *Exp Clin Endocrinol* 102(3):169-74
 23. **Conley AJ, Bird IM** 1997 The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod* 56(4):789-99

-
-
24. **Mesiano S, Jaffe RB** 1997 Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* 18(3):378-403
 25. **Lavoie HA, King SR** 2009 Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med* 234(8):880–907
 26. **Fürbass R, Selimyan R, Vanselow J** 2008 DNA methylation and chromatin accessibility of the proximal Cyp 19 promoter region 1.5/2 correlate with expression levels in sheep placentomes. *Mol Reprod Dev* 75(1):1–7
 27. **da Silva AM, de Freitas MA, Rios AF, Renzi A, Lôbo RB, Galerani MA, Vila RA, Ramos ES** 2011 Identification of a DNA methylation point in the promoter region of the bovine CYP21 gene. *Genet Mol Res* 10(3):1409–1415
 28. **Hoivik EA, Bjanesoy TE, Bakke M** 2013 Epigenetic regulation of the gene encoding steroidogenic factor-1. *Mol Cell Endocrinol* 22;371(1-2):133–139
 29. **Gregoraszczuk E, Wojtowicz AK, Tauboll E, Ropstad E** 2000. Valproate-induced alterations in testosterone, estradiol and progesterone secretion from porcine follicular cells isolated from small- and medium-sized ovarian follicles. *Seizure* 9:480–485
 30. **Mikkonen K, Vainionpää LK, Pakarinen AJ, Knip M, Jarvela IY, Tapanainen JS, et al.** 2004 Long-term reproductive endocrine health in young women with epilepsy during puberty. *Neurology* 62:445–50.
 31. **Chen WY, Weng JH, Huang CC, Chung BC** 2007 Histone deacetylase inhibitors reduce steroidogenesis through SCF-mediated ubiquitination and degradation of steroidogenic factor 1 (NR5A1). *Mol Cell Biol* 27:7284–7290.
 32. **Edwards JL, Schrick FN, McCracken MD, van Amstel SR, Hopkins FM, Welborn MG, Davies CJ** 2003 Cloning adult farm animals: a review of the

-
- possibilities and problems associated with somatic cell nuclear transfer. *Am J Reprod Immunol* 50:113–123
- 33. Smith LC, Suzuki Jr J, Goff AH, Filion F, Therrien J, Murphy BD, Kohan-Ghadr HR, Lefebvre R, Brisville AC, Buczinski S, Fecteau G, Perecin F and Meirelles FV** 2012 Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. *Reprod Dom Anim* 47 Suppl. 4:107–114
- 34. Hashizume K, Ishiwata H, Kizaki K, Yamada O, Takahashi T, Imai K, Patel OV, Akagi S, Shimizu M, Takahashi S, Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Tsujimoto G, Todoroki J, Izaike Y.** 2002 Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. *Cloning and Stem Cells* 4:197–209
- 35. Hajj N, Haaf T** 2013 Epigenetic disturbances in *in vitro* cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril* 99:632–641
- 36. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I** 1998 Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 3:155–163
- 37. Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P** 2006 Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod* 75:122–130
- 38. Campbell KHS, Fisher P, Chen WC, Choi I, Kelly RDW, Lee JH, Xhu J** 2007 Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology* 68:214–231
- 39. Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP** 2002 Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 66:6–13

-
- 40. Pace MM, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsberg EJ, Golueke PJ, Graber DF, Kemper JC, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pfister-Genskow M, Strelchenko NS, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD** 2002 Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod* 67:334–339
- 41. Collier AC, Miyagi SJ, Yamauchi Y, Ward MA** 2009 Assisted reproduction technologies impair placental steroid metabolism. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 116:21–28
- 42. Raunig JM, Yamauchi Y, Ward MA, Collier AC** 2011 Assisted reproduction technologies alter steroid delivery to the mouse fetus during pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 126:26–34
- 43. Rinaldi S, Déchaud H, Biessy B, Morin-Raverot V, Toniolo P, Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A, E. Shore R, Secreto G, Ciampi A, Riboli E, Kaaks R** 2001 Reliability and validity of commercially available, direct radioimmunoassays for measurement of blood androgens and estrogens in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(7):757–765
- 44. Soldin SJ, Soldin OP** 2009 Steroid Hormone Analysis by Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem* 55(6):1061–1066
- 45. Shiraishi S, Lee WNP, Leung A, Goh HHV, S. Swerdloff R, Wang C** 2008 Simultaneous measurement of serum testosterone and dihydrotestosterone by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 54(11):1855–1863
- 46. Tsikas D** 2010 Quantitative analysis of biomarkers, drugs and toxins in biological samples by immunoaffinity chromatography coupled to mass spectrometry or tandem mass spectrometry: A focused review of recent applications. *J Chromatogr. B* 878(2):133–148

-
- 47. Abdel-Khalik J, Björklund E, Hansen M** 2013 Simultaneous determination of endogenous steroid hormones in human and animal plasma and serum by liquid or gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 928:58–77
- 48. Koal T, Schmiederer D, Pham-Tuan H, Röhring C, Rauh M** 2012 Standardized LC–MS/MS based steroid hormone profile-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 129:129– 138
- 49. Keski-Rahkonen P, Huhtinen K, Poutanen M, Auriola S** 2011 Fast and sensitive liquid chromatography–mass spectrometry assay for seven androgenic and progestagenic steroids in human serum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127:396– 404
- 50. Kaklamanos G, Theodoridis G A, Dabalís T, Papadoyannis I** 2011 Determination of anabolic steroids in bovine serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 879: 225–229
- 51. Andrews GL, Simons BL, Young JB, Hawkrige AM, Muddiman DC** 2011 Performance Characteristics of a New Hybrid Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal Chem* 83:5442–5446
- 52. Sangalli JR, De Bem THC, Perecin F, Chiaratti MR, Oliveira LJ, Araújo RR, Pimentel JRV, Smith LC, Meirelles FV** 2012 Treatment of nuclear-donor cell or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. *Cell Reprogram* 14(3):235–247
- 53. Benjamini Y, Hochberg Y** 1995 Controlling the false discovery: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of Royal Statistic Soc* 57:289–300
- 54. Lund J, Faucher DJ, Ford SP, Porter JC, Waterman MR, Mason JI** 1988 Developmental expression of bovine adrenocortical steroid hydroxylases regulation of

-
- P-450(17 alpha) expression leads to episodic fetal cortisol production. *J Biol Chem* 263:16195–16201
55. **Hirayama H, Sawai K, Moriyasu S, Hirayama M, Goto Y, Kaneko E, Miyamoto A, Ushizawa K, Takahashi T, Minamihashi A** 2008 Excess estrogen sulfoconjugation as the possible cause for a poor sign of parturition in pregnant cows carrying somatic cell clone fetuses. *Reproduction* 136:639–647
 56. **Meirelles FV, Birgel Jr EH, Perecin F, Bertolini M, Traldi AS, Pimentel JRV, Komninou ER, Sangalli JR, Fantinato Neto P, Nunes MT, Pogliani FC, Meirelles FDP, Kubrusly FS, Vannucchi CI, Silva LCG** 2010 Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Reprod Fertil Dev* 22:88–97
 57. **Barreto RS, Bressan FF, Oliveira LJ, Pereira FT, Perecin F, Ambrósio CE, Meirelles FV, Miglino MA** 2011 Gene expression in placentation of farm animals: an overview of gene function during development. *Theriogenology* 76(4):589–597
 58. **DeKruif A, Benedictus G** 1993 Perinatal mortality and the birth of weak calves. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 118:684–688
 59. **Hartmann D, Honnensa Ä, Piechotta M, Lüttgenau J, Niemann H, Rath D, Bollwein H** 2013 Effects of a protracted induction of parturition on the incidence of retained placenta and assessment of uterine artery blood flow as a measure of placental maturation in cattle. *Theriogenology* 80:176–184
 60. **Denomme MM, Mann MR** 2012 Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during ARTs. *Reproduction* 144:393–409
 61. **Feil R, Fraga MF** 2012 Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 13:97–109
 62. **Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM** 2004. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 13:839–849

-
-
- 63. Hossain MM, Tesfaye D, Salilew-Wondim D, Held E, Pröll MJ, Rings F, Kirfel G, Looft C, Tholen E, Uddin J, Schellander K, Hoelker M** 2014 Massive deregulation of miRNAs from nuclear reprogramming errors during trophoblast differentiation for placentogenesis in cloned pregnancy. *BMC Genomics* 15:43
- 64. Chavatte-Palmer P, Camous S, Jammes H, Le Cleac'h N, Guillomot M, Lee RS** 2012 Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta suppl* 33:99–104