

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Mediadores inflamatórios e estradiol: regulação e efeitos sobre o trato
reprodutivo de ruminantes**

Fernando Caetano de Oliveira

Pelotas, 2018

Fernando Caetano de Oliveira

**Mediadores inflamatórios e estradiol: regulação e efeitos sobre o trato
reprodutivo de ruminantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: PhD Thomaz Lucia Jr
Coorientador: Dr Bernardo Garziera Gasperin
PhD Vilceu Bordignon

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O48m Oliveira, Fernando Caetano de

Mediadores inflamatórios e estradiol: regulação e efeitos sobre o trato reprodutivo de ruminantes / Fernando Caetano de Oliveira ; Thomaz Lucia Jr, orientador ; Bernardo Garziera Gasperin, Vilceu Bordignon, coorientadores. — Pelotas, 2018.

122 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Prostaglandina. 2. Ovulação. 3. Divergência folicular. 4. Ambiente uterino. 5. Epitélio endometrial. I. Lucia Jr, Thomaz, orient. II. Gasperin, Bernardo Garziera, coorient. III. Bordignon, Vilceu, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

Elaborada por Dafne Silva de Freitas CRB: 10/2175

Fernando Caetano de Oliveira

Mediadores inflamatórios e estradiol: regulação e efeitos sobre o trato reprodutivo de ruminantes

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/02/2018

Banca examinadora:

Prof. PhD. Thomaz Lucia Jr (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela University of Minnesota

Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. PhD. Fernando Silveira Mesquita
Doutor em Fisiologia da Reprodução pela University of Illinois

Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori
Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília

Agradecimentos

Primeiramente e mais importante, a DEUS, por me iluminar em todos os passos de minha vida.

A família. Em especial a meus maiores apoiadores, meu pai José Roberto, minha mãe Sônia, minha esposa Suélen e minha filha Isabella “minha força, minha inspiração”.

Meus avós Maria Izabel (Dona Biloca) e João Carlos (*in memoriam*), Maria Eloa e Gregolino (*in memoriam*), mágicos, em qualquer tempo trazem de volta os sabores da infância. A meu irmão Roberto e à tia Doralina, que com tantos anos de amor e carinho, faz parte da família. Aos demais familiares, tios, tias e primos, por todo carinho e amizade que sempre tiveram comigo.

Ao grupo do Laboratório de Reprodução, meus propulsores nesta jornada acadêmica e profissional. Em especial aos orientadores e amigos Prof. Thomaz Lucia Jr. e Prof. Bernardo Gasperin, e demais mestres do grupo, Prof. Arnaldo Vieira, Prof. Rafael Mondadori e Prof. Carine Corcini. Aos demais colegas do grupo, que me acompanharam durante essa jornada, eternos amigos e companheiros, incansáveis no trabalho dia-a-dia.

A todo grupo que conheci e me acolheu na McGill University - Montreal, durante o período de estágio sanduíche no exterior. Em Especial aos Profs. Vilceu Bordignon, Hernan Baldassarre e Raj Duggavathi, e demais colegas Bernardo, Werner, Karina, Mariana, Vitor, Luke, Audrey, Ejimedo “Mado” e Yasmin.

As empresas parceiras que contribuíram e participaram em alguma etapa durante esse processo de formação. As Fazendas parceiras, sempre dispostos a discutir uma ideia e a colaborar com a ciência.

Agradeço a todos aqueles, que mesmo sem saber, serviram-me de exemplo algum dia, ao cruzar a minha estrada.

Aos órgãos de fomento, FAPERGS e CNPq pelo financiamento das pesquisas (Edital Pronex 12/2014), e à CAPES, pela bolsa de estudo e apoio financeiro.

“Paso corto, sueño largo...” (José Larralde)

Resumo

OLIVEIRA, Fernando Caetano de. **Mediadores inflamatórios e estradiol: regulação e efeitos sobre o trato reprodutivo de ruminantes**. 2018. 122f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Mediadores inflamatórios estão envolvidos no controle da reprodução em processos fisiológicos como ovulação e luteólise, bem como em processos patológicos, em resposta à lesões e/ou infecções. Em um primeiro estudo, objetivou-se comparar a resposta inflamatória em ovelhas submetidas à coleta de embrião transcervical (TC) ou por laparotomia (LP). Embora as técnicas não tenham diferido quanto à indução de marcadores inflamatórios, observou-se um aumento nos níveis de haptoglobina (D3 e D6), paraoxonase 1 (PON1; D3) e proteínas totais (D9) após as coletas. Conclui-se que ambos procedimentos induzem uma reação inflamatória, sendo a via TC indicada para animais com uma conformação cervical adequada, pois a técnica LP limita o número de procedimentos. Em um segundo estudo, investigou-se o efeito do tratamento com prostaglandina $F2\alpha$ (PGF) sobre marcadores de luteinização/ovulação e expressão gênica do endométrio. Observou-se a presença de RNAm do receptor de PGF (*PTGFR*) nas células da granulosa (CG) de folículos ao redor da divergência, sendo mais abundante no folículo dominante. Não se observou um efeito da PGF sobre o diâmetro folicular, níveis intrafoliculares de estradiol ou progesterona, bem como sobre a abundância de RNAm de enzimas esteroideogênicas nas CG. A PGF não foi capaz de induzir a ovulação em vacas suplementadas com progesterona e não afetou a expressão dos genes avaliados no endométrio. Além dos mediadores inflamatórios, hormônios esteroides são os principais reguladores das funções reprodutivas. Portanto, em um terceiro estudo, foram identificados genes diferentemente expressos nas células endometriais de vacas com diferentes níveis de estrógeno intrafolicular no proestro/estro como *PPARG* e *OTR*. Além disso, observou-se correlação positiva entre a abundância de RNAm de *IGFBP3*, *OTR*, *LTF* e *GREB1* e níveis de estradiol intrafoliculares. Para isolar o efeito do estradiol sobre as células epiteliais endometriais, foi utilizada uma linhagem celular. Após identificação dos receptores, o tratamento com estrógeno induziu um aumento (10 min) e posterior diminuição (15 e 30 min) na fosforilação da MAPK, sugerindo ativação da rota. A fosforilação da AKT diminuiu após (30 e 60 min) o tratamento com estrógeno. Observou-se menor expressão dos genes *CCND1* e *CCND2* e aumento na expressão de *PCNA* 12 h após o tratamento com estrógeno, indicando um efeito sobre o ciclo celular, o que foi confirmado através de um ensaio de proliferação. O presente estudo fornece subsídios para mensurar o impacto dos procedimentos de coleta de embriões sobre mediadores inflamatórios em ovelhas. Ainda, contraria a hipótese de que a PGF possui um efeito direto sobre as células foliculares. O modelo *in vitro* utilizado é apropriado para estudar os efeitos do estrógeno sobre as células epiteliais do endométrio bovino.

Palavras-chave: prostaglandina; ovulação; divergência folicular; ambiente uterino; epitélio endometrial.

Abstract

OLIVEIRA, Fernando Caetano de. **Inflammatory mediators and estradiol: regulation and effects on the reproductive tract of ruminants**. 2018. 122f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Inflammatory mediators are involved in the control of physiological reproductive processes such as ovulation and luteolysis, as well as pathological processes, in response to lesions and/or infections of the first study. The objective was to compare inflammatory responses in sheep submitted to embryo collection by transcervical (TC) or laparotomy (LP) route. Techniques did not differ in inducing inflammatory markers, but there was an increase in haptoglobin (D3 and D6), paraoxonase 1 (PON1; D3) and total protein (D9) influenced by the collection procedure. Thus, both procedures trigger inflammatory reaction and the TC pathway is indicated for animals with adequate cervical conformation, since the LP technique limits the number of procedures. In a second study, we evaluated the effect of treatment with prostaglandin F₂ α (PGF) on luteinization/ovulation markers and endometrial gene expression. The presence of PGF receptor mRNA (*PTGFR*) in the granulosa cells (CG) of follicles near to divergence was observed, being more abundant in the dominant follicle. There was no effect of PGF on follicle diameter, intrafollicular levels of estradiol or progesterone, and on the abundance of mRNA of steroidogenic enzymes in CG. PGF was not able to induce ovulation in cows supplemented with progesterone and did not affect the expression of the evaluated genes in the endometrium. Therefore, besides inflammatory mediators, steroid hormones are the main regulators of reproductive functions. In a third study, genes with distinct expression in the endometrial cells of cows were identified, with different levels of intrafollicular estrogen in proestrus/estrus, such as *PPARG* and *OTR*. In addition, a positive correlation was observed between the relative abundance of *IGFBP3*, *OTR*, *LTF* and *GREB1* mRNA and intrafollicular estradiol levels. A cell line culture was used to isolate the effect of estradiol on endometrial epithelial cells. After the identification of the estradiol receptor, treatment with estrogen induced an increase (10 min) and a subsequent decrease (15 and 30 min) in phosphorylation of the MAPK signaling pathway. The phosphorylation of the AKT route decreases after (30 and 60 min) estrogen treatment. There was a decrease in the expression of the *CCND1* and *CCND2* genes and an increase in the *PCNA* expression 12 h after estrogen treatment, indicating an effect on the cell cycle, which was confirmed by a proliferation assay. The present study provides subsidies to measure the impact of embryo collection procedures on inflammatory mediators in sheep. Furthermore, it contradicts the hypothesis that PGF has a direct effect on follicular cells. The tested in vitro model is appropriate to study the effects of estrogen on bovine endometrial epithelial cells.

Keywords: prostaglandin; ovulation; follicular divergence; uterine environment; endometrial epithelium.

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 Serum levels of haptoglobin, fibrinogen, paraoxonase 1 activity and total protein in ewes submitted to embryo collection. A, C, E and G: Comparisons between embryo collection methods; non-surgical transcervical (TC) and laparotomy (LP) (n = 5 ewes per group). B, D, F and H: Comparisons across periods regardless of the embryo collection method (n = 10 ewes). Blood samples were collected immediately before the procedures (D0) and 3, 6 and 9 days after. Error bars represent standard error. *Differences from D0 (P < 0.05)..... 36

Artigo 2

- Figura 1 Delineamento experimental para avaliação dos efeitos da PGF sobre o ambiente folicular pré-ovulatório na presença de progesterona exógena. BE: benzoato de estradiol; P4: progesterona; eCG: gonadotrofina coriônica equina (400UI); PGF: prostaglandina; US: avaliação ultrassonográfica..... 58
- Figura 2 Delineamento experimental para avaliação dos efeitos da PGF sobre o ambiente folicular na ausência de progesterona exógena (proestro/estro). BE: benzoato de estradiol; P4: dispositivo intravaginal de progesterona; PGF: prostaglandina; US: avaliação ultrassonográfica..... 59
- Figura 3 A) Expressão do receptor de PGF (*PTGFR*) nas células da granulosa de folículos dominantes (D) e subordinados (S) antes (Dia 2; n=4), durante (Dia 3; n=4) e após (Dia 4; n=6) a

	divergência folicular em bovinos. B) Expressão do receptor de <i>PTGFR</i> nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios 0, 3, 6, 12 e 24 h após tratamento com GnRH (n=5 por momento). *indica diferença estatística $P \leq 0,05$	60
Figura 4	Diâmetro folicular (mm) (A), crescimento folicular (mm/dia) (B) e concentração de progesterona no fluido folicular (ng/mL) (C) de vacas não tratadas (CONT) ou tratadas com PGF i.m. (PGF) na presença de progesterona exógena.....	61
Figura 5	Correlação entre os níveis de progesterona no fluido folicular e diâmetro folicular em vacas na presença de progesterona exógena.....	62
Figura 6	Abundância relativa de RNAm dos genes <i>CYP19A1</i> e <i>HSD3B1</i> nas células da granulosa em vacas não tratadas (CONT) ou tratadas com PGF i.m. (PGF) na presença de progesterona exógena.....	63
Figura 7	Diâmetro folicular (mm) no D11 (A), taxa de crescimento folicular diário (mm/dia) (B) e concentração de estrógeno no fluido folicular (ng/mL) (C) de vacas não tratadas (CONT) ou tratadas com PGF i.m. (PGF) na ausência de progesterona exógena (proestro/estro).....	64
Figura 8	Abundância relativa de RNAm das células endometriais coletadas por biópsia de vacas não tratadas (CONT) ou tratadas com PGF i.m. (PGF) na ausência de progesterona exógena (proestro/estro).....	65

Artigo 3

Figura 1	Figura 1: Abundância relativa do RNAm dos genes <i>PTGS2</i> (A), <i>OTR</i> (B) e <i>PPARG</i> (C) nas amostras de biópsia endometrial durante o proestro/estro, em animais selecionados de acordo com a concentração intrafolicular de estradiol (alta ou baixa).....	93
----------	---	----

Figura 2	Figura 2: Correlação entre o nível intrafolicular de estradiol* e a abundância relativa dos genes, em amostras de biopsia endometrial coletadas durante o proestro/estro de bovinos. *Transformada para escala logarítmica.....	94
Figura 3	Figura 3: Relação das proteínas fosforiladas (p-) e totais (t-) provenientes de células de epitélio endometrial bovino (BEnEpC) após tratamento com 0, 20 e 200 pg/mL de estradiol. A, D, G, J e N: relação pSTAT3/tSTAT3 aos 5, 10, 15, 30 e 60 min, respectivamente. B, E, H, L, O: relação pAKT/tAKT aos 5, 10, 15, 30 e 60 min, respectivamente. C, F, I, M, P: relação pMAPK/tMAPK aos 5, 10, 15, 30 e 60 min, respectivamente. A,B,C Expoentes distintos indicam diferença estatística $P \leq 0,05$	95
Figura 4	Figura 4: Abundância relativa dos genes que demonstraram regulação ao tratamento com estrógeno nas horas 6, 12 e 24 após o tratamento, em cultivo de células de epitélio endometrial bovino (BEnEpC). A,B Expoentes distintos indicam diferença estatística $P \leq 0,05$	96
Figura 5	Relação das proteínas fosforiladas (p-) e totais (t-), seguidas dos imunoblots representativos, para os tratamentos com 0 e 200 pg/mL de estradiol sobre cultivo de células de epitélio endometrial bovino (BEnEpC). AKT em 6 (A) e 24 horas (B). MAPK em 6 (C) e 24 horas (D). STAT3 em 6 (E) e 24 horas (F)....	97
Figura 6	Teste de redução do MTS tetrazolium (CellTiter 96®) avaliado pela absorvância em 492 nm. A: Correlação entre o número conhecido de células e a absorvância para avaliação da eficiência do teste. B: avaliação da redução do MTS pelo cultivo celular de epitélio endometrial bovino, com diferentes doses de estradiol mantidas por 72 h. A,B Expoentes distintos indicam diferença estatística $P \leq 0,05$	98

Lista de Tabelas

Artigo 2

Tabela 1	Genes e sequências de iniciadores utilizados no estudo.....	57
----------	---	----

Artigo 3

Tabela 1	Sequência de primers usada para análise de expressão gênica, específicos para <i>Bos taurus taurus</i>	92
----------	--	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

PGF	Prostaglandina F2 α
PTGFR	Receptor de prostaglandina F
P4	Progesterona
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IGFBPs	Proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
E2	Estradiol
CL	Corpo lúteo
LHCGR	Recptor de hormônio luteinizante ligado a proteína G
CG	Células da granulosa
FNT- α	Fator de necrose tumoral alfa
IFN- γ	Interferon gama
ILs	Interleucinas
IL-1R	Receptor de Interleucina 1
PGE	Prostaglandina E
MMPs	Metaloproteinases de matriz
PGT	Transportador de Prostaglandina
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
MAP	Medroxiprogesterona
EGF	Fator de crescimento epidermal

MAPK	Proteína kinase ativada por mitogeno
RAS	Sistema renina-angiotensina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
CCO	Complexo cumulus ovócito
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
BE	Benzoato de estradiol
TC	Transcervical
LP	Laparotomia
ER	Embryo recovery
i.m.	Intramuscular
MOET	Ovulação múltipla para transferência de embriões
n	Número
SOV	Superovulação
mg/Kg	Miligramas por quilogramas
IU	Unidade internacional
I.V.	Intravenoso
µg	Microgramas
HAP	Haptoglobina
FIB	Fibrinogênio
PON1	Paraoxonase 1
TP	Proteína total
APP	Proteínas de fase aguda
g/L	Gramas por litro
SAA	Amilóide sérico A
mg/dL	Miligramas por decilitros
mm	Milímetros

h	Horas
DIV	Dispositivo intravaginal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
MHz	Mega-hertz
OPU	Punção de ovócitos
PBS	Buffer salina fosfato
r.p.m	Rotações por minuto
ng/mL	Nanogramas por mililitro
US	Ultrassom
MTS	Tetrazolium
pg/mL	Picogramas por mililitro
BEnEpC	Bovine endometrial epithelial cells
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
min	Minutos
WB	Western blotting
AKT	Proteína kinase B
STAT3	Sinal de transdução e ativação da transcrição 3
ESR1	Receptor de estradiol tipo 1
FGF2	Fator de crescimento fibroblástico tipo 2
G	Força G
SEM	Erro padrão da média
ESR2	Receptor de estradiol tipo 2

Sumário

1 Introdução.....	17
2 Revisão de literatura.....	20
2.1 Período periovulatório.....	20
2.2 Mediadores inflamatórios.....	22
2.3 Prostaglandinas no período periovulatório.....	24
2.4 Ação e importância do estrogênio.....	26
3 Artigos.....	29
3.1 Artigo 1.....	29
3.2 Artigo 2.....	37
3.3 Artigo 3.....	66
4 Considerações finais.....	99
5 Referências.....	100
Anexos.....	119

1 Introdução

A crescente demanda mercadológica por produtos originários da atividade agropecuária, exige do sistema um incremento nos índices reprodutivos e produtivos, porém respeitando o bem-estar animal. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo (Cook, 2016), porém é só o segundo maior em produção de carne bovina (Cook, 2015), produzindo anualmente 15,43% da carne bovina mundial. Visando um aproveitamento mais efetivo da área explorada e a melhoria dos manejos relacionados às técnicas reprodutivas, se propõe evoluir no conhecimento quanto às características e resposta fisiológica aos procedimentos, objetivando a melhoria das técnicas reprodutivas já difundidas. Neste sentido, uma das possibilidades para mensurar o impacto das técnicas de multiplicação genética que requerem procedimentos invasivos acentuado é a avaliação de marcadores de resposta inflamatória (Chastant-Maillard et al., 2003).

Na medida em que os rebanhos bovinos e ovinos são mais exigidos produtivamente, problemas de infertilidade se tornam mais frequentes. As causas de infertilidade podem estar relacionadas à falhas na ovulação (López-Gatius et al., 2005; Wiltbank et al., 2002) e na fertilização (Sartori et al., 2002), a um ambiente uterino inadequado (Gani et al., 2008), à distúrbios no reconhecimento materno da gestação (Madsen et al., 2015), a uma função luteal insuficiente (Kimura et al., 1987), entre outros. Em especial, trabalhando com rebanhos de atividade leiteira, estas manifestações de infertilidade são associadas com a redução na longevidade de vacas, resultando em perdas econômicas relevantes (Lucy, 2001).

Mediadores inflamatórios atuam em processos relacionados a importantes funções no organismo, com foco no sistema reprodutivo, podemos citar a prostaglandina F_{2α} (PGF) como um importante mediador inflamatório (Basu, 2010) atuando durante o processo de luteólise (Silvia et al., 1991), processo ovulatório (Iesaka et al., 1975) e sobre o útero (Blesson e Sahlin, 2014; Haimeri et al., 2013). Agindo também sobre a involução uterina, e como adjuvante para tratamento de endometrite puerperal (Melendez et al., 2004), resultando em posterior incremento na expressão de estro e prenhez em bovinos (Archbald et al., 1994). Os mediadores

inflamatórios também são estudados por sua função na resposta do organismo, a procedimentos invasivos necessários a realização de biotécnicas, sendo alguns considerados marcadores de desconforto como haptoglobina, paraoxonase 1 e fibrinogênio (Ceciliani et al., 2012; Fazio et al., 2015). Além desses mediadores, o estrogênio parece possuir uma importante regulação sobre o ambiente folicular e uterino, seus níveis durante o proestro/estro estão sendo associados a fertilidade (Peres et al., 2009), sendo a duração do proestro, a expressão de estro, e a duração da dominância folicular, relacionados com a fertilidade e funções endócrinas em bovinos (Austin et al., 1999; Bridges et al., 2010). A suplementação exógena, foi relatada reestabelecendo a expressão de *EGF* no endométrio, e a fertilidade conseqüentemente (Katagiri e Moriyoshi, 2013; Katagiri e Takahashi, 2006). Com isso, ressaltamos importantes ocorrências observadas sobre os mediadores inflamatórios, sua importância como resposta do organismo, e sua regulação quando suplementado exógeno sobre processos reprodutivos. Além disso, identificamos uma relação entre a fase estrogênica e o ambiente uterino, porém, sem conhecimento dos mecanismos e fatores envolvidos.

Objetivo Geral

Avaliar a regulação e os efeitos de mediadores inflamatórios e do estradiol durante o período periovulatório e luteal inicial sobre o trato reprodutivo de ruminantes.

Objetivos Específicos

- 1) Comparar o efeito de diferentes técnicas de coleta de embriões sobre a indução de mediadores inflamatórios em ovelhas;
- 2) Avaliar os efeitos do tratamento com PGF intramuscular sobre o ambiente folicular em vacas suplementadas ou não com progesterona (proestro/estro);
- 3) Investigar a presença e a regulação da expressão do receptor de PGF (*PTGFR*) nas células da granulosa em folículos bovinos em diferentes fases de desenvolvimento;
- 4) Avaliar o efeito da PGF sobre o ambiente uterino quando aplicada durante o proestro;

5) Avaliar a associação entre os níveis de estradiol intrafolicular durante o proestro/estro e expressão de RNAm nas células endometriais em bovinos;

6) Validar o modelo de cultivo de células do epitélio endometrial bovino para estudo dos efeitos do estradiol;

7) Avaliar o efeito do estradiol sobre cultivo de células de epitélio endometrial, em nível molecular;

2 Revisão da Literatura

2.1 Período periovulatório

O ciclo estral nas espécies domésticas compreende uma fase folicular e uma fase lútea, ou fase estrogênica e progesterônica, respectivamente. Consideramos período periovulatório, como sendo composto pelo proestro, estro, metaestro e diestro inicial. O início da transição entre estes momentos se dá pelo processo de luteólise, ovulação e luteogênese, quando ocorre uma transformação das células da teca e da granulosa, que começam a produzir P4 (Luque et al., 1983). A regulação neuroendócrina destes eventos compreende a liberação de GnRH pelo hipotálamo, do FSH e do LH pela hipófise anterior, e a síntese dos esteroides gonadais (estradiol e progesterona). Além da regulação endócrina, fatores locais influenciam a função ovariana, como os membros da superfamília TGF- β (Kingsley, 1994; Knight e Glistler, 2006), inibina, ativina e folistatina (Findlay, 1993), que exercem diversas funções durante a foliculogênese, atresia folicular e luteogênese.

Fatores metabólicos sistêmicos também possuem uma importante função, através da interação nutrição e reprodução. Estes fatores são produzidos em outros órgãos ou localmente, nos órgãos reprodutivos, e exercem funções na determinação do destino das estruturas ovarianas. Fatores como o IGF1 e IGFbps (Silva et al., 2009), colesterol (Ruas et al., 2000), leptina (Williams et al., 2002) e insulina (Butler, 2000) são conhecidos pelos efeitos sobre os eventos reprodutivos. Fatores ambientais externos também influenciam a função ovariana, através de neurônios (catecolaminérgicos e opioidérgicos) que processam as informações do meio externo (luz, temperatura, odores e interações sociais) e interno (concentração de esteroides), convergindo sobre os neurônios hipotalâmicos para regular suas funções (Kalra e Kalra, 1984).

O eixo hipotálamo/hipófise/gônadas é regulado pela interação dos diversos fatores supracitados. Porém, a secreção das gonadotrofinas hipofisárias (LH e FSH), a partir da liberação hipotalâmica do GnRH, é o principal mecanismo de regulação das funções gonadais, e suas principais ações acontecem durante o período periovulatório. Os esteroides ovarianos também possuem uma importante atuação

na regulação na secreção de LH e FSH, através de mecanismos de retroalimentação (Thomas et al., 1988). A queda nas concentrações de P4 na presença de altas concentrações de E2 elimina o efeito de retroalimentação negativa sobre a liberação das gonadotrofinas hipofisárias, aumentando a frequência das descargas de LH (Schams, 1986). Já a regulação do FSH está mais relacionada aos níveis de estrógeno e inibina circulantes (Findlay, 1993).

O grau de desenvolvimento do folículo no momento da luteólise, caracterizada pela lise do CL e pelo decréscimo na concentração de P4 circulante, determina o tempo necessário até que este folículo complete o seu crescimento, e sua maturação, sendo capaz de produzir quantidades suficientes de E2 para desencadear o estro, a onda pré-ovulatória de LH e a ovulação (Ireland e Roche, 1982). Estes processos iniciam com a expressão de *LHCGR*, nas células da granulosa (CG), com maior expressão observada em folículos a partir de 9mm (Gasperin et al., 2015), sendo que, em vacas *Bos taurus taurus* a partir de 12mm de diâmetro, 95% dos folículos dominantes respondem ao LH (Sartori et al., 2001b).

A P4 produzida pelo CL inibe a liberação de LH, que é secretado em pulsos de baixa frequência e de grande amplitude durante a fase lútea (Rahe et al., 1980). Quando ocorre a luteólise, a concentração de P4 sérica diminui e os pulsos de LH aumentam. Dessa forma, ocorre estímulo à produção de andrógenos nas células da teca, os quais são convertidos em E2 nas células da granulosa (Komar et al., 2001). O E2 estimula a secreção de pulsos de LH de alta frequência, porém com baixa amplitude (Karsch, 1987), levando a um pico de LH que culmina na ovulação. Apenas os folículos dominantes selecionados em um ambiente com progesterona decrescente serão responsivos ao LH, tornando-se aptos a ovular.

O período periovulatório, associado a dinâmica hormonal que ocorre, exerce uma importante modulação sobre o ambiente folicular e uterino. Porém, especificamente não se conhece os mecanismos de ação e as prováveis interações hormonais deste período, capazes de impactar na capacidade reprodutiva. Estudos que buscam evoluir no conhecimento da ação dos mediadores inflamatórios e do estrógeno sobre o trato reprodutivo em ruminantes domésticos, podem identificar pontos chaves para o aumento dos índices reprodutivos, os quais poderiam ser manipulados em protocolos de indução e sincronização de estro e ovulação.

2.2 Mediadores inflamatórios

Durante o processo inflamatório, eventos hemodinâmicos ocorrem através de uma vasodilatação e aumento no fluxo sanguíneo local, assim como da permeabilidade capilar e a liberação de fatores leucocitários. Estes eventos que caracterizam as alterações do processo inflamatório são mediados principalmente por eicosanoides (prostaglandinas) (Dennis e Norris, 2015; Ke et al., 2017), citocinas pro-inflamatórias (FNT- α ; IFN-gama; IL-1; IL-6; IL-8) (Gruys et al., 2005) e pela diminuição de fatores com atividade anti-inflamatória (antagonista IL-1R; proteínas de ligação ao FNT- α ; proteínas de ligação a IL-1).

Dentre os mediadores inflamatórios, também se encontram as proteínas de fase aguda, uma classe de proteínas que respondem ao processo inflamatório positivamente (proteínas de fase aguda positivas) e negativamente (proteínas de fase aguda negativa) (Ceciliani et al., 2012). A resposta local a uma injúria, é mediada inicialmente por células inflamatórias locais (neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos), que secretam citocinas pro-inflamatórias (revisado por Turner, 2014). Após a reação local, há uma resposta hepática, produzindo as proteínas reagentes de fase aguda positivas e negativas (Bionaz et al., 2007).

A haptoglobina e o fibrinogênio são considerados proteínas de fase aguda positivas, e são regulados em processos inflamatórios e em resposta a um distúrbio hemodinâmico do organismo (Gruys et al., 2005). A paraoxonase 1 é considerada uma proteína de fase aguda negativa, pois seus níveis diminuem em resposta a um estímulo (Schneider et al., 2013). Estas proteínas de fase aguda positiva e negativa, podem servir como marcadores de um processo inflamatório, dor ou desconforto (Ceciliani et al., 2012; Eckersall, 2000; Fazio et al., 2015). Independente do mecanismo de ação e das interações como mediadores, estas proteínas possuem uma relação com processos reprodutivos.

2.2.1 Mediadores inflamatórios na reprodução

Um dos principais eventos reprodutivos, tido como um processo inflamatório, é a ovulação (Espey et al., 2003). O processo ovulatório é tido como um evento inflamatório local, ocasionando o rompimento do folículo pré-ovulatório e liberação do ovócito. A ovulação em ruminantes domésticos, é um processo mediado pela prostaglandina E (PGE), PGF, interleucinas (IL-1, IL-4, IL-6, e IL-8), FNT- α , além de proteases, collagenases e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Espey e Richards,

2006). A ovulação envolve três processos biológicos distintos, sendo o reinício da maturação nuclear do ovócito (Mermillod et al., 1999), remodelamento de matriz extracelular do folículo, que permite a sua ruptura (Goldman e Shalev, 2004) e a modificação morfo-bioquímica e espacial das células da granulosa e teca, que se transformam em células luteais (Priedkalns et al., 1968).

Assim como na ovulação, o FNT- α e seu receptor estão presentes no CL inicial em bovinos (Sakumoto et al., 2000), induzindo proliferação celular neste período (Petroff et al., 1999). Porém o FNT- α pode induzir a morte, dependendo em qual receptor ocorre a ligação (TNFRI ou TNFRII) (Boldin et al., 1995; Hsu et al., 1995). A complexidade dos mediadores inflamatórios, e suas distintas regulações, trazem também um efeito durante o processo de luteólise. A luteólise funcional que caracteriza o início do proestro, ocorre através da PGF e é regulada pelos mediadores FNT- α , IL-1 β e IFN-gama (Neuvians et al., 2004; Skarzynski et al., 2005). As prostaglandinas (PGF e PGE), seus receptores (EP2, EP3 e FP) e seu transportador (PGT), também estão presente durante a vida funcional do CL, e agem como mediadores na autorregulação da função luteal (Arosh et al., 2004).

Além do processo de luteólise, as prostaglandinas também são associadas a processos inflamatórios em diversos tecidos. A produção de PGF possui um efeito regulatório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1) e fatores de crescimento, tanto em modelos *in vitro* como em modelos *in vivo* (Kawano et al., 2001; Raz et al., 1988). Como uma molécula pró-inflamatória, a PGF estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, nas células epiteliais e de estroma do endométrio, diminuindo os efeitos imunossupressores da P4, através do aumento da atividade fagocítica dos neutrófilos (Lewis, 2004). Segundo Lewis (2004), os eicosanoides (PGE e PGF) atuam promovendo as defesas imunitárias e a saúde uterina em bovinos, inclusive seus análogos comerciais. A PGF é considerada um importante mediador inflamatório no período periparturiente, tendo sua secreção aumentada neste período, podendo contribuir com a defesa imune do útero (Singh et al., 2008).

Além dos eicosanoides, o estrógeno causa um efeito similar sobre o útero, estimulando fatores pró-inflamatórios e imunológicos locais, regulando estes processos nas células de estroma endometrial e efeitos de proliferação e diferenciação (Tibbetts et al., 1999). O aumento destes efeitos, está relacionado as mudanças hemodinâmicas ocasionadas pelo estradiol, similares a um processo

inflamatório, regulando citocinas (IL-11 e IL-15) sobre células de estroma uterino e estimulando proliferação e diferenciação (Dimitriadis et al., 2002; Dunn et al., 2002). A função do sistema imunológico no ambiente uterino é importante, visto que a preparação do ambiente para o recebimento do embrião é fundamental para o processo reprodutivo, e o estrógeno parece ter um papel importante.

2.3 Prostaglandinas no período periovulatório

Embora as prostaglandinas (PGs) sejam frequentemente comparadas aos hormônios, estas são formadas em quase todos os tecidos e não em glândulas especializadas. Além disso, as prostaglandinas geralmente agem localmente, ao invés de serem transportadas pelo sangue até as células-alvo (Jee e Ma, 1997). Apresentam meia-vida plasmática muito curta (Ferreira e Vane, 1967), sendo metabolizadas principalmente nos pulmões, em geral em sua primeira passagem. As PGs são compostos extremamente potentes, que desencadeiam uma ampla faixa de respostas fisiológicas, estando presentes na forma de compostos relacionados com numerosos metabólitos, exibindo grande variedade de efeitos farmacológicos (Sudo-Hashai, 2010). O ácido araquidônico é o precursor das PGs associadas com processos reprodutivos, como a PGF e a PGE, através de três rotas de biossíntese (Murdoch et al., 1993): via da ciclo-oxigenase ou prostaglandina G/H sintase (PTGS1 e PTGS2); via da lipoxigenase; e via da epoxigenase (Sugimoto et al., 2014).

As prostaglandinas parecem ter efeitos sobre o crescimento folicular em bovinos (Leonardi et al., 2012) mediando a ação das gonadotrofinas durante o período periovulatório (Fortune et al., 2009), apesar destas rotas de ação serem desconhecidas. A PGF exógena possui capacidade de aumentar a resposta ovariana gerada pela liberação de GnRH/LH na vaca, no período pós-parto (Randel et al., 1996), enquanto as prostaglandinas endógenas, produzidas pelo folículo ovulatório, possuem papel importante na ovulação (Murdoch et al., 1983). Em ovelhas, o bloqueio com indometacina intrafolicular impede a ovulação, porém sem afetar a luteinização e a produção de P4 (Murdoch e Dunn, 1983). A aplicação de PGF em ovelhas em anestro suplementadas com medroxiprogesterona (MAP), resultou em estímulo à ovulação, com efeito local no ovário, especificamente sobre a ruptura do folículo, já que a produção subsequente de P4 foi afetada (Davies et al., 2006).

Em função de uma resposta fisiológica ao pico de LH, folículos pré-ovulatórios de bovinos apresentam a expressão da enzima PTGS2 aumentada (Liu et al., 1997), resultando em aumento nas concentrações intra-foliculares de PGE e PGF, 24 horas após o estro (Liu et al., 1997), as quais diminuem significativamente após a ruptura do estigma ovulatório (Espey et al., 1991). Fortune et al. (2009) trabalhando com cultivos de células da granulosa, descreveram uma ação de estímulo da PGF sobre a expressão da protease ADAM17, que está relacionada à rota de ovulação induzida pelo LH. Segundo Park et al. (2004), a enzima PTGS2 também está envolvida com a cascata de fatores semelhantes ao EGF, na qual a ativação do receptor EGFR induz um aumento da expressão de *PTGS2* no período pré-ovulatório.

A fosforilação da MAPK nas células da granulosa também é um evento importante para o processo de ovulação, sendo essencial em mamíferos (Fan et al., 2009), sua fosforilação possui o EGF como mediador ativado pelo pico de LH. Panigone et al. (2008) trabalhando com camundongos *knockout* para EGFR, demonstraram a rápida transativação estimulada pelo LH em folículo pré-ovulatório, que é essencial para a ovulação. Porém, quando foi feita a ablação do EGFR, não houve bloqueio completo da fosforilação de MAPK, indicando que podem haver rotas de ativação alternativas como o sistema renina-angiotensina (RAS) (Ferreira et al., 2007; Gonçalves et al., 2012) e outros meios possíveis para fosforilação da MAPK. A angiotensina II demonstrou uma correlação com a síntese de PGF2 α em cultivos *in vitro* de CG (Acosta et al., 1999).

A PGE possui efeitos similares ao LH, pela mediação de células da teca e granulosa (Richards, 1994). Em ovinos, há um aumento no acúmulo de PGE e PGF no interior do folículo destinado a ovular, que é mediado por AMPc (Murdoch et al., 1981). Através de alterações do AMPc, o pico de LH desloca a esteroidogênese no folículo ovulatório (Stocco, 2008). O nível de AMPc se eleva na parede do folículo, 4 h após o pico de LH, permanecendo elevado durante 12 h, declinando após 16 - 20 h (Brännström et al., 1987; Murdoch et al., 1981). Em ovinos, as concentrações de PGE e PGF2 α no fluido folicular não são moduladas pelo pico de LH (Murdoch et al., 1981; Murdoch et al., 1983). Porém, a ovulação foi bloqueada quando aplicado indometacina, que também bloqueia a ovulação em porcas, vacas e éguas (Ainsworth et al., 1989; Algire et al., 1992; Mori et al., 1980a).

Foi demonstrado que a PGF pode ser utilizada em protocolos de IATF como indutor de ovulação, sem o uso esteroides com esta finalidade, permitindo a obtenção de índices reprodutivos semelhantes aos observados em vacas que receberam estrógeno como indutor de ovulação (Pfeifer et al., 2014). Em vacas quando a PGF foi aplicada no momento da inseminação artificial, resultou em aumento nos índices de prenhez (Ambrose et al., 2015). Estes relatos, indicam que a PGF possui ação no período periovulatório em vacas. Entretanto, até o presente momento não foram realizados estudos para determinar o mecanismo de ação da PGF neste processo. O melhor entendimento das vias de atuação, sejam elas endócrinas ou locais, será de grande importância para que se explore de forma mais precisa as funções da PGF.

2.4 Ação e importância do estrógeno

O período periovulatório é caracterizado por uma intensa interação entre eventos uterinos e ovarianos, compreendendo o período de proestro, estro e metaestro. Em bovinos, estes eventos ocorrem em um período de cerca de 3-5 dias, desde a luteólise funcional, no início do proestro, até os processos de ovulação e luteogênese no metaestro. Em grande parte deste período periovulatório, há predominância da fase estrogênica do ciclo estral. Um proestro prolongado, pode ter reflexos positivos sobre o desempenho reprodutivo subsequente, em função de que os elevados níveis séricos de estrógeno podem promover melhor expressão de estro, especialmente em protocolos de IATF (Carvalho et al., 2008). A suplementação exógena de estrógenos pode resultar em incremento na fertilidade (Peres et al., 2009). Porém, os mecanismos que podem levar a esses efeitos, nos ambientes do útero e do oviduto ou no ambiente folicular, ainda não são totalmente esclarecidos (Binelli et al., 2014; Dadarwal et al., 2013). Associações entre a duração do proestro, a expressão de estro, e a duração da dominância folicular, foram relacionados com a fertilidade e funções endócrinas em vacas (Bridges et al., 2010) e em novilhas (Austin et al., 1999).

Os níveis de estradiol durante o proestro e estro parecem influenciar a função folicular e, principalmente, o ambiente uterino. A expressão de estro influencia positivamente as taxas reprodutivas e reduz as perdas gestacionais precoces, em vacas lactando, que foram inseminadas ou inovuladas com embriões, o que sugere um efeito em nível uterino (Pereira et al., 2016). Por outro lado, níveis inadequados

de estrógeno durante o estro, foram detectados em vacas leiteiras de alta produção repetidoras de serviço, que tinham a expressão de EGF endometrial afetada (Katagiri e Moriyoshi, 2013). A alteração na expressão de EGF foi restaurada após a suplementação exógena de estradiol, o que repercutiu em um aumento na taxa de prenhez (Katagiri e Takahashi, 2006). Estes fatos, sugerem uma relação entre o estrógeno e a rota do EGF, embora esta hipótese não tenha sido investigada.

Madsen et al. (2015), trabalhando com uma dosagem conhecida de estradiol em vacas ovariectomizadas, descreveram o efeito do E2 no proestro sobre o reconhecimento materno da gestação, e a sobrevivência embrionária a partir do sétimo dia, quando os animais receberam um embrião. Outros estudos também demonstraram que o estradiol periovulatório exerce uma importante regulação sobre o endométrio no dia 7, quando o embrião se encontra no útero (Mesquita et al., 2015; Sá Filho et al., 2017), e no dia 15, quando ocorre o reconhecimento embriomaterno (Mitko et al., 2008). A característica da fase estrogênica (intensidade e duração) e a expressão do estro, também afetaram o ambiente uterino no dia 19 do ciclo estral (Davoodi et al., 2016). Além do efeito do perfil endócrino (Mesquita et al., 2015), o próprio embrião também tem influência na expressão gênica das células endometriais (Sponchiado et al., 2017), modulando o ambiente uterino.

Dentre as principais modulações, se observa um efeito das concentrações de estradiol sobre expressões gênicas no endométrio. Se observa um efeito sobre *OTR*, que atua no reconhecimento embrio-materno, e na mediação do efeito da ocitocina durante o processo de luteólise em bovinos (Amico et al., 2002). O estradiol atua sobre o ambiente endometrial, regulando genes relacionados a homeostase (*AQP4*, *SLC2A1*), proliferação celular (*COL4A1*, *EGFR*, *GREB*, *CCND1*, *CCND2*) e nutrição celular (*IGFBP-3*, *IGFBP-4*, *SLC2A1*), estimulando estes efeitos, que se traduzem em proliferação celular. Este genes, são tidos como candidatos para avaliação dos efeitos do estradiol sobre o endométrio de bovinos, assim como sobre cultivos celulares.

Estudos *in vivo*, demonstraram uma correlação entre o período da fase estrogênica (proestro e estro), com a concentração do EGF em tecido endometrial, coletado por biopsia (Katagiri e Takahashi, 2004). Em vacas repetidoras, com baixa expressão do EGF no endométrio, a dose de 5 mg de benzoato de estradiol (BE) reestabeleceu a expressão (Katagiri e Moriyoshi, 2013). No entanto, com doses menores de BE (1 mg), como as normalmente usadas em protocolos de IATF (Sa

Filho et al., 2014), não foi observado efeito sobre o EGF (Katagiri e Moriyoshi, 2013). A regulação da expressão das células endometriais pelo estrógeno mostra um efeito sobre o ambiente uterino em bovinos, que pode ter uma relativa contribuição para a fertilidade na espécie. Protocolos que utilizam altas doses de estrógeno, a fim de mimetizar o período final da gestação e induzir lactação artificial sem a necessidade de gestação, demonstram que uma parcela significativa (40-70%) de vacas repetidoras retomam a fertilidade após a conclusão do protocolo, alcançando desempenho reprodutivo similar ao de vacas sem histórico de problemas (revisado por Pestano et al. (2017). Como estes protocolos envolvem longos períodos de exposição ao estradiol, ocorre um efeito intenso sobre o trato reprodutivo da vaca, tanto no útero como no ovário.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection

Oliveira, F.C.; Haas, C.S.; Ferreira, C.E.R.; Goularte, K. L.; Pegoraro, L.M.C.; Gasperin, B.G.; Schneider, A.; Mondadori, R.G.; Lucia Jr., T.; Vieira, A.D.

Artigo publicado na Revista *Small Ruminant Research*, Vol 158, p. 15-18, 2018.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.11.012>

Recebido em 18 de agosto de 2017. Aceito em 22 de novembro de 2017. Publicado online 23 de novembro de 2017.

Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection

Oliveira, F.C.¹; Haas, C.S.¹; Ferreira, C.E.R.¹; Goularte, K. L.¹; Pegoraro, L.M.C.²; Gasperin, B.G.¹; Schneider, A.¹;

Mondadori, R.G.¹; Lucia Jr., T.^{1*}; Vieira, A.D.¹

¹ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Capão do Leão-RS, Brasil.

²Embrapa Clima Temperado, Pelotas-RS. *Author for correspondence: tluciajr@gmail.com

ABSTRACT: The techniques currently available for embryo collection in sheep include surgical (laparotomy; LP) and transcervical (TC) methods. Although both methods are well established, there is no data about the levels of inflammatory markers in ewes after using such procedures. The objective of this study was to compare the systemic reaction to inflammation in ewes submitted to superovulation and embryo collection through LP or TC methods. Blood samples were collected before each procedure (at D0) and at 3, 6 and 9 days after procedures to determine the levels of total protein, haptoglobin, fibrinogen and paraoxonase 1. The levels of inflammatory markers did not differ ($P > 0.05$) between methods. Serum levels of haptoglobin and total protein and paraoxonase 1 activity increased after D0 ($P < 0.05$) for ewes submitted to both methods. In conclusion, although TC is a less invasive embryo collection method compared to LP, both methods induced similar inflammatory response over time.

Keywords: acute phase proteins; animal welfare; superovulation; embryo transfer; sheep.

1. Introduction

Due to the difficulties on cervical transposition, surgical collection through laparotomy (LP) is the most commonly used method for embryo recovery in ewes (Tervit and Havik, 1976). Although LP is efficient, allowing high embryo recovery (ER) rates, it invariably induces adhesions in reproductive organs, compromising subsequent fertility and limiting the number of future procedures to be conducted in embryo donor ewes.

Alternatively, nonsurgical transcervical (TC) procedures were established based on induction of cervical dilatation (Gusmão et al., 2009; Masoudi et al., 2012) allowing cervical transposition in a greater number of ewes, reducing the occurrence of undesirable sequels. However, there is no information regarding the systemic reactions caused by any of such procedures. This study aimed to determine the impact of using LP or TC methods for embryo recovery in ewes on the levels of inflammatory markers such as haptoglobin, fibrinogen, paraoxonase 1 and total protein.

2. Material and methods

All procedures were approved by the UFPE's Ethics in Animal Experimentation Committee.

Multiparous Crioula Lanada ewes were pre-synchronized, so they could be classified according to the ability of transposing their cervix during the estrus and diestrus periods of the breeding season (31°48'19.21"S - 52°24'44.53"W). In that trial, three cervical dilatation protocols were tested with administration of: a) sub-aracnoid ketamine (DeRossi et al., 2009), b) intravaginal misoprostol (Prostokos, Hebron) as prostaglandin E analog (Gusmão et al., 2009) and c) estradiol + oxytocin (Masoudi et al., 2012), modified by using estradiol benzoate via IM. It was used the methodology based on traction and fixation of the cervix with Pozzi tweezers and the cervical transposition with Hegar n°2 uterine dilator (Gusmão et al., 2009). The estradiol/oxytocin protocol provided the most satisfactory results (data not shown). Twenty days later, two groups of ewes (n = 5 each) selected as candidates for either the TC or LP procedures were submitted to a protocol of multiple ovulation and embryo transfer (MOET), as described by Menchaca et al. (2009), with modifications: 200mg of pFSH (Folltropin V, Bioniche) were used for superovulation (SOV); 75 µg of D-cloprostenol (PGF analogue - Veteglan®, Calier) and 25 µg lecorelin (GnRH analogue, Gestran, Tecnopec) were administered to induce luteolysis and ovulation, respectively. Estrous behavior was assessed twice a day after PGF, using a teaser. After finishing the pFSH treatment at the time of estrus detection (at D-6), a dose of GnRH analog was administered, followed by cervical artificial insemination 12 and 24 h later, using fresh semen.

Ewes to be submitted to LP were fasted from food and water at D-1. At D0, prior the LP procedure (Candappa and Bartlewski, 2014), ewes were anesthetized with 0.2 mg/kg b.w. of xylazine i.m. (Anasedan, Ceva), followed by 5 mg/kg b.w. of ketamine i.v. (Dopalen, Vetbrands).

Ewes to be submitted to TC received 100 µg of estradiol benzoate i.m. (Gonadiol, Zoetis) at D-1 and 100 IU oxytocin i.m. (Placentex, Agener União) at D0. Ten min later, ewes were submitted to embryo collection by TC technique (Gusmão et al., 2009), as described above.

The time spent to perform each procedure was registered. At D0, a few minutes before the execution of both embryo recovery procedures, blood samples were collected from all ewes, from the jugular vein, in tubes with and without anticoagulant to determine basal levels of haptoglobin (HAP), fibrinogen (FIB), paraoxonase 1 (PON1) and total proteins (TP). To assess the levels of inflammatory markers, samples were also collected at D3, D6 and D9. At D9, after the last blood collection, the number of corpus luteum (CL) in ewes submitted to TC embryo collection was assessed by laparoscopy, to determine the embryo recovery rates.

The HAP levels were determined based on its ability to bind to hemoglobin using the guaiacol method (Bastos et al., 2011). Fibrinogen levels were determined through heat-precipitation (Lowe et al., 2004), PON1 arylesterase activity was determined by spectrophotometry (Browne et al., 2007). The TP concentration was determined by refractometry.

The time necessary for each procedure was compared between treatments through a two-sample t test. The levels of inflammatory markers were compared across treatments, periods of blood collection and their interactions using ANOVA with repeated measures, adjusted for the individual effects of the ewes (SAS).

3. Results and discussion

Both embryo recovery procedures required similar periods to be conducted ($P > 0.05$): 28.4 ± 1.0 min for LP; and 26.0 ± 3.0 min for TC. Embryo recovery rates (structures/CL) were 71.4% (35/49) and 69.2% (18/26) for LP and TC, respectively. In each treatment, one ewe did not respond to SOV (had only one CL).

In the present study, positive (haptoglobin and fibrinogen) and negative (paraoxonase 1) acute phase proteins (APP) and total protein levels were compared in ewes submitted to different embryo collection procedures. Although the evaluated parameters are known as markers of acute reaction, the time points in which blood samples were collected allowed the evaluation of the systemic reaction against inflammation, as it includes acute and chronic responses (Ceciliani et al., 2012).

There was no difference ($P > 0.05$) in the levels of HAP, FIB, PON1 and TP between treatments (Fig. 1). However, considering all ewes regardless of the embryo recovery method, a temporal effect on the levels of inflammatory markers was observed. At D0, ewes from both groups had HAP levels inferior to 0.5 g/L (Fig. 1A and 1B), which were similar to those reported by Wells et al. (2013), indicating that ewes were healthy. However, greater HAP levels occurred at both D3 and D6 ($P < 0.05$), characterizing an inflammatory response after the procedures. At D9, HAP returned to levels comparable to those observed before the procedures, suggesting that the raised levels at D3 and D6 may be due to the lesion resulting from the procedures executed at D0. As HAP has a half-life of 2.3 days in sheep and both HAP and serum amyloid A (SAA) are good markers of inflammation (Wells et al., 2013) and stress (Fazio et al., 2014), such ewes were likely recovered from the inflammatory process at D9. The pattern of HAP levels observed in the present study suggests that, besides its role as an APP (Eckersall, 2000), HAP is also a marker of resolving inflammation, alternating increased and decreased levels within few days after an acute stimulus.

Unlike HAP, the FIB levels were not altered after either procedure (Fig. 1C and 1D; $P > 0.05$), suggesting that FIB may not be a sensitive marker of stress and/or inflammation. That agrees with a previous study in which both HAP and SAA were acutely increased in ewes after transport, whereas FIB levels were unaltered (Fazio et al., 2014). Furthermore, Barros et al. (2015) also did not observe fluctuation in FIB levels in ewes submitted to laparoscopic ovariectomy, with the reported values ranging within levels considered normal for sheep (100 to 500 mg/dL), as observed in the present study. It is important to highlight, however, that the first FIB evaluation was performed three days after the procedure. Thus, we cannot discard an earlier regulation of this inflammatory marker.

As the PON1 is considered a negative APP in several species, decreasing after inflammation processes (Ceciliani et al., 2012), the PON1 activity was expected to decrease after the embryo recovery procedures. However, a transitory increase was observed at D3 ($P < 0.05$), after both procedures (Fig. 1E and 1F). To our knowledge, although PON1 is a negative marker of fat liver in sheep at the postpartum period (Cao et al., 2017) and in sheep naturally infected with ecthyma virus (Deveci et al., 2017), the present study is the first one to report PON1 activity after surgical and transcervical procedures in sheep. The observed values for PON1 activity are within the normal levels previously described for ewes (Pradice et al., 2017). Earlier and more frequent blood collections after the procedures would be necessary to accurately determine PON1 activity fluctuation during inflammation in ewes.

Increased TP levels compared to D0 were only observed at D9 ($P < 0.05$), for both groups (Fig. 1G and 1H). Early TP responses were expected after the procedures, since TP is supposed to be acutely regulated after injuries. However, in ewes with naturally acquired mastitis, daily TP levels were unaltered during six days, whereas the levels of both FIB and HAP were increased compared to the levels observed for healthy ewes (Simplício et al., 2017).

Although there are no specific and reliable markers of pain and stress in animals (Ceciliani et al., 2012), the parameters evaluated in the present study are known by their capability of identifying individual response to stressor agents (Murata et al., 2004). As no differences on any of the investigated markers were observed between the two tested embryo recovery methods, further studies should focus on evaluating the reproductive performance and the longevity of ewes repeatedly submitted to the LP and TC techniques.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Alceu Mezzalira, from UDESC (Lages-SC, Brazil) for providing some of the hormones used in this study.

Funding

This research was funded with a scholarship given to the first author by CAPES

References

- Barros, F.F.P.C., Teixeira, P.P.M., Silva, M.A.M., Coelho, C.M.M., Lopes, M.C.S., Kawanami, A.E., Chung, D.G., Coutinho, L.N., Ribeiro, R.B., Padilha, L.C., Vicente, W.R.R., 2015. Single-port laparoscopic ovariectomy using a pre-tied loop ligature in Santa Ines ewes. *Ciênc. Rural* 45, 2033-2038.
- Bastos, B.L., Meyer, R., Guimaraes, J.E., Ayres, M.C., Guedes, M.T., Moura-Costa, L.F., de Burghgrave, U.S., Sena, L., Azevedo, V., Portela, R.W., 2011. Haptoglobin and fibrinogen concentrations and leukocyte counts in the clinical investigation of caseous lymphadenitis in sheep. *Veterinary clinical pathology* 40, 496-503.
- Browne, R.W., Koury, S.T., Marion, S., Wilding, G., Muti, P., Trevisan, M., 2007. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. *Clinical Chemistry* 53, 310-317.
- Candappa, I.B.R., Bartlewski, P.M., 2014. Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. *Reprod Biol Endocrinol* 12, 1-9.
- Cao, Y., Zhang, J., Yang, W., Xia, C., Zhang, H.-Y., Wang, Y.-H., Xu, C., 2017. Serum paraoxonase as an indicator for fatty liver in sheep. *J. Vet. Res.* 61, 97-102.
- Ceciliani, F., Ceron, J., Eckersall, P., Sauerwein, H., 2012. Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics* 75, 4207-4231.
- DeRossi, R., Carneiro, R.P.B., Ossuna, M.R., Zanenga, N.F., Alves, O.D., Jorge, T.P., Costa-e-Silva, E.V., Vasconcelos, J., 2009. Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. *Small Rumin. Res.* 83, 74-78.
- Deveci, H., Kükürt, A., Uzlu, E., Sözdutmaz, İ., Merhan, O., Aktaş, S., Alpay, M., Kaya, İ., Karapehlivan, M., 2017. Evaluation of paraoxonase activity, total sialic acid and oxidative stress in sheep with ecthyma contagiosa. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 23, 453-457.
- Eckersall, P., 2000. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. *Ir. Vet. J.* 53, 307-311.

- Fazio, F., Ferrantelli, V., Cicero, A., Casella, S., Piccione, G., 2014. Utility of Acute Phase Proteins as Biomarkers of Transport Stress in Ewes and Beef Cattle. *Ital. J. Food Saf.* 3, 4210.
- Gusmão, A.L., Silva, J.C., Bittencourt, T.C.C., Martins, L.E.P., Gordiano, H.D., Barbosa, L.P., 2009. Transcervical embryo recovery in Dorper ewes in the Brazilian semi-arid Northeast. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61, 313-318.
- Lowe, G.D., Rumley, A., Mackie, I.J., 2004. Plasma fibrinogen. *Annals of clinical biochemistry* 41, 430-440.
- Masoudi, R., Kohram, H., Shahne, A., Davoud, S., 2012. Effect of estradiol and oxytocin on ovine cervical relaxation. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 2803-2806.
- Menchaca, A., Vilariño, M., Pinczak, A., Kmaid, S., Saldaña, J.M., 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology* 72, 477-483.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168, 28-40.
- Pradiee, J., de Campos, F.T., Rincon, J., Collares, L., Goularte, K., Silveira, P., Pegoraro, L., Schneider, A., 2017. Paraoxonase 1 (PON1) activity in serum, follicular fluid and seminal plasma of sheep. *Reprod. Domest. Anim.*
- Simplício, K.M.M.G., Rocha, T.G., Sanchez, D.C.C., Cotrim, F.S., Silva, P.C., Fagliari, J.J., 2017. Serum concentrations of acute phase proteins in goats and ewes with naturally acquired *Staphylococcus aureus* mastitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 69, 285-292.
- Tervit, H., Havik, P., 1976. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. *New Zealand veterinary journal* 24, 138-140.
- Wells, B., Innocent, G.T., Eckersall, P.D., McCulloch, E., Nisbet, A.J., Burgess, S.T.G., 2013. Two major ruminant acute phase proteins, haptoglobin and serum amyloid A, as serum biomarkers during active sheep scab infestation. *Vet. Res.* 44, 103-103.

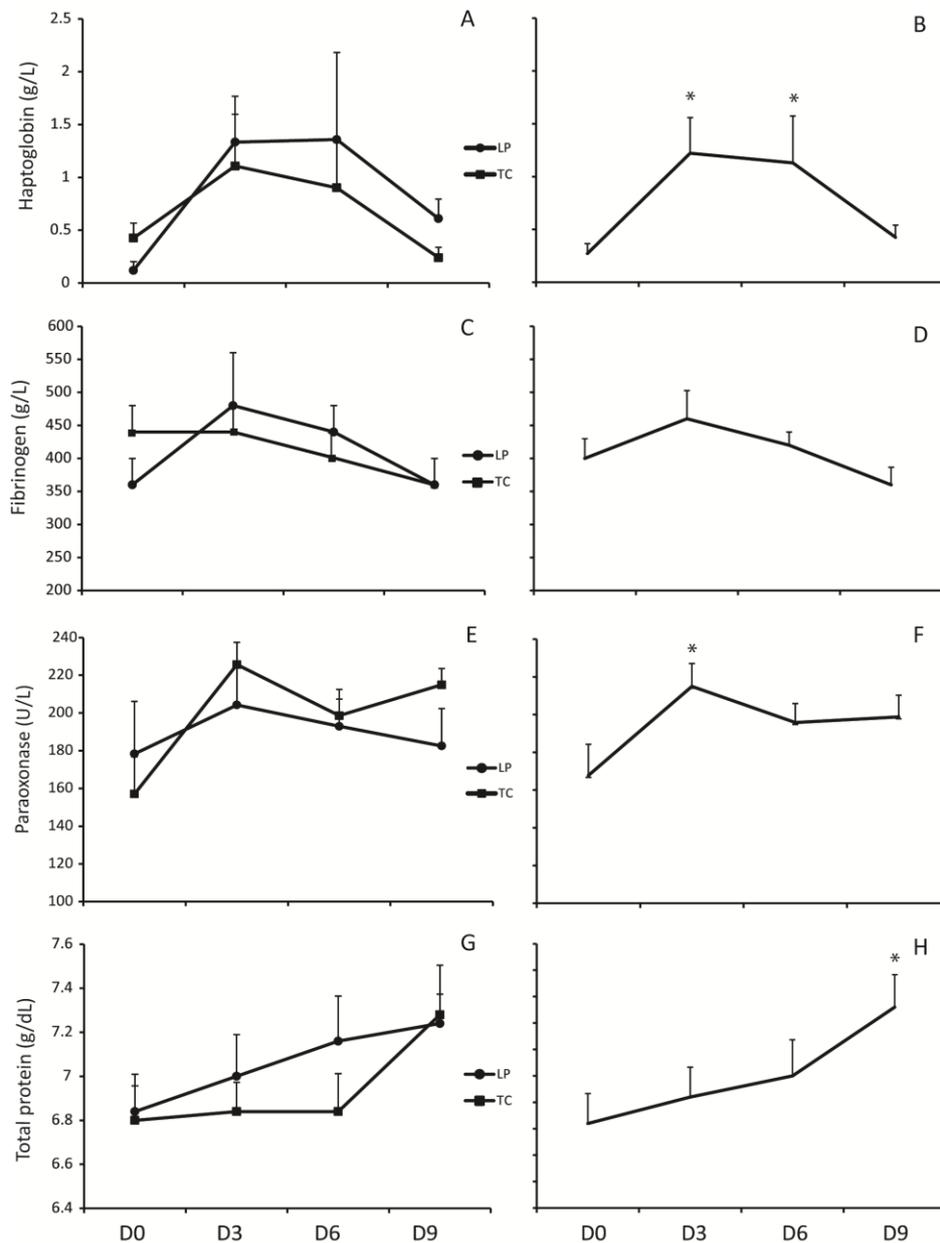


Figure 1: Serum levels of haptoglobin, fibrinogen, paraoxonase 1 activity and total protein in ewes submitted to embryo collection. A, C, E and G: Comparisons between embryo collection methods; non-surgical transcervical (TC) and laparotomy (LP) (n = 5 ewes per group). B, D, F and H: Comparisons across periods regardless of the embryo collection method (n = 10 ewes). Blood samples were collected immediately before the procedures (D0) and 3, 6 and 9 days after. Error bars represent standard error. *Differences from D0 (P < 0.05).

3.2 Artigo 2

Efeito da prostaglandina F_{2α} no ambiente folicular e endometrial em bovinos

Oliveira, F.C.; Haas, C.S.; Ferst, J.G.; Pfeifer, L.F.M; Schneider, A.;
Pegoraro, L.M.C.; Rovani, M.T.; Vieira, A.D.; Gasperin, B.G.; Lucia Jr, T.;
Gonçalves, P.B.D

Será submetido à revista *Animal Reproduction*

1 Efeito da prostaglandina F2 α no ambiente folicular e endometrial em bovinos

2
3 Fernando Caetano de Oliveira¹; Cristina Sangoi Haas¹; Juliana Germano Ferst²; Luiz
4 Francisco M. Pfeifer³; Augusto Schneider⁴; Ligia M.C. Pegoraro⁵; Monique T. Rovani⁶;
5 Arnaldo Diniz Vieira¹; Bernardo Garziera Gasperin¹; Thomaz Lucia Jr¹; Paulo Bayard
6 D. Gonçalves² *

7
8 ¹ ReproPel, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

9 ² BioRep, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900,
10 Santa Maria, RS, Brasil.

11 ³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Porto Velho, RO, Brasil.

12 ⁴ Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

13 ⁵ Embrapa Clima Temperado, Unidade terras baixas, Capão do Leão, RS, Brasil.

14 ⁶ Instituto Federal Farroupilha, Frederico Westphalen, RS, Brasil.

15 *Endereço para correspondência: bayard@ufsm.br

16
17 **Resumo:** Dentre os mediadores inflamatórios, a PGF está relacionada a processos
18 reprodutivos associados ao crescimento folicular, ovulação e proliferação endometrial.
19 Entretanto, os mecanismos celulares/moleculares envolvidos são desconhecidos. Com
20 isso, este trabalho tem por objetivo identificar os efeitos da PGF exógena sobre o
21 ambiente folicular e endometrial em bovinos. Para avaliar a expressão do *PTGFR* nas
22 células da granulosa foram utilizados folículos em diferentes fases de desenvolvimento,
23 dominantes e subordinados, antes (n=4), durante (n=4) e após (n=6) a divergência, e
24 durante a ovulação (0, 3, 6, 12 e 24 h após tratamento com GnRH). O crescimento

25 folicular foi acompanhado e foram coletadas amostras de células da granulosa e de
26 fluído folicular de folículos em ambiente com presença (PGF n=8; CONT n=7) e
27 ausência (PGF n=10; CONT n=10) de progesterona exógena. Biopsias endometriais
28 foram colhidas de vacas tratadas (n=10) ou não (n=10) com PGF durante o proestro.
29 Ocorreu expressão do *PTGFR* nos folículos dominantes e subordinados durante a
30 divergência, com uma regulação após a divergência nos dominantes ($P \leq 0,05$), sem
31 regulação durante a ovulação. A PGF não alterou o diâmetro pré-ovulatório e a taxa de
32 crescimento, com e sem progesterona, e não alterou os níveis intrafoliculares de
33 progesterona e estradiol. Porém, foi observada correlação entre o diâmetro folicular pré-
34 ovulatório e os níveis de progesterona intrafoliculares ($R=0,40$; $P=0,03$). A PGF
35 também não alterou a expressão das enzimas esteroidogênicas *CYP19A1* e *HSD3B*
36 ($P > 0,05$). Tratamento com PGF i.m. durante o proestro não modulou a expressão gênica
37 das biopsias endometriais ($P > 0,05$), com tendência para expressão de *PTGS2* e *AQP4*
38 ($P=0,12$). A regulação do *PTGFR* nas células da granulosa durante a divergência
39 folicular sustenta a hipótese de que exista um efeito local da PGF no folículo.
40 Entretanto, os modelos utilizados no estudo, dose, via de administração e momento da
41 aplicação da PGF, não identificaram efeitos sobre a esteroidogênese, o crescimento
42 folicular, a indução da ovulação e o ambiente uterino em bovinos.

43 **Palavras-chave:** prostaglandina; mediador inflamatório; ovulação; divergência; saúde
44 uterina.

45 **Introdução**

46 O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino, porém, não é o maior produtor
47 de carne (Cook, 2015; 2016), o que demonstra a baixa eficiência dos sistemas de
48 produção. No controle da reprodução bovina, os protocolos hormonais são amplamente
49 utilizados, tendo possibilitado o aumento da produtividade brasileira através da
50 racionalização dos manejos e incremento genético por viabilizar a inseminação artificial
51 (IA) em uma maior proporção de fêmeas. As prostaglandinas são compostos produzidos
52 em vários tipos celulares, com funções variadas (Lands, 1979) e possuem ação próxima
53 ao local de produção (Jabbour et al., 2006; Olofsson e Leung, 1994). Dentre os produtos
54 disponíveis para o controle do ciclo estral, a prostaglandina F_{2α} (PGF) e seus análogos
55 está entre os mais utilizados (Lamb et al., 2010; Colazo et al., 2002), sendo também
56 indicados para o tratamento de transtornos reprodutivos (Lindell et al., 1982; Salasel e
57 Mokhtari, 2011). Portanto, é essencial compreender os efeitos decorrentes da aplicação
58 destes compostos em seus diferentes tecidos-alvo.

59 Em função de seu efeito luteolítico, a PGF é utilizada no controle das
60 concentrações circulantes de progesterona (P₄), principalmente em bovinos, ovinos e
61 equinos. Entretanto, as prostaglandinas produzidas no folículo ovulatório desempenham
62 papel relevante na ovulação (Murdoch et al., 1983), pois o bloqueio de sua síntese pela
63 indometacina inibiu a ovulação em ratas (Mori et al., 1980b), vacas (De Silva e Reeves,
64 1985) e leitoas (Downey e Ainsworth, 1980). A aplicação de anti-inflamatório sistêmico
65 em doses elevadas (Cuervo-Arango e Domingo-Ortiz, 2011) ou terapêuticas (Lima et
66 al., 2015) em éguas, também é capaz de bloquear a ovulação pela ação inibitória sobre a
67 cicloxigenase 2 (PTGS2), enzima responsável pela síntese de PGF. Portanto,

68 fisiologicamente, na ausência de concentrações adequadas de prostaglandinas, não há
69 ovulação.

70 Além do efeito da PGF produzida no folículo durante a cascata ovulatória, há
71 evidências de que a suplementação exógena de PGF por via intramuscular (i.m.) é capaz
72 de modular o crescimento folicular e/ou ovulação. Quando administrada durante o
73 proestro ou estro, a PGF foi capaz de antecipar a ovulação na vaca (Pfeifer et al., 2014)
74 e de induzir puberdade, crescimento folicular e ovulação em novilhas pré-púberes
75 (Leonardi et al., 2012). A PGF também melhorou índices reprodutivos quando aplicada
76 junto ao GnRH indutor de ovulação, em protocolo Ovsynch (Ambrose et al., 2015).
77 Durante o processo de ovulação *in vivo*, a PGF ocasiona um rearranjo das células da
78 granulosa e no potencial de membrana das células no sítio da ovulação, resultando em
79 necrose local (Murdoch e McDonnel, 2002), culminando com a ruptura do estigma
80 ovulatório e com a liberação do gameta.

81 A PGF também possui um efeito direto sobre o ambiente uterino (Hirsbrunner et
82 al., 2006; Stolla e Schmid, 1990), atuando principalmente sobre os receptores (PTGFR)
83 nas células endometriais de bovinos no pós-parto (Camargos et al., 2016; Coleman et
84 al., 1994). A PGF atua via estes receptores nucleares (Forman et al., 1997), mediados
85 por receptores ativados por proliferadores de peroxisoma (PPAR) (Lim et al., 1999). A
86 PGF está associada à produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1) e de fatores de
87 crescimento (Kawano et al., 2001; Raz et al., 1988), nas células epiteliais e de estroma
88 do endométrio, através do aumento da atividade fagocítica dos neutrófilos (Lewis,
89 2004), promovendo as defesas imunitárias e contribuindo para a saúde uterina em
90 bovinos.

91 Com base no acima exposto, fica evidente que a PGF possui um efeito quando
92 aplicada no período periovulatório em bovinos. Porém, os mecanismos envolvidos nos
93 efeitos observados são desconhecidos e poucos estudos investigaram os efeitos da PGF
94 exógena sobre o ambiente folicular e endometrial. Portanto, o presente estudo teve por
95 objetivos: investigar a presença e a regulação da expressão do receptor de PGF
96 (*PTGFR*) nas células da granulosa em folículos bovinos em diferentes fases de
97 desenvolvimento; avaliar os efeitos da aplicação de PGF exógena sobre o crescimento
98 folicular e sobre marcadores de esteroidogênese em vacas com diferentes ambientes
99 endócrinos de P4; e investigar o efeito da PGF sobre o ambiente uterino quando
100 aplicada, durante o proestro.

101

102 **Metodologia**

103 Todos os experimentos envolvendo animais foram submetidos e aprovados pela
104 Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel.

105 *Experimento 1 – Expressão do receptor de PGF (PTGFR) nas células da granulosa*
106 *bovina*

107 Os dados de expressão nas células da granulosa ao redor da divergência foram
108 obtidos a partir de amostras coletadas em um estudo anterior do nosso grupo (Gasperin
109 et al., 2015). Brevemente, vacas cíclicas (*Bos taurus taurus*) adultas e não lactantes
110 (escore corporal 3; escala 1-5) foram sincronizadas com duas injeções de análogo de
111 PGF (250µg de cloprostenol sódico) com intervalo de 12h. Após a detecção do estro, os
112 ovários foram avaliados por ultrassonografia transretal para monitorar o crescimento
113 folicular durante a primeira onda do ciclo. O dia da emergência folicular foi identificado
114 como o dia em que o maior folículo apresentava diâmetro entre 4 e 5 mm. Os dois

115 maiores folículos de cada vaca foram dissecados e as células da granulosa foram
116 coletadas através de sucessivos *flushings*. O maior folículo foi classificado como
117 dominante (D), enquanto que o menor folículo foi classificado como subordinado (S).
118 Pares de folículos foram formados e utilizados para análise em três períodos: antes (Dia
119 2; n = 4 vacas), durante (Dia 3; n = 4 vacas) e após a divergência (Dia 4; n = 6 vacas)
120 folicular.

121 Para investigar a regulação do receptor de PGF nas células da granulosa em
122 diferentes momentos após a indução da ovulação com GnRH, foram utilizadas amostras
123 provenientes de um estudo anterior, conforme descrito por Santos et al. (2012).
124 Brevemente, vacas multíparas (escore corporal entre 3 e 4), receberam: duas doses de
125 um análogo de PGF (250µg de cloprostenol sódico) i.m. com intervalo de 12 h; 2 mg de
126 benzoato de estradiol (BE); e um dispositivo intravaginal (DIV) de P4 no dia 0 (1g P4).
127 Após a remoção do dispositivo no dia 9, os ovários foram examinados através de
128 ultrassonografia transretal. Animais com folículos preovulatórios (≥ 12 mm) receberam
129 100 µg de um análogo de GnRH (acetato de gonadorelina) i.m. 12 h após a remoção do
130 DIV. As células da granulosa foram então coletadas em diferentes momentos após a
131 aplicação de GnRH (0, 3, 6, 12 e 24 h), 5 animais por momento, sendo congeladas em
132 nitrogênio líquido.

133 *Experimento 2: Ação da PGF sobre o folículo em ambiente endócrino com*
134 *progesterona exógena*

135 Para avaliar o efeito da PGF sobre o folículo pré-ovulatório em um ambiente
136 endócrino na presença de P4 em bovinos, foram utilizadas fêmeas bovinas cíclicas (n =
137 15), da raça Jersey, não lactantes, multíparas e com condição corporal ≥ 3 (escala de 1-
138 5). O protocolo utilizado para sincronização do estro e indução de uma nova onda

139 folicular foi baseado na inserção de um dispositivo intravaginal (DIV) contendo 1g de
140 P4, que foi mantido por 11 dias (Figura 1). No dia da inserção do DIV, foram aplicados
141 2mg de benzoato de estradiol (BE). No dia 6, para não intervir no momento do
142 tratamento, foi feita administração de 500µg de PGF (para promover luteólise) e de
143 400UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG). No D9, foram realizados os
144 tratamentos: o grupo PGF recebeu uma administração i.m. de 500µg de prostaglandina
145 (n = 8) e o grupo Controle recebeu solução salina (n = 7) i.m.. Os DIVs foram mantidos
146 até o D11, quando foi realizada mensuração do diâmetro e a aspiração para coleta do
147 fluído folicular e células da granulosa, 42 h após os tratamentos realizados no D9. Os
148 folículos dominantes saudáveis foram acompanhados diariamente por ultrassonografia
149 transretal (PieMedical AquilaVet, com transdutor linear de 6 MHz).

150 *Experimento 3: Ação da PGF sobre o ambiente folicular e endometrial na ausência de*
151 *progesterona exógena (proestro/estro)*

152 Para avaliar o efeito da PGF sobre o ambiente folicular pré-ovulatório de animais
153 em proestro/estro, foram utilizadas fêmeas bovinas (n = 20), cíclicas,
154 predominantemente da raça Angus, não lactantes, múltiparas e com condição corporal \geq
155 3 (escala de 1-5). A sincronização do estro foi realizada conforme descrito no
156 experimento 1, com base no protocolo proposto por Pfeifer et al. (2014). A PGF (para
157 ação na luteólise) foi administrada no dia 6, para evitar uma possível interferência no
158 efeito do tratamento realizado no D10 (Figura 2). O período entre a aplicação da PGF
159 (para ação na ovulação) e a coleta de fluído folicular e células da granulosa foi de 24 h,
160 totalizando 48 h após a retirada do DIV. No dia 10, os grupos foram formados a partir
161 da distribuição equitativa de animais conforme o diâmetro do folículo pré-ovulatório,
162 mensurado antes da administração dos tratamentos.

163 *Coleta de fluido folicular e células da granulosa*

164 Após anestesia epidural e higienização do períneo, o fluido folicular e as células
165 da granulosa foram coletados através de punção dos folículos utilizando um sistema de
166 aspiração folicular (OPU) adaptado, com uma agulha 40x8 na extremidade. O sistema
167 foi acoplado a uma guia de biópsia guiada por ultrassom (PieMedical, modelo
168 AquilaVet) utilizando transdutor microconvexo de 5 MHz. Após a aspiração do fluido
169 folicular, foi realizado *flushing* no antro folicular com PBS, para melhorar a recuperação
170 das células da granulosa. Após a coleta, o sobrenadante (fluido folicular) foi separado e
171 congelado a -196°C, assim como o pellet de células da granulosa formado após a
172 centrifugação.

173 *Biopsia uterina*

174 A biopsia endometrial foi realizada com auxílio de uma pinça específica para esta
175 finalidade, conforme descrito por Chapwanya et al. (2010). A inserção foi feita por via
176 vaginal, com a utilização de uma camisa sanitária para proteção. A pinça foi guiada por
177 palpação transretal, sendo conduzida através da cérvix e posicionada na região medial
178 do corno uterino, ipsilateral ao ovário com folículo pré-ovulatório. O conteúdo
179 endometrial coletado foi mantido em nitrogênio líquido até o momento do
180 processamento.

181 *Extração de RNA, transcriptase reversa (RT) e PCR em tempo real*

182 O RNA total das células da granulosa e biopsia endometrial foi extraído usando
183 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo preconizado pelo
184 fabricante. Para quantificar o RNA extraído foi utilizado um espectrofotômetro
185 (NanoDrop), sendo a pureza avaliada através da taxa de absorção da relação
186 OD260/OD280. Amostras com valores inferiores a 1,8 (OD260/OD280) não foram

187 utilizadas. O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI, USA) a 37°C
188 por 15 min para digerir DNA genômico contaminante, conforme protocolo fornecido
189 pelo fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o kit iScript
190 (BioRad, Hercules, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. A expressão
191 relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384, BioRad) com SsoFast
192 EvaGreen supermix (BioRad), sendo a variabilidade na quantidade de RNAm acessada
193 em relação à amplificação dos genes constitutivos *PPIB*, *H2A Histone*, *GAPDH*, *18S*
194 *rRNA* e *RPL19*, selecionados conforme valores de estabilidade (CFX manager, Software
195 versão 3.0). A sequência dos iniciadores dos genes constitutivos e genes de interesse
196 avaliados estão descritas na Tabela 1.

197 *Dosagem de estradiol e progesterona*

198 Após a coleta, amostras de fluido folicular foram imediatamente centrifugadas a
199 2500 rpm por 10 minutos, estocadas em alíquotas triplicatas e mantidas em nitrogênio
200 líquido (-196°C). A concentração de estradiol ou P4 foi mensurada em laboratório
201 particular através de Kits de quimioluminescência (Roche, Brasil) (Bossaert et al.,
202 2008), com variação máxima de 10% intra- e inter-ensaio.

203 *Análise estatística*

204 As análises estatísticas, e correlações foram conduzidas usando o software JMP
205 (SAS Institute Inc., Cary, NC). A distribuição dos dados foi testada com o teste
206 Shapiro-Wilk, sendo os mesmos normalizados quando necessário. Os dados contínuos
207 foram submetidos a análise de variância (ANOVA).

208 **Resultados e discussão**

209 Inicialmente, para dar subsídios ao estudo de um possível efeito local da PGF em
210 folículos bovinos, investigou-se a expressão do receptor *PTGFR* nas células da
211 granulosa de folículos dominantes (saudáveis), subordinados (atrésicos) e pré-
212 ovulatórios, a partir de um banco de amostras disponível (Gasperin et al., 2015).
213 Observou-se a expressão do receptor em todas as classes foliculares avaliadas (Figura
214 3A e B). Interessantemente o folículo dominante apresentou maior expressão do
215 receptor *PTGFR* após a divergência folicular. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro
216 relato de uma regulação diferencial na expressão deste receptor em folículos saudáveis e
217 atrésicos.

218 Não houve regulação na expressão do *PTGFR* nas células da granulosa coletadas
219 de folículos pré-ovulatórios em diferentes momentos após o tratamento com GnRH.
220 Bridges e Fortune (2007), utilizando um modelo semelhante, observaram que a
221 expressão do *PTGFR* é regulada negativamente 18 h após o tratamento com GnRH, *in*
222 *vivo*, aumentando imediatamente antes da ovulação. Na espécie equina, a expressão do
223 *PTGFR* nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios é induzida por
224 gonadotrofinas *in vivo*, sendo observado um aumento 33 h após o tratamento com hCG
225 (Sayasith et al., 2006). Esta maior expressão do receptor no período que antecede a
226 ovulação faz sentido, uma vez que em bovinos as concentrações de PGF e PGE
227 aumentam drasticamente 24 h após tratamento com GnRH (Fortune et al., 2009).

228 Estes dados suportam a hipótese de que o tratamento com PGF pode induzir
229 alterações no ambiente folicular, independentemente de uma ação sistêmica. Estes
230 dados podem explicar, ao menos em parte, os resultados obtidos por Leonardi et al.
231 (2012), que observaram que o tratamento intramuscular (i.m.) com PGF é capaz de

232 induzir crescimento folicular e puberdade em novilhas de corte. Apesar dos autores não
233 terem investigado os mecanismos envolvidos, o fato das novilhas não apresentarem
234 corpo lúteo, demonstra um efeito da PGF independente da luteólise. Com os presentes
235 resultados, é possível inferir que, além de um possível efeito na regulação da síntese e
236 liberação de gonadotrofinas (Randel et al., 1996), é possível que a PGF estimule o
237 desenvolvimento folicular através de um efeito direto sobre as células da granulosa.

238 Durante a suplementação exógena de P4, não foram observados efeitos do
239 tratamento sobre o diâmetro (Figura 4A) e a taxa de crescimento folicular (Figura 4B).
240 Entretanto, foi observada uma tendência de redução na concentração de P4 (Figura 4C)
241 no fluído folicular nas vacas tratadas com PGF, embora não tenha sido observada
242 diferença na expressão de enzimas esteroideogênicas (Figura 6). Segundo Randel et al.
243 (1996), a PGF aplicada isoladamente no pós-parto de vacas em anestro incrementou os
244 pulsos de LH, 6 h após o tratamento. Ainda, os mesmos autores observaram um
245 incremento no pulso de LH induzido por GnRH, demonstrando um possível efeito da
246 PGF via GnRH/LH. Em nosso modelo, na presença de P4 exógena, é possível que um
247 potencial efeito central da PGF tenha sido inibido pela inibição da liberação de LH.
248 Contrariando dados de estudos *in vivo* que demonstram um efeito estimulatório da PGF
249 sobre a liberação de LH, a PGF inibiu a secreção de LH em cultivo celular de células da
250 pituitária de ratos (Naor et al., 2007).

251 Em ovelhas em anestro, Davies et al. (2006) demonstraram que a PGF exógena é
252 capaz de induzir a ovulação em torno de um dia após o tratamento, que foi realizado
253 simultaneamente com a inserção de DIV contendo acetato de medroxiprogesterona
254 (MAP). Estes autores sugerem que as ovulações foram decorrentes de um efeito direto
255 sobre o folículo, não tendo ocorrido alteração das concentrações circulantes de P4. No

256 presente estudo, observou-se apenas uma tendência de redução das concentrações de P4
257 no fluído folicular, não sendo observadas ovulações até as 42 h ou 48 h (dados não
258 demonstrados) subsequentes ao tratamento.

259 Mesmo sem ter sofrido efeito dos tratamentos, os níveis de P4 no fluído folicular
260 apresentaram correlação positiva ($R = 0,40$; $P = 0,03$) com o diâmetro folicular no D11
261 (Figura 5). É possível que a ausência de efeito da PGF, esteja associada ao diâmetro
262 reduzido dos folículos no momento do tratamento (aproximadamente 9 mm), embora
263 esta hipótese ainda deva ser testada em futuros estudos. É bem estabelecido que a
264 maioria dos folículos ovarianos em fêmeas taurinas se tornam responsivos quando
265 atingem 12 mm de diâmetro (Sartori et al., 2001a). As concentrações médias de P4 no
266 fluído folicular (Figura 4) e a elevada taxa de crescimento folicular entre D9 e
267 D11 sugerem que estes folículos estavam viáveis, mesmo na presença de P4 exógena,
268 sem terem sofrido luteinização. As concentrações de P4 observados no fluído folicular
269 (em torno de 50 ng/mL) são condizentes com os níveis observados por Fortune et al.
270 (2009) em vacas antes do tratamento com GnRH. Em um estudo recente do nosso
271 grupo, Santos (2015) também observou que os níveis de P4 no fluído de folículos pré-
272 ovulatórios saudáveis passam de 40 ng/mL, no momento da aplicação do GnRH, para
273 380 ng/mL, 3 h após.

274 Corroborando com a ausência de efeito sobre o desenvolvimento folicular, a
275 expressão das enzimas *CYP19A1*, envolvida na síntese de estradiol, e *HSD3B1*,
276 envolvida na síntese de P4, não diferiu entre os grupos controle e PGF ($P > 0,05$) (Figura
277 6). Aumento na expressão de *HSD3B1* e bloqueio da expressão de *CYP19A1* são
278 observados durante a luteinização, quando cessa a síntese de estrógeno e a produção de
279 P4 se inicia rapidamente (Walsh et al., 2012). Cabe ressaltar que, em bovinos, a inibição

280 da síntese de P4 através da administração de trilostano (bloqueador de *HSD3B1*)
281 intrafolicular, não afeta a ovulação, embora resulte em menores concentrações de P4 no
282 fluído folicular (Li et al., 2007). Esta relação entre a PGF, a síntese de P4 e a ovulação
283 ainda deve ser melhor investigada no modelo bovino, preferencialmente em folículos
284 que apresentem maior diâmetro ao momento do tratamento. No modelo ovino, a PGF
285 foi capaz de induzir ovulação com presença de P4 exógena, porém sem induzir
286 luteinização, nem produção de P4 endógena (Davies et al., 2006). Entretanto, o bloqueio
287 da ovulação com indometacina não afeta a luteinização (Murdoch e Dunn, 1983), sendo
288 a ovulação e a luteinização eventos independentes na espécie ovina.

289 É importante ressaltar que as fêmeas de ambos os grupos receberam
290 suplementação de gonadotrofina (eCG) no dia 6, a fim de manter um folículo viável
291 durante a suplementação com P4. Embora tenham decorrido quatro dias entre a
292 aplicação de eCG e o tratamento com PGF, não é possível descartar que a
293 suplementação com gonadotrofina tenha interferido na resposta, uma vez que, em doses
294 mais elevadas, há relatos de níveis de eCG circulantes até 10 dias após aplicação
295 (Bever e Dieleman, 1987).

296 Posteriormente, investigou-se o efeito do tratamento com PGF sobre o diâmetro
297 folicular, a taxa de crescimento e a concentração de estrógeno no fluído folicular em
298 vacas em um ambiente endócrino com baixa concentração de P4 (proestro/estro).
299 Conforme pode ser observado na Figura 7, não foram observadas diferenças entre os
300 grupos ($P > 0,05$).

301 Embora as vacas tenham sido distribuídas de forma equilibrada entre os grupos,
302 de acordo com o diâmetro folicular no momento do tratamento, avaliou-se a correlação
303 entre o diâmetro do folículo e os níveis de estrógeno (dados não demonstrados). Os

304 níveis de estrógeno no fluído folicular não apresentaram correlação nem com o diâmetro
305 folicular ($R = 0,007$; $P = 0,71$), nem com a taxa diária de crescimento folicular ($R =$
306 $0,002$; $P = 0,84$). Os níveis médios de estradiol intrafolicular (Figura 7C) sugerem que
307 os folículos estavam viáveis no momento da aspiração e que ainda não haviam iniciado
308 o processo de luteinização, validando o modelo de estudo. Em um estudo anterior do
309 nosso grupo de pesquisa, observou-se que, 12 h após o tratamento com GnRH, os
310 folículos apresentam níveis de estradiol no fluído folicular inferiores a 200 ng/mL
311 (Santos et al., 2012).

312 Em novilhas pré-púberes, foi observado um efeito positivo da PGF sobre o
313 crescimento folicular (Leonardi et al., 2012). Contudo, este efeito não foi observado em
314 vacas (Pfeifer et al., 2014). É possível que, em vacas cíclicas com bom estado
315 nutricional e sem desafios metabólicos, não seja possível um incremento na taxa de
316 crescimento folicular, o que explicaria o fato destes efeitos terem sido observados em
317 novilhas pré-púberes, mas não em vacas. Estes resultados contrariam relatos observados
318 em ovinos, indicando que a PGF induz a ovulação, mas não induz a luteinização
319 (Davies et al., 2006) e de que o seu bloqueio não afetaria a luteinização, porém bloqueia
320 a ovulação (Murdoch e Dunn, 1983). Portanto, ainda não é possível descartar um efeito
321 da PGF aplicada durante o proestro/estro sobre a remodelação da matriz extracelular em
322 bovinos, embora não tenhamos observado alterações na esteroidogênese das células da
323 granulosa.

324 Os efeitos da PGF sobre o ambiente uterino durante o proestro/estro foram
325 testados pela expressão gênica das biopsias endometriais. Dentre os genes avaliados,
326 não foram observadas alterações na expressão de mRNA (Figura 8). A PGF é o
327 eicosanoide de maior importância como mediador de processos inflamatórios (Dennis e

328 Norris, 2015; Ke et al., 2017), contribuindo positivamente para a resposta do organismo.
329 Como uma molécula pró-inflamatória, a PGF estimula a produção de citocinas pró-
330 inflamatórias nas células epiteliais e do estroma do endométrio, através do aumento da
331 atividade fagocítica dos neutrófilos (Lewis, 2004), promovendo as defesas imunitárias e
332 contribuindo com a saúde uterina em bovinos. Porém, com o modelo proposto, não se
333 observou diferença na expressão de genes relacionados à proliferação celular,
334 inflamação, homeostase celular, sistema imunológico e nutrição celular. Estes
335 resultados indicam que a PGF, mesmo possuindo um efeito sobre a musculatura lisa
336 uterina, quando aplicada durante o proestro, não regula as funções avaliadas no
337 endométrio e no ambiente uterino.

338 A observação de um efeito sobre a expressão de *PTGS2* e *AQP4* ($P=0,12$), mesmo
339 que não significativa estatisticamente, possivelmente pela dose e momento da aplicação
340 da PGF, indica um efeito negativo da PGF sobre a permeabilidade de membrana. A
341 expressão de *AQP4* que regula a homeostase através de canais transportadores e pela
342 permeabilidade de membrana está relacionada a processos de edema em diferentes
343 tecidos (Iacovetta et al., 2012), efeito observado no útero de bovinos em fase
344 estrogênica (proestro/estro). A tendência de efeito inibitório da PGF exógena sobre a
345 *PTGS2*, observada no presente estudo, não foi observada sobre o endométrio de éguas
346 *in vivo* e *in vitro*, em células epiteliais e de estroma endometrial (Kozai et al., 2016),
347 caracterizando um efeito autorregulatório na espécie. Para a espécie bovina, e na dose
348 de PGF utilizada, este efeito de auto-amplificação da PGF no endométrio não foi
349 observado. Porém, estudos *in vitro* demonstram uma ligação da PGF no PTGFR
350 endometrial, estimulando fatores de crescimento e proliferação celular (Zhang et al.,
351 2017).

352

353 **Conclusões**

354 A expressão do receptor *PTGFR* nas células da granulosa durante a divergência
355 folicular e ovulação sustentam a hipótese de um efeito local da PGF sobre o folículo.
356 Entretanto, com os modelos utilizados no presente estudo, não foram observados efeitos
357 da PGF aplicada sistemicamente sobre a esteroidogênese, o crescimento folicular e a
358 indução da ovulação. Uma única aplicação de PGF durante o proestro não afetou a
359 expressão dos genes avaliados no endométrio. Porém, possíveis efeitos sobre a
360 proliferação celular e a remodelação da matriz extracelular não podem ser descartados.

361 **Referências Bibliográficas**

- 362 **Ambrose, DJ, M Gobikrushanth, S Zuidhof, and JP Kastelic** 2015 Low-dose natural prostaglandin F_{2α}
 363 (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. *Theriogenology* **83**
 364 529-534.
- 365 **Bevers, MM, and SJ Dieleman** 1987 Superovulation of cows with PMSG: Variation in plasma
 366 concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of
 367 preovulatory follicles. *Anim Reprod Sci* **15** 37-52.
- 368 **Bossaert, P, JL Leroy, S De Vlieghe, and G Opsomer** 2008 Interrelations between glucose-induced
 369 insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. *J*
 370 *Dairy Sci* **91** 3363-3371.
- 371 **Bridges, PJ, and JE Fortune** 2007 Regulation, action and transport of prostaglandins during the
 372 periovulatory period in cattle. *Molecular and cellular endocrinology* **263** 1-9.
- 373 **Chapwanya, A, KG Meade, F Narciandi, P Stanley, JF Mee, ML Doherty, JJ Callanan, and C O'Farrelly**
 374 2010 Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction.
 375 *Theriogenology* **73** 988-994.
- 376 **Colazo, MG, MF Martínez, JP Kastelic, and RJ Mapletoft** 2002 Effects of dose and route of
 377 administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. *Anim Reprod*
 378 *Sci* **72** 47-62.
- 379 **Cook, R** 2015 World Beef Production: Ranking Of Countries. *Beef 2 Live*.
- 380 **Cook, R** 2016 World Cattle Inventory: Ranking of Countries. Obtenido de Beef2Life: <http://beef2live.com/story-world-cattle-inventory-ranking-countries-0-106905>.
- 381
- 382 **Cuervo-Arango, J, and R Domingo-Ortiz** 2011 Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine
 383 is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles.
 384 *Theriogenology* **75** 707-714.
- 385 **Davies, K, P Bartlewski, T Epp, R Duggavathi, D Barrett, E Bagu, S Cook, and N Rawlings** 2006 Does
 386 injection of prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) cause ovulation in anestrous Western White Face
 387 ewes? *Theriogenology* **66** 251-259.
- 388 **De Silva, M, and JJ Reeves** 1985 Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *J Reprod Fertil* **75** 547-
 389 549.
- 390 **Downey, BR, and L Ainsworth** 1980 Reversal of indomethacin blockade of ovulation in gilts by
 391 prostaglandins. *Prostaglandins* **19** 17-22.
- 392 **Fortune, JE, EL Willis, PJ Bridges, and CS Yang** 2009 The periovulatory period in cattle: progesterone,
 393 prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Animal Reproduction* **6** 60-71.
- 394 **Gasperin, BG, MT Rovani, R Ferreira, GF Ilha, V Bordignon, PBD Gonçalves, and R Duggavathi** 2015
 395 Functional status of STAT3 and MAPK3/1 signaling pathways in granulosa cells during bovine
 396 follicular deviation. *Theriogenology* **83** 353-359.
- 397 **Iacovetta, C, E Rudloff, and R Kirby** 2012 The role of aquaporin 4 in the brain. *Vet Clin Pathol* **41** 32-44.
- 398 **Jabbour, HN, KJ Sales, OPM Smith, S Battersby, and SC Boddy** 2006 Prostaglandin receptors are
 399 mediators of vascular function in endometrial pathologies. *Molecular and cellular*
 400 *endocrinology* **252** 191-200.
- 401 **Kozai, K, S Tokuyama, AZ Szóstek, Y Toishi, N Tsunoda, K Taya, M Sakatani, M Takahashi, Y Nambo, DJ**
 402 **Skarzynski, Y Yamamoto, K Kimura, and K Okuda** 2016 Evidence for a PGF_{2α} auto-
 403 amplification system in the endometrium in mares. *Reproduction* **151** 517-526.
- 404 **Lamb, G, C Dahlen, J Larson, G Marquezini, and J Stevenson** 2010 Control of the estrous cycle to
 405 improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *J Anim Sci* **88**
 406 E181-E192.
- 407 **Lands, W** 1979 The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Annual Review of Physiology* **41** 633-
 408 652.
- 409 **Leonardi, CEP, LFM Pfeifer, MIB Rubin, J Singh, RJ Mapletoft, GA Pessoa, AM Bairy, and CAM Silva**
 410 2012 Prostaglandin F_{2α} promotes ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology* **78** 1578-
 411 1582.
- 412 **Lewis, GS** 2004 Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim Reprod Sci* **82-83** 281-294.

- 413 **Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Bettegowda, A., Ireland, J.J., Smith, G.W.,** 2007. Evidence that the
414 preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle.
415 *Journal of Endocrinology* **192**, 473-483.
- 416 **Lim, H., Gupta, R.A., Ma, W.-g., Paria, B.C., Moller, D.E., Morrow, J.D., DuBois, R.N., Trzaskos, J.M.,**
417 **Dey, S.K.,** 1999. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the
418 mouse via PPAR δ . *Genes & development* **13**, 1561-1574.
- 419 **Lima, AG, LC Costa, MA Alvarenga, and CB Martins** 2015 Does Clinical Treatment with Phenylbutazone
420 and Meloxicam in the Pre-ovulatory Period Influence the Ovulation Rate in Mares? *Reprod*
421 *Domest Anim* **50** 771-775.
- 422 **Lindell, J, H Kindahl, L Jansson, and L Edqvist** 1982 Post-partum release of prostaglandin F 2α and
423 uterine involution in the cow. *Theriogenology* **17** 237-245.
- 424 **Luo, W, and MC Wiltbank** 2006 Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and
425 CYP19A1 in bovine granulosa cells. *Biol Reprod* **75** 217-225.
- 426 **Mori, T, H Kohda, Y Kinoshita, Y Ezaki, N Morimoto, and T Nishimura** 1980 Inhibition by indomethacin
427 of ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in immature rats primed with
428 pregnant mare serum gonadotrophin. *J Endocrinol* **84** 333-341.
- 429 **Murdoch, W, and T Dunn** 1983 Luteal function after ovulation blockade by intrafollicular injection of
430 indomethacin in the ewe. *Journal of reproduction and fertility* **69** 671-675.
- 431 **Murdoch, W, K Nix, and T Dunn** 1983 Dynamics of ovarian blood supply to periovulatory follicles of the
432 ewe. *Biol Reprod* **28** 1001-1006.
- 433 **Murdoch, WJ, and AC McDonnell** 2002 Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and
434 carcinogenesis. *Reproduction* **123** 743-750.
- 435 **Naor, Z, HN Jabbour, M Naidich, AJ Pawson, K Morgan, S Battersby, MR Millar, P Brown, and RP Millar**
436 2007 Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and prostaglandin
437 receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. *Mol*
438 *Endocrinol* **21** 524-537.
- 439 **Olofsson, J, and PC Leung** 1994 Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function.
440 *Molecular and cellular endocrinology* **100** 87-91.
- 441 **Pfeifer, LFM, CEP Leonardi, NA Castro, JHM Viana, LGB Siqueira, EM Castilho, J Singh, RH Krusser, and**
442 **MIB Rubin** 2014 The use of PGF 2α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in
443 cattle. *Theriogenology* **81** 689-695.
- 444 **Randel, R, M Lammoglia, A Lewis, D Neuendorff, and M Guthrie** 1996 Exogenous PGF 2 α enhanced
445 GnRH-induced LH release in postpartum cows. *Theriogenology* **45** 643-654.
- 446 **Salasel, B, and A Mokhtari** 2011 Effect of early postpartum PGF 2α treatment on reproductive
447 performance in dairy cows with calving and puerperal traits. *Theriogenology* **76** 1723-1729.
- 448 **Santos, J, R Ferreira, B Gasperin, L Siqueira, J Oliveira, R Santos, A Reis, and P Gonçalves** 2012
449 Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type
450 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. *Journal of the*
451 *Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **13** 91-98.
- 452 **Santos, JT** 2015 Peptídeos Natriuréticos e Angiotensina-(1-7) durante o processo de ovulação em
453 bovinos. *Tese* 81.
- 454 **Sartori, R, PM Fricke, JC Ferreira, OJ Ginther, and MC Wiltbank** 2001 Follicular deviation and acquisition
455 of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* **65** 1403-1409.
- 456 **Sayasith, K, N Bouchard, M Doré, and J Sirois** 2006 Molecular cloning and gonadotropin-dependent
457 regulation of equine prostaglandin F 2α receptor in ovarian follicles during the ovulatory
458 process in vivo. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* **80** 81-92.
- 459 **Walsh, S.W., Mehta, J.P., McGettigan, P.A., Browne, J.A., Forde, N., Alibrahim, R., Mulligan, F., Loftus,**
460 **B., Crowe, M.A., Matthews, D.,** 2012. Effect of the metabolic environment at key stages of
461 follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiological genomics* **44**, 504-
462 517.
- 463 **Zhang, S, B Liu, L Gao, W Mao, C Fu, D Duritahala, N Zhang, Y Zhang, Y Shen, and J Cao** 2017
464 Prostaglandin F 2α -PTGFR signalling activation, growth factor expression and cell
465 proliferation in bovine endometrial explants. *Reprod Fertil Dev* **29** 2195-2205.
- 466

467 **Agradecimentos**

468 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS,
469 pelo financiamento (edital PRONEX 12/2014, processo 16/2551-0000494-3). À
470 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela
471 concessão de bolsa no Brasil e exterior para F.C. Oliveira (Edital PDSE/CAPES
472 n°19/2016) na McGill University.

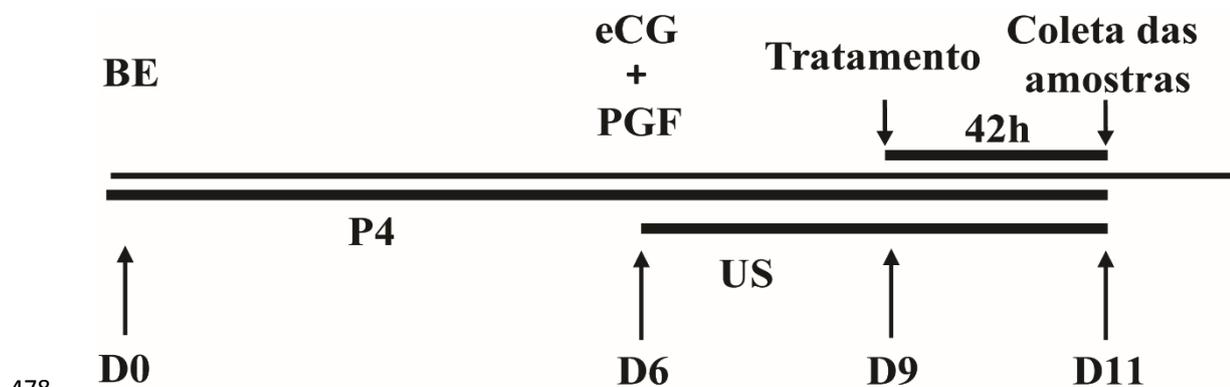
473

474 **Tabelas**

475 Tabela 1: Genes e sequências de iniciadores utilizados no estudo.

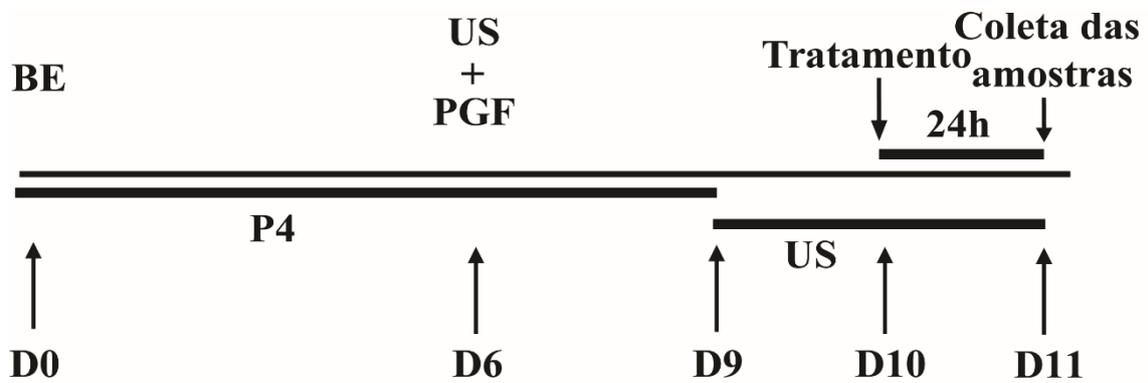
<i>RLP19</i>	F	GCCCAACTCCCCTCAGCAGA	NM_001040516.1
	R	TGGCTGTACCCTTCCGCTT	
<i>H2A Histone</i>	F	GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	Bettegowda et al. (2006)
	R	TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC	
<i>GAPDH</i>	F	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	NM_001034034.2
	R	CAACAGACACGTTGGGAGTG	
<i>PP1B</i>	F	GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	NM_174152.2
	R	TCCTTGATCACACGATGGAA	
<i>18S rRNA</i>	F	CCTTCCGCGAGGATCCATTG	Luo and Wiltbank (2006)
	R	CGCTCCCAAGATCCAACTAC	
<i>CYP19A1</i>	F	GTGTCCGAAGTTGTGCCTATT	Luo and Wiltbank (2006)
	R	GGAACCTGCAGTGGGAAATGA	
<i>3βHSD</i>	F	GCCCAACTCCTACAGGGAGAT	X17614.1
	R	TTCAGAGCCCACCCATTAGCT	
<i>AQP4</i>	F	GTGTCTGTTGCAGTGAGAT	NM_181003.2
	R	CAAAGGGACCTGGGATTTAG	
<i>CCND1</i>	F	AACTACCTGGACCGCTT	NM_001046273.2
	R	AGTGTAATGCACAGCTTCT	
<i>COL4A1</i>	F	CACGGCTACTCTTTGCTCTAC	NM_001166511.2
	R	GAAGGGCATGGTACTGAACTT	
<i>PTGS2</i>	F	TTTGACCCAGAGCTGCTTTT	NM_174445
	R	GAAAGACGTCAGGCAGAAGG	
<i>EGFR</i>	F	CCGTGAGTTGATCCTTGAATTCTC	XM_592211.5
	R	GTCCGTAGGGCTTGGCAAAT	
<i>ESR1</i>	F	CAGGCACATGAGCAACAAAG	NM_001001443.1
	R	TCCAGCAGCAGGTCGTAGAG	
<i>ESR2</i>	F	CAGCCGTCAGTTCTGTATGCA	NM_174051.3
	R	TCCTTTTCAATGTCTCCCTGTTC	
<i>GREB</i>	F	CACCTGCGTGCACAAGTTAC	XM_010810188.1
	R	GCTGGAATCCGCGATTGAAC	
<i>LTF</i>	F	GAAGGTAGATTCCGGCGCTGTA	NM_180998.2
	R	CAGTTTCCCTGAGGTTCTTCAAG	
<i>OTR</i>	F	GTCAGCAACGTCAAGTCATCT	NM_174134.2
	R	AGACACTCCACATCTGCACGAA	
<i>PGR</i>	F	GCCGCAGGTCTACCAGCCCTA	NM_001205356.1
	R	GTTATGCTGTCCTTCCATTGCCCTT	
<i>PGRMC2</i>	F	CAGGGGAAGAACCCTCAGAA	NM_001099060.1
	R	ATGAAGCCCCACCAGACATT	
<i>SLC2A1</i>	F	ATCATCTTACCCTGCTCCTGGTT	NM_174602
	R	TGTCACTTTGACTTGCTCCTCCCT	
<i>IGFBP3</i>	F	AAAGAGATGTTTGAATGCCTAGTTTT	Voge et al. 2004
	R	TCAAACCTCGGTTTCACTGACTACTG	
<i>IGFBP4</i>	F	GAGGAAAGAATGTATGTGCCTGATG	Voge et al. 2004
	R	GACCACAAACGGAGGAGGAA	

476 F, Forward primer; R, Reverse primer.

477 **Figuras**

479 Figura 1: Delineamento experimental para avaliação dos efeitos da PGF sobre o
 480 ambiente folicular pré-ovulatório na presença de progesterona exógena. BE: benzoato
 481 de estradiol; P4: progesterona; eCG: gonadotrofina coriônica equina (400UI); PGF:
 482 prostaglandina; US: avaliação ultrassonográfica.

483



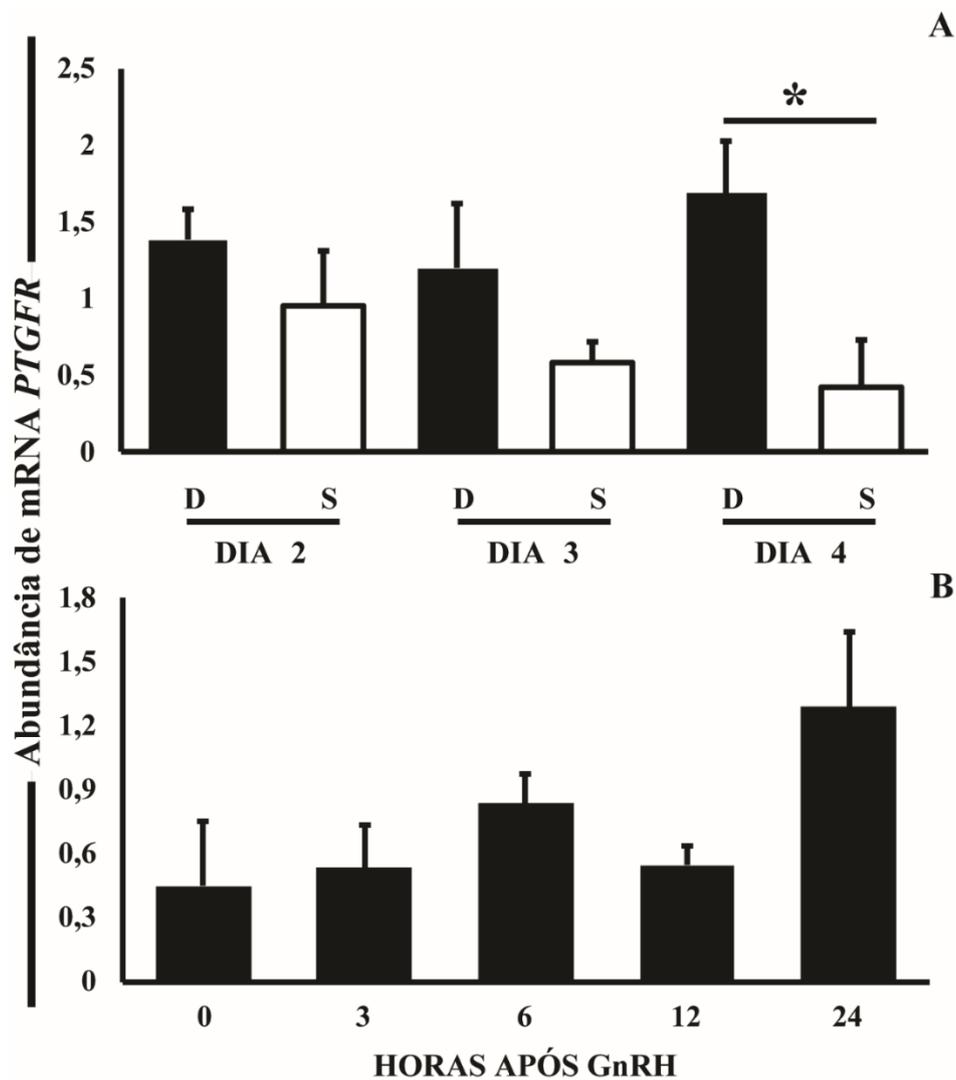
484

485 Figura 2: Delineamento experimental para avaliação dos efeitos da PGF sobre o

486 ambiente folicular na ausência de progesterona exógena (proestro/estro). BE: benzoato

487 de estradiol; P4: dispositivo intravaginal de progesterona; PGF: prostaglandina; US:

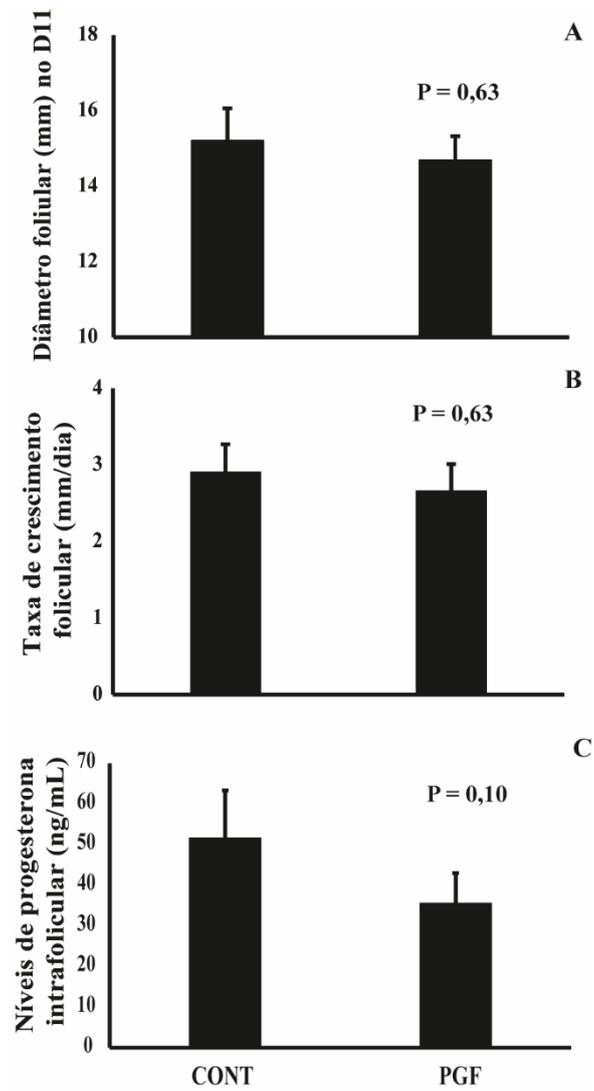
488 avaliação ultrassonográfica.



489

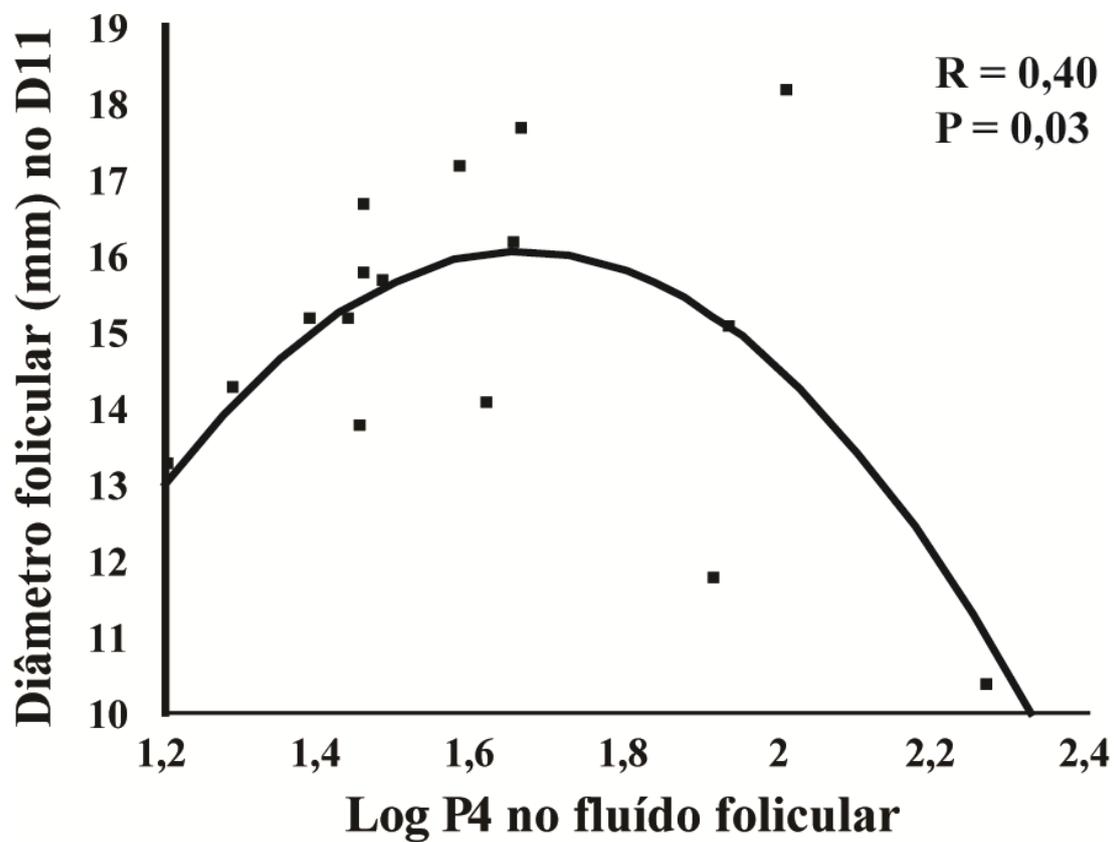
490 Figura 3: A) Abundância relativa do RNAm do receptor de PGF (*PTGFR*) nas células
 491 da granulosa de folículos dominantes (D) e subordinados (S) antes (Dia 2; n=4), durante
 492 (Dia 3; n=4) e após (Dia 4; n=6) a divergência folicular em bovinos. B) Expressão do
 493 receptor de *PTGFR* nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios 0, 3, 6, 12 e 24
 494 h (n=5 por momento) após tratamento com GnRH. *indica diferença estatística $P \leq$
 495 0,05.

496



497

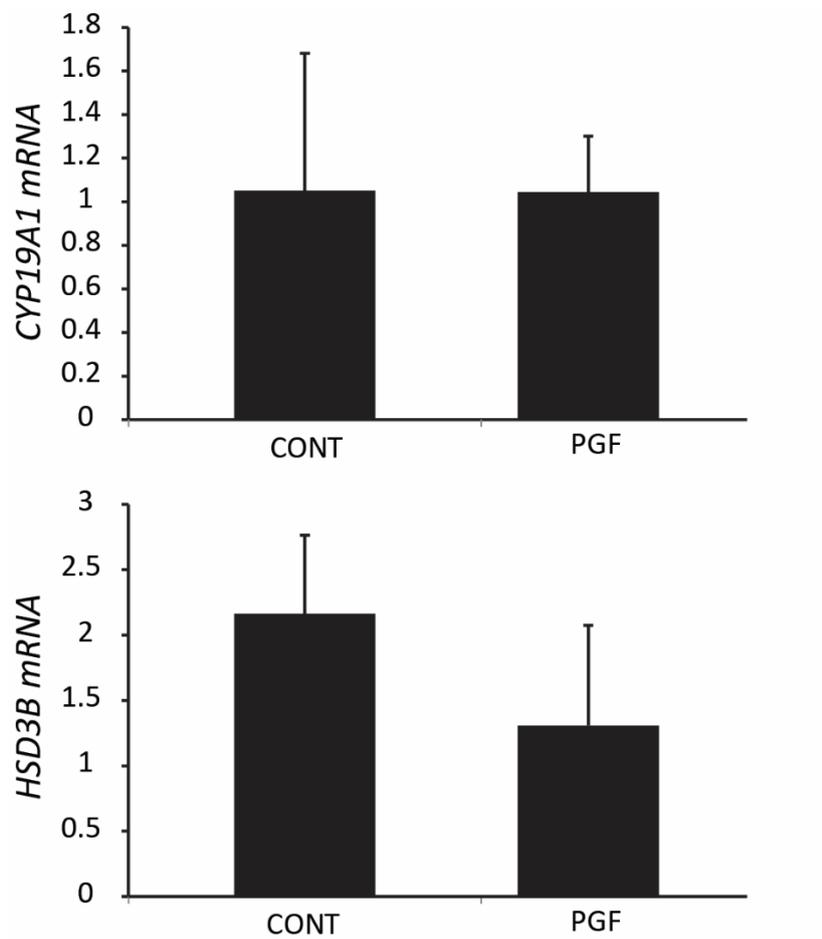
498 Figura 4: Diâmetro foliular (mm) (A), crescimento foliular (mm/dia) (B) e
499 concentração de progesterona no fluído foliular (ng/mL) (C) de vacas não tratadas
500 (CONT) ou tratadas com PGF i.m. (PGF) na presença de progesterona exógena.



501

502 Figura 5: Correlação entre os níveis de progesterona no fluido folicular e diâmetro

503 folicular em vacas na presença de progesterona exógena.

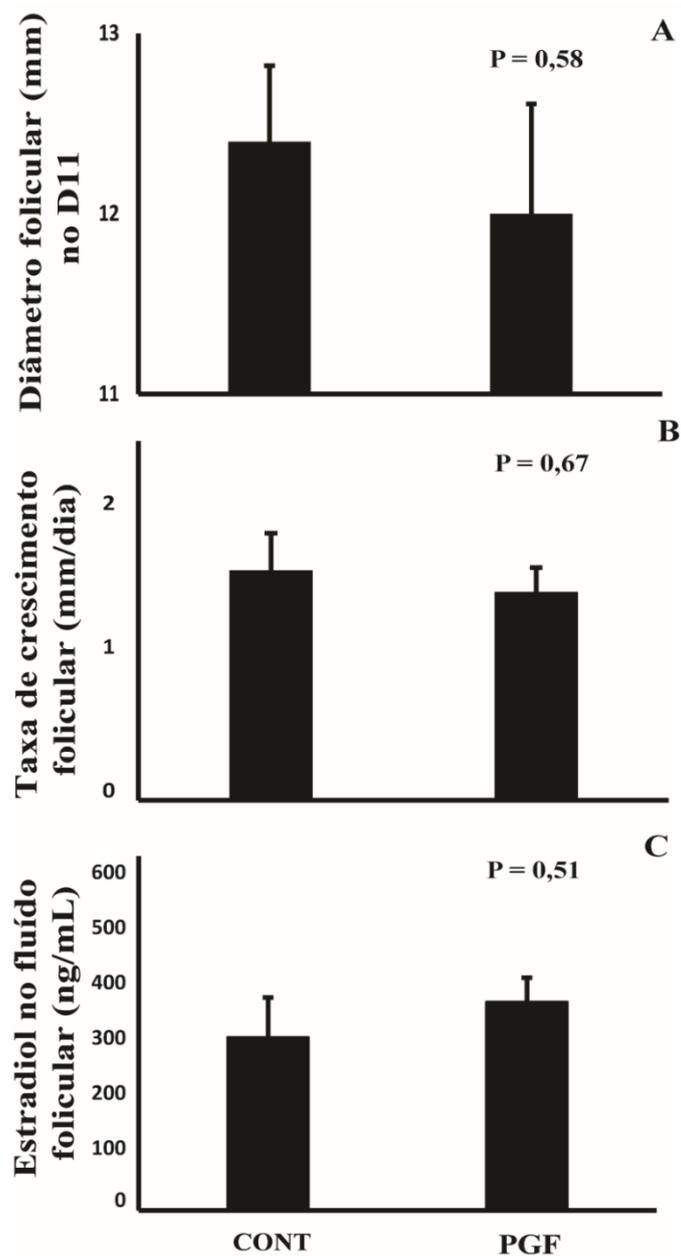


504

505 Figura 6: Abundância relativa de RNAm dos genes *CYP19A1* e *HSD3B* nas células da

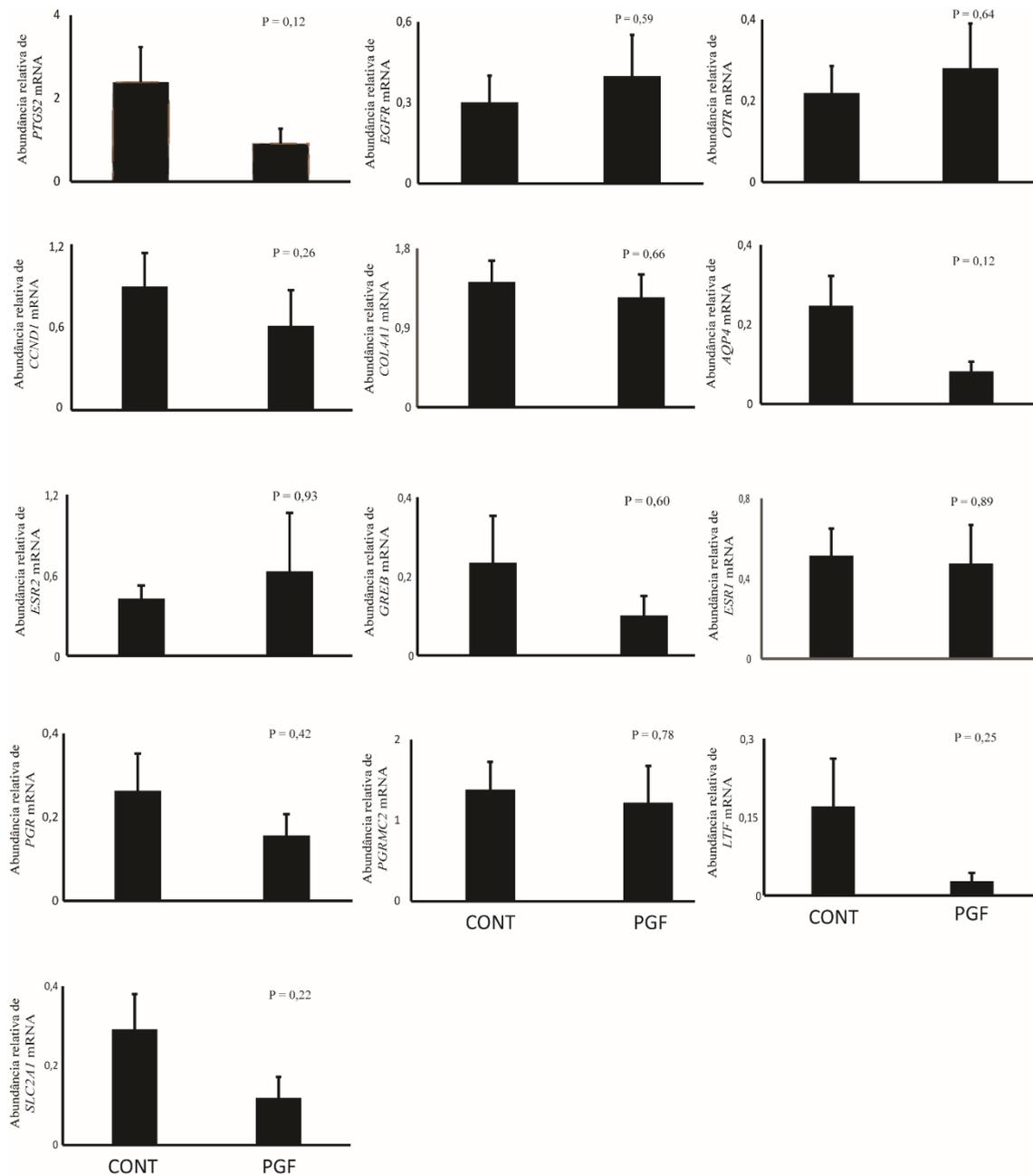
506 granulosa em vacas não tratadas (CONT) ou tratadas com PGF i.m. (PGF) na presença

507 de progesterona exógena.



508

509 Figura 7: Diâmetro folicular (mm) no D11 (A), taxa de crescimento folicular diário
510 (mm/dia) (B) e concentração de estrógeno no fluido folicular (ng/mL) (C) de vacas não
511 tratadas (CONT) ou tratadas com PGF i.m. (PGF) na ausência de progesterona exógena
512 (proestro/estro).



513

514 Figura 8: Abundância relativa de RNAm das células endometriais coletadas por biopsia
 515 de vacas não tratadas (CONT) ou tratadas com PGF i.m. (PGF) na ausência de
 516 progesterona exógena (proestro/estro).

3.3 Artigo 3

Efeito do estradiol sobre células endometriais bovina *in vivo* e *in vitro*

Oliveira, F.C.; Rovani, M.T.; Gasperin, B.G.; Mesquita, F.S.; Binelli, M.; Gonçalves,
P.B.D.; Duggavathi, R.; Bordignon, V.; Lucia Jr, T.

Será submetido à revista *Reproduction*

1 **Efeito do estradiol sobre células endometriais bovinas *in vivo* e *in vitro***

2

3 Oliveira, F.C.¹; Rovani, M.T.²; Gasperin, B.G.¹; Mesquita, F.S.³; Binelli, M.⁴;

4 Gonçalves, P.B.D.⁵; Duggavathi, R.⁶; Bordignon, V.⁶; Lucia Jr, T.^{1*}

5

6 ¹ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS,

7 Brasil;

8 ²Instituto Federal Farroupilha, Frederico Westphalen, RS, Brasil;

9 ³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil;

10 ⁴Department of Animal Sciences, University of Florida, Gainesville, United States;

11 ⁵BioRep, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria,

12 RS, Brasil;

13 ⁶Department of Animal Science, McGill University, Montreal, Canada.

14

15 Autor para correspondência:

16 Thomaz Lucia Jr: ReproPEL, Departamento de patologia animal, Universidade Federal

17 de Pelotas, Campus Capão do Leão S/N, 96010900 - Capão do Leão, RS – Brasil.

18 Email: tluciajr@gmail.com

19

20 **Título curto: Efeito do estradiol sobre o endométrio bovino**

21

22 **Resumo:** Apesar do estradiol (E2) estar relacionado com a fertilidade em bovinos, não
23 se conhece quais mecanismos endometriais são modulados por esse hormônio. Para isso
24 foram investigados, *in vivo* e *in vitro*. Para os experimentos *in vivo*, as vacas foram

25 estratificadas de acordo com níveis distintos de E2 no fluído folicular pré-ovulatório
26 (alto, 945 ng/mL ou baixo, 186 ng/mL). No tecido endometrial coletado por biopsia,
27 houve maior expressão do *PPARG* e uma tendência da *PTGS2* nos animais com baixo
28 nível de E2 e uma maior expressão do *OTR* nos animais com alto nível de E2. Foi
29 observada correlação positiva entre o nível de E2 e a expressão de *OTR* ($R^2=0,44$;
30 $P=0,005$), *LTF* ($R^2=0,36$; $P=0,01$), *GREB1* ($R^2=0,33$; $P=0,03$) e *IGFBP-3* ($R^2=0,30$;
31 $P=0,02$). O estudo *in vitro*, utilizando linhagem celular de epitélio endometrial bovino,
32 identificou uma ativação da MAPK 10 minutos após tratamento com E2 e uma ativação
33 da AKT. A expressão gênica das células demonstrou uma redução da expressão dos
34 genes *PPARG*, após 6h, e *CCND1*, *CCND2* e *PIAS3* após 12h ($P\leq 0,05$). Também houve
35 aumento na expressão de *PCNA*, 12 e 24h após tratamento com E2 ($P\leq 0,05$). Estes dados
36 indicam um efeito do E2 sobre a multiplicação celular, confirmada através da redução
37 do MTS, maior nas células tratadas com 20 e 200 pg/mL de E2, sendo um bom modelo
38 para estudar os efeitos do estradiol especificamente sobre o epitélio endometrial. Os
39 genes regulados *in vivo* podem ser definidos como mediadores dos efeitos do E2 sobre o
40 ambiente uterino.

41 **Palavras-chave:** Ambiente uterino, fertilidade, proestro/estro, epitélio endometrial.

42

43 **Introdução**

44 Devido à alta exigência por eficiência reprodutiva, a infertilidade é um problema
45 na bovinocultura, em função da elevação das taxas de repetição de serviços (*repeat*
46 *breeding*), principalmente na atividade leiteira. Esta condição pode ser relacionada à
47 falhas em diversos processo reprodutivos, tais como: ovulação (López-Gatiús et al.,
48 2005; Wiltbank et al., 2002); fertilização (Sartori et al., 2002); ambiente uterino (Gani et

49 al., 2008); reconhecimento embrio-materno (Madsen et al., 2015); ou fase luteal
50 insuficiente (Kimura et al., 1987). A duração da fase estrogênica do ciclo estral na vaca,
51 importante nos protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas de
52 corte (Carvalho et al., 2008), está relacionada com a duração do proestro e do estro e
53 com as concentrações de estradiol (E2) durante a fase pré-ovulatória. A utilização de
54 protocolos hormonais que proporcionam um prolongado período de proestro é uma
55 estratégia importante para o incremento da fertilidade (Peres et al., 2009), com efeito
56 direto sobre a taxa de prenhez. Porém, os mecanismos de ação da exposição ao E2 que
57 podem ocorrer no ambiente uterino ou folicular ainda permanecem desconhecidos
58 (Binelli et al., 2014; Dadarwal et al., 2013). Bridges et al. (2010) observaram uma
59 relação positiva entre a duração da dominância folicular e do proestro sobre a expressão
60 de estro, a fertilidade e funções endócrinas em vacas, e em novilhas (Austin et al.,
61 1999).

62 As concentrações de E2 durante o proestro e estro parecem influenciar a função
63 folicular e, principalmente, o ambiente uterino. Durante o estro, vacas repetidoras de
64 serviço e com alta produção leiteira apresentaram menor expressão do fator de
65 crescimento epidermal (EGF; revisado por Katagiri e Moriyoshi (2013)) nas células
66 endometriais. Estas alterações foram restauradas após a suplementação de E2 exógeno,
67 o que repercutiu em aumento da taxa de prenhez (Katagiri e Takahashi, 2006). Madsen
68 et al. (2015) trabalhando com dosagem de E2 conhecida em vacas ovariectomizadas,
69 observaram sua importância durante o proestro, influenciando o reconhecimento
70 embrio-materno e a sobrevivência embrionária a partir do dia 7.

71 Tecnologias como a embrio-terapia (Dochi et al., 2008) fizeram com que vacas
72 repetidoras de serviço apresentassem maior taxa de prenhez do que vacas inseminadas

73 com cio base. Os níveis de E2 durante o período periovulatório estão associados ao pH
74 uterino, o que, em um protocolo de IATF em vacas de corte, afetou a taxa de prenhez e
75 foi responsivo a diferentes doses de E2 e tempos de proestro (Perry e Perry, 2008),
76 assim como a expressão gênica de importantes fatores que podem influenciar o
77 desenvolvimento posterior do concepto (Araújo et al., 2015; Binelli et al., 2015). Assim,
78 fica evidente a importância dos níveis de E2 no período de proestro/estro para a função
79 reprodutiva. Os objetivos do presente estudo foram: (1) investigar fatores relacionados
80 ao ambiente uterino, especificamente, genes diferentemente expressos nas células
81 endometriais durante o período periovulatório em vacas com diferentes níveis de E2
82 intrafolicular; e (2) isolar o efeito específico do E2 sobre as células do epitélio
83 endometrial bovino *in vitro*.

84

85 **Material e métodos**

86 Todos os experimentos envolvendo procedimentos em animais foram submetidos
87 e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA-UFPEL; processo
88 #8447/2015)

89

90 *Experimento 1: Efeito do estradiol fisiológico sobre o ambiente uterino*

91 Este estudo foi conduzido em uma fazenda comercial, usando 20 vacas de corte
92 (Hereford X Aberdeen Angus) adultas e cíclicas, com idade entre 5-9 anos e condição
93 corporal de 3 (escala 1-5; 1=caquético e 5=obeso), mantidas em pastagem natural, com
94 livre acesso à água e sal mineral. Os animais tiveram a onda folicular sincronizada
95 usando 2 mg de benzoato de E2 (Gonadiol- Zoetis, São Paulo, Brasil), associado à
96 inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1 mg de progesterona (P4; DIB-

97 Zoetis, São Paulo, Brasil) (D0). O DIV foi removido após 8 dias (D8) e as vacas
98 receberam 0,5 mg i.m. de Cloprostenol (Ciosin- MSD Animal Health, São Paulo,
99 Brasil). A expressão de estro foi monitorada diariamente, assim como as estruturas
100 ovarianas, por ultrassonografia transretal, usando transdutor linear de 6-MHz (Pie
101 Medical AguilaVet, Maastricht, Holanda). Amostras de tecido endometrial foram
102 coletadas por biópsia no D10 (momento esperado de proestro/estro). O procedimento
103 para biópsia foi conduzido sobre anestesia epidural baixa (80 mg cloridrato de
104 lidocaína; 4 mL de lidocaína 2%), usando uma pinça para biópsia específica, conforme
105 Chapwanya et al. (2010). Neste momento também foi coletado fluído folicular do
106 folículo dominante pré-ovulatório por aspiração (*ovum pick up* – OPU). A OPU foi
107 conduzida via transvaginal, guiada por ultrassonografia usando transdutor
108 microconvexo de 6 MHz. As amostras de tecido endometrial foram coletadas do corno
109 uterino ipsilateral ao ovário com a estrutura pré-ovulatória. As amostras foram mantidas
110 a -196°C até a extração de RNA para as análises de qPCR.

111

112 *Experimento 2: Efeito do estradiol sobre células de epitélio endometrial bovino in vitro*

113 Foi usado um cultivo estabelecido de células de epitélio endometrial bovino
114 (BEnEpC; Sigma B932-05), mantidas em placas de 75 cm² em ambiente com 5% CO₂ a
115 37°C, em meio de cultivo específico (meio de crescimento para endométrio bovino;
116 B911-500), trocado a cada 48 h até a confluência das células. Após a confluência, as
117 células foram removidas usando solução tripsina-EDTA (Sigma T3924) e
118 posteriormente tratadas com inibidor de tripsina (Sigma T6414). Após multiplicações,
119 as células (em quinta passagem) foram semeadas em placa de 24 poços, com 2,5x10⁴
120 células por poço (12,5x10³ células por cm²), mantidas por 42 h para condicionamento.

121 Previamente ao tratamento, as células tiveram o meio de crescimento lavado por 6 h
122 com meio basal (Sigma B910-500) para remoção dos fatores de crescimento contidos
123 no meio. O tratamento foi realizado com 17β -estradiol (Sigma E2758), diluído
124 inicialmente conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, a solução estoque
125 foi diluída em meio basal para obtenção das concentrações finais de 0, 20 e 200 pg/mL.
126 Inicialmente, as células foram expostas ao meio contendo os tratamentos por 5, 10, 15,
127 30 e 60 min, sendo posteriormente recuperadas em *Laemmli buffer* para quantificação
128 proteica através da técnica de western blot (WB), em quatro replicações.

129 Para testar o efeito dos tratamentos sobre a expressão gênica, foram semeadas
130 5×10^4 células por poço em placa de 24 poços (25×10^3 células por cm^2), as quais foram
131 mantidas em meio de crescimento por 48 h e lavadas em meio basal por 1 h. O
132 tratamento foi realizado com 17β -estradiol (Sigma E2758), diluído em meio basal, em
133 concentrações de 0, 20 e 200 pg/mL durante 6, 12 ou 24 h, em quatro replicações.
134 Ainda, para quantificação proteica por WB, as células foram tratadas com 0 ou 200
135 pg/mL de estradiol por 6 ou 24 h, em 3 replicações.

136

137 *Experimento 3: Avaliação da multiplicação celular (redução de MTS-Tetrazolium)*

138 Para análise de multiplicação celular por redução do MTS (CellTiter 96® -
139 G3582; Promega, Madison, USA), foram semeadas $7,5 \times 10^3$ de células BEnEpC
140 ($3,75 \times 10^3$ células por cm^2) em placa de 24 poços, mantidas em meio de crescimento por
141 72 h para avaliação, conforme instruções do fabricante. Após este período, as células
142 foram incubadas com o reagente contendo MTS (20 μl para 100 μl de meio) por 1 h
143 para redução do substrato. Posteriormente, o meio foi retirado, centrifugado (1×10^4 rpm
144 por 5 min) para retirada de eventuais células, e transferido para placa de 96 poços para

145 leitura em espectrofotômetro a 492 nm. A eficiência do teste foi testada através de uma
146 correlação entre diluições seriadas e conhecidas da BEnEpC e a absorbância observada.
147 As diluições seriadas de células BEnEpC (0, 2,5, 5, 10 e 20 x10³ células por poço)
148 foram semeadas em placa de 48 poços, com 100 µl de meio de crescimento (B911-500)
149 por 12 h para aderência celular. Após, foram adicionados 20 µl do reagente contendo
150 MTS por 3 h, conforme recomendações do fabricante. A leitura da absorbância foi
151 realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

152

153 *Extração de RNA, transcriptase reversa e PCR quantitativo*

154 O RNA total das células endometriais e do cultivo celular foram extraídos usando
155 Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo com instruções do fabricante. A
156 quantificação e estimativa de pureza do RNA foi obtida por espectrofotômetro (Thermo
157 Scientific - Waltham, USA; Abs 260/280 nm ratio). Relações acima de 1,6 foram
158 consideradas puras, sendo descartadas amostras com relações menores. O cDNA foi
159 gerado usando 1 µg de RNA, tratado inicialmente com 0.1U de DNase para degradação
160 de contaminação com DNA genômico, e incubado posteriormente em uma solução final
161 de 20 µl com Kit iScript cDNA síntese (BioRad, Hercules, USA). O DNA
162 complementar foi sintetizado em 3 etapas a 25 °C – 5 min, 42 °C – 30 min e 85 °C – 5
163 min. O qPCR foi feito em termociclador em tempo real CFX384 (BioRad) usando
164 SsoFast EvaGreen supermix (BioRad, California, USA) (experimento *in vivo*) e
165 Mastermix com Supergreen Lo-Rox (Wisent, Montreal, CN) (experimentos *in vitro*),
166 com sequências de primers específicas para bovinos (Tabela 1) obtidos na literatura ou
167 desenhados usando Primer-BLAST. A variabilidade na quantidade de RNAm foi
168 acessada em relação à amplificação dos genes referência *RPL19* (F:

169 GCCAACTCCCGTCAGCAGA; R: TGGCTGTACCCTTCCGCTT), *H2A HISTONE*
170 (F: GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG; R: TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC), *B2M*
171 (F: GCGTCCTCCAAAGATTCAAG; R: CAGGTCTGACTGCTCCGATT), *RPL0* (F:
172 GGCGACCTGGAAGTCCAACCT; R: CCATCAGCACCACAGCCTTC), *PPIB* (F:
173 GGTCATCGGTCTCTTTGGAA; R: TCCTTGATCACACGATGGAA), *18S rRNA* (F:
174 CCTTCCGCGAGGATCCATTG; R: CGCTCCCAAGATCCAACCTAC) e *GAPDH* (F:
175 ACAGTCAAGGCAGAGAACGG; R: CCAGCATCACCCCACTTGAT), selecionados
176 conforme valores de estabilidade (CFX manager, Software versão 3.0). As curvas para
177 eficiência da reação foram geradas com, no mínimo, quatro pontos em duplicata.

178

179 *Extração proteica e western blot*

180 A extração de proteína foi realizada com *Laemmli buffer* (Laemmli, 2-
181 Mercaptoethanol) contendo inibidores de fosfatases e proteases. As amostras foram
182 aquecidas a 95°C durante 5 min, previamente à corrida dos géis. As corridas foram
183 realizadas em gel de poliacrilamida (10%) para eletroforese. Posteriormente, as
184 proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Após bloqueio por 2 h
185 com 5% de leite em pó em TBS-T (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1%, 0,1% Tween 20,
186 pH 7,6), as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C, em constante agitação com o
187 anticorpo primário. As membranas foram lavadas três vezes (5 min/lavagem) em TBS-T
188 e, posteriormente, expostas ao anticorpo secundário por 1 h a temperatura ambiente,
189 com constante agitação. Após, foram realizadas três lavagens por 5 min em TBS-T. As
190 proteínas foram reveladas pela detecção com Immun-Star Western Chemiluminescence
191 Kit (BioRad), e visualizadas usando Chemidoc system (BioRad). Após as revelações, as
192 membranas foram incubadas com *stripping buffer* (Thermo #21059), conforme

193 recomendações do fabricante, e submetidas a novo bloqueio, com repetição das demais
194 etapas posteriores, conforme acima descrito. As membranas foram expostas aos
195 anticorpos para detecção de formas fosforiladas, formas totais e, posteriormente, ao
196 anticorpo anti-actina. As bandas proteicas tiveram a intensidade de sinal mensurada no
197 software ImageLab 6.0 (BioRad).

198 Foram utilizados os seguintes anticorpos: pAKT (#2965; diluição 1:1000), tAKT
199 (#9272; diluição 1:1000), pMAPK (#4695; diluição 1:1000), tMAPK (#4695; diluição
200 1:1000), pSTAT3 (#9131), tSTAT3 (#9132; diluição 1:1000), todos obtidos da Cell
201 Signaling Technology (Danvers, MA, USA); *goat anti-rabbit* (ab-6721; diluição
202 1:10000), *rabbit anti-mouse* (ab6728; diluição 1:10000), receptor de progesterona
203 (ab2765; diluição 1:1000), ESR1 (ab16460; diluição 1:500) e beta-actina (ab-8227;
204 diluição 1:1000) da Abcam Inc. (Toronto, ON, Canada); *donkey anti-goat* (sc-2033;
205 diluição 1:10000) e FGF-2 (SC-79; diluição 1:1000) da Santa Cruz Biotechnology
206 (Dallas, TX, USA). O peso molecular das bandas observadas foi estimado através da
207 comparação com um marcador de peso molecular (Precision Plus Protein, #161-0373,
208 BioRad Laboratory).

209

210 *Dosagem de estradiol*

211 As amostras de fluido folicular foram coletadas e imediatamente centrifugadas a
212 1000 G por 10 min e estocadas individualmente em duplicatas a -196°C. A
213 concentração do estradiol intrafolicular foi determinada por teste de
214 quimioluminescência (Roche, Brasil) (Bossaert et al., 2008). Os coeficientes intra- e
215 interensaio demonstraram variação < 10 %.

216

217 *Análise estatística*

218 As análises estatísticas foram conduzidas usando o software JMP (SAS Institute
219 Inc., Cary, USA). A distribuição dos dados foi testada com o teste Shapiro-Wilk, sendo
220 os mesmos normalizados quando necessário. Os dados contínuos foram submetidos à
221 ANOVA, com comparação de médias por Tukey. Associações lineares entre os níveis
222 intra-foliculares de estradiol e a abundância relativa dos genes em amostras de biopsia
223 endometrial e entre o número conhecido de células e a absorbância foram estimadas por
224 coeficientes de correlação de *Pearson*.

225

226 **Resultados**

227 *Experimento 1: Efeito do estradiol fisiológico sobre o ambiente uterino*

228 As vacas utilizadas neste experimento foram classificadas em dois grupos de
229 acordo com a concentração intrafolicular de E2: alto, com média de 945 ± 126 ng/mL (n
230 = 5); e baixo, com média de 186 ± 26 ng/mL. A concentração diferiu entre os dois
231 grupos ($P < 0,05$). Considerando todas as vacas, a concentração média foi de 488 ± 90
232 ng/mL. Nas biopsias endometriais, a expressão de *OTR* foi maior ($P \leq 0,05$) nas vacas
233 com alto E2, mas a expressão de *PPARG* foi maior ($P = 0,08$) nas vacas com baixo E2
234 (Figura 1). A expressão de *PTGS2* não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$).

235 Foram observadas correlações positivas ($P \leq 0,05$) entre os níveis intrafoliculares
236 de E2 e a expressão dos genes *OTR* ($R = 0,44$), *LTF* ($R = 0,36$), *GREB1* ($R = 0,33$) e
237 *IGFBP-3* ($R = 0,30$) (Figura 2). No entanto, não houve correlação ($P > 0,05$) entre a
238 concentração intrafolicular de E2 e a expressão dos genes *AQP4*, *CCND1*, *COL4A1*,
239 *PTGS2*, *EGFR*, *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *PGRMC2*, *SLC2A1* e *IGFBP-4*.

240

241 *Experimento 2: Efeito do estradiol sobre células de epitélio endometrial bovino in vitro*

242 A ausência de marcação para a proteína FGF2, presente em cultivo primário de
243 endométrio bovino, permitiu verificar a ausência de fibroblastos do estroma
244 endometrial. A MAPK apresentou maior fosforilação para o tratamento com 200 pg/mL
245 aos 10 min ($P \leq 0,05$), retornando a níveis inferiores ao controle nos 15 min (Figura 3).
246 A fosforilação de AKT diminuiu 30 e 60 min após o tratamento com E2 ($P \leq 0,05$).
247 Houve menor abundância de RNAm após 6 h para *PPARG*, e após 12 h para *CCND1*,
248 *CCND2* e *PIAS3* ($P \leq 0,05$). A expressão de *PCNA* elevou-se ($P \leq 0,05$) 12 e 24 h após
249 o tratamento com E2 (Figura 4). O tratamento com E2 não influenciou os genes *OTR*,
250 *RELA*, *COL4A1*, *PGT*, *LIFR*, *LIF*, *PGRMC1*, *IMPDH2*, *IGFBP-2*, *PRKAr2b*, *XIAP*,
251 *ESR1*, *PGR* e *EGFR* ($P > 0,05$). Ainda, o tratamento com E2 por um período de 6 ou 24
252 h não alterou ($P \leq 0,05$) a fosforilação proteica de AKT, MAPK e STAT3 (Figura 5).

253 O teste de redução do MTS demonstrou uma adequada curva de eficiência,
254 quando utilizado com uma quantidade conhecida de células (Figura 6A), com elevada
255 correlação positiva ($R = 0,949$) entre a absorvância e o número de células ($P = 0,004$). O
256 tratamento com E2 induziu redução do MTS pelas células de epitélio endometrial
257 bovino (Figura 6B), uma vez que o grupo controle apresentou menor número de células
258 ou menor atividade celular ($P \leq 0,05$),

259

260 **Discussão**

261 O presente estudo demonstrou o efeito do E2 sobre a expressão gênica de células
262 endometriais bovinas, identificando genes potencialmente envolvidos neste efeito e
263 abrindo possibilidades para o seu uso em tratamentos direcionados ao ambiente uterino.
264 A regulação do E2 sobre a expressão de *OTR* no endométrio foi relatada anteriormente

265 como um processo fisiológico (Lamming e Mann, 1995), que ocorre durante o final do
266 diestro em ruminantes (Stevenson et al., 1994), tendo uma importante regulação por
267 progesterona e E2 (Bishop, 2013). A expressão do *PPARG* no endométrio é regulada
268 durante o ciclo estral em bovinos (Socha et al., 2017). Em suínos, o *PPARG* possui
269 efeito sobre o conceito, tendo sua expressão relacionada ao alongamento prévio à
270 implantação (Blitek e Szymanska, 2017). A maior expressão do *PPARG* no endométrio
271 de vacas com baixos níveis de E2 intrafolicular sugere um efeito gerado
272 fisiologicamente, mas que também pode ser modulado por suplementação exógena de
273 E2, que pode afetar os processos reprodutivos ligados ao endométrio e ao
274 desenvolvimento embrionário em bovinos. O *PPARG* pode estar envolvido na regulação
275 do metabolismo lipídico e na síntese de prostanoídes como as prostaglandinas, que
276 afetam o conceito e as células endometriais em bovinos, durante o período de
277 alongamento do embrião (Ribeiro et al., 2016a; 2016b). Os mesmos autores observaram
278 uma correlação positiva entre a expressão de *PPARG* e *PTGS2*, que não foi confirmada
279 no presente estudo.

280 As correlações positivas entre a expressão gênica de biópsias endometriais com os
281 níveis de E2 intrafolicular sugerem candidatos envolvidos na modulação que o E2
282 exerce sobre o ambiente uterino. O gene lactotransferrin (*LTF*) é uma glicoproteína de
283 ligação ao ferro, secretada por células epiteliais que atua, entre suas variadas funções, na
284 modulação do sistema imune (Levay e Viljoen, 1995). O *LTF* foi identificado no
285 endométrio de ratos durante a fase estrogênica, sendo regulado nesta espécie pelos
286 níveis de E2 (Teng, 1999), de forma similar ao observado no presente estudo *in vivo*. O
287 E2 também foi positivamente correlacionado com a expressão do *gene growth*
288 *regulation by estrogen in breast cancer 1 (GREB1)* que desempenha papel importante

289 na proliferação dependente de E2 em células da glândula mamária e do endométrio em
290 mulheres (Pellegrini et al., 2012). Sua presença no endométrio de vacas, associada à sua
291 ligação ao E2, pode ser um fator gerador de multiplicação celular associado à renovação
292 do epitélio. O *IGFBP3* codifica uma proteína que é considerada, assim como o IGF1,
293 como um dos principais reguladores do sistema IGF em bovinos, pois o *IGFBP3* se liga
294 a 90% dos IGFs circulantes, regulando o metabolismo local da glicose, sendo capaz de
295 deprimir a esteroidogênese (Bossis et al., 1999). É importante ressaltar que o modelo
296 utilizado apresenta limitações em decorrência do procedimento de coleta, em função do
297 local específico de obtenção das amostras e da diferença de expressão que existe entre
298 diferentes regiões do endométrio (Sponchiado et al., 2017). A heterogeneidade das
299 amostras obtidas devido a diferentes proporções de células do epitélio e de estroma
300 colhidas no procedimento de biópsia podem interferir nos resultados obtidos
301 (Winuthayanon et al., 2017). Ainda, como os níveis sistêmicos de E2 são influenciados
302 pela síntese ovariana e pelo metabolismo, os níveis intrafoliculares não necessariamente
303 representam os níveis de E2 aos quais as células endometriais são expostas.

304 A validação de um modelo de estudo *in vitro* abre várias possibilidades para
305 evoluir no conhecimento das interações que ocorrem no endométrio bovino,
306 especificamente relacionadas às células epiteliais. Além disso, o modelo permite isolar
307 o efeito do E2, sem que ocorra uma resposta derivada das células do estroma. Segundo
308 Winuthayanon et al. (2017), a interação entre as células do estroma e do epitélio
309 endometrial é importante na resposta ao E2, pois ratos que tiveram o receptor *Esr1*
310 deletado nas células de estroma não apresentaram multiplicação celular do epitélio em
311 resposta ao tratamento com E2. O modelo celular utilizado não apresentou marcação da
312 proteína FGF2 em *Western blot*. Porém, esta marcação foi observada de forma marcante

313 em um cultivo celular piloto de biópsia endometrial mista, com células epiteliais e
314 fibroblásticas de estroma.

315 No modelo *in vitro*, a redução da expressão de *CCND1* e *CCND2*, associada ao
316 aumento na expressão de *PCNA*, pode estar relacionada ao processo de multiplicação
317 celular e à fase da divisão em que as células se encontram no momento das avaliações.
318 O aumento na multiplicação celular é atribuído ao E2, porém era desconhecido em
319 cultivo celular específico de células do epitélio endometrial bovino. Segundo Matsuoka
320 et al. (1994), a expressão de *PCNA* está associada ao processo de multiplicação e
321 reparação do DNA que ocorre durante a multiplicação celular. Sua expressão é
322 dependente da redução do complexo ciclina D1. A regulação exercida pelo E2 sobre a
323 expressão de *PIAS3* pode gerar um efeito sobre a inibição da fosforilação da STAT3
324 (Chung et al., 1997) e a expressão de *RELA* (Jang et al., 2004), que não ocorreram nos
325 modelos deste estudo.

326 O efeito observado sobre a fosforilação de MAPK e de AKT é imediato, de rápida
327 ativação e transitório. A MAPK teve maior fosforilação para o tratamento 200 pg/ml
328 aos 10 min, com posterior declínio após 15 e 30 min. Este efeito rápido e transitório já
329 foi relatado em cultivo de células endometriais humanas, em resposta a tratamento com
330 E2 (Seval et al., 2006). Para o AKT, observou-se uma redução na fosforilação após 30 e
331 60 min nos tratamentos com 20 e 200 pg/mL de E2. O pAKT foi relatado como sendo
332 menos presente no endométrio de ratos em sua forma fosforilada e total durante o estro,
333 tendo sua redução relacionada ao mecanismo de proteção das células endometriais
334 durante a fase estrogênica (Dery et al., 2003). A fosforilação do AKT foi observada
335 após 5 e 15 min no tratamento com E2 em linhagem celular de estroma endometrial de
336 mulheres, apresentando efeito independente do bloqueio dos receptores ESR1 e ESR2

337 (Guzeloglu Kayisli et al., 2004). O AKT foi considerado um mediador do efeito de
338 multiplicação celular ocasionado pelo E2 em camundongos, neste caso, especificamente
339 sobre células do epitélio endometrial. Porém, *in vivo*, tendo as células de estroma de
340 suporte (Zhu e Pollard, 2007), é possível que a relação de células de estroma e epiteliais
341 seja necessária para obter um efeito de ativação do AKT em resposta ao E2, o que não
342 ocorreu com um cultivo específico de células epiteliais.

343 A fosforilação da STAT possui distintas funções em diferentes tecidos, podendo
344 regular apoptose, diferenciação e multiplicação celular (Richard and Stephens, 2011). A
345 STAT está associada a processos de apoptose e morte celular durante a involução do
346 tecido mamário em camundongos (Chapman et al., 1999) e durante a divergência de
347 folículos bovinos, estando ativada nas células da granulosa de folículos subordinados
348 (Gasperin et al., 2015). Porém, a STAT também está relacionada a processos de
349 multiplicação celular em linhagem celular de melanomas (Sakaguchi et al., 2012),
350 inibindo a ocorrência de apoptose em linhagem celular de câncer hepático (Liu et al.,
351 2010). Em células de epitélio endometrial bovino, a fosforilação constante da STAT3
352 parece não estar relacionada a processos de apoptose e não foi modulada pelo
353 tratamento com E2 nos momentos avaliados.

354 O efeito observado no teste de redução do MTS após o tratamento com diferentes
355 concentrações de E2 pode ser atribuído a uma maior quantidade de células, decorrente
356 de uma maior atividade de multiplicação, ou de uma maior atividade celular induzida
357 pelo E2. O aumento na multiplicação celular em decorrência do E2 é relatado como
358 uma das principais causas de endometriose em mulheres (Schats et al., 1984). Apesar da
359 correlação positiva entre a expressão dos genes *LTF*, *GREB1* e *IGFBP3* com os níveis
360 de E2 *in vivo*, estes genes não foram regulados pelo tratamento com E2 no cultivo de

361 células de epitélio endometrial. Esta mediação gênica e seus efeitos podem estar
362 relacionados com a interação entre as células endometriais do estroma e do epitélio
363 uterino no endométrio, como demonstrado em camundongos com deleção do *Esr1* nas
364 células de estroma na região anti-mesometrial, que resultou na inibição da multiplicação
365 das células epiteliais após tratamento com E2 (Winuthayanon et al., 2017).

366 Em conclusão, o presente estudo identificou importantes genes regulados
367 fisiologicamente pelo E2 no endométrio de bovinos, candidatos a mediadores de efeitos
368 positivos do E2 sobre o ambiente uterino. O modelo de cultivo celular do epitélio
369 endometrial bovino foi capaz de isolar a resposta específica dessas células ao E2. O
370 modelo *in vitro* identificou o efeito mediador da MAPK, associado à modulação de
371 genes que indicam proliferação celular, confirmada pelo aumento da atividade celular
372 em resposta ao tratamento com doses fisiológicas de E2.

373

374 **Declaração de interesse**

375 Nenhum dos autores possui conflito de interesse.

376 **Financiamento**

377 Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e
378 Desenvolvimento (CnPQ-Brasil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do
379 Sul (FAPERGS-Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
380 (CAPES-Brasil) e Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC-
381 Canada).

382

383

384 **Agradecimentos**

385 À McGill University pelo provimento das estruturas laboratoriais para condução
386 do estudo, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
387 (CAPES), pela concessão de bolsa no Brasil e exterior para F.C. Oliveira (Edital
388 PDSE/CAPES nº 19/2016) na McGill University.

389

390 **Bibliografia:**

391 **Araújo, ER, M Sponchiado, G Pugliesi, V Van Hoeck, FS Mesquita, CMB**

392 **Membrive, and M Binelli** 2015 Spatio-specific regulation of endocrine-
393 responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine
394 reproductive tract. *Reproduction, Fertility and Development* **28** 1533.

395 **Austin, E, M Mihm, M Ryan, D Williams, and J Roche** 1999 Effect of duration of
396 dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J*
397 *Anim Sci* **77** 2219.

398 **Binelli, M, G Pugliesi, VV Hoeck, M Sponchiado, RS Ramos, ML Oliveira, MR**

399 **França, FL D’Alexandri, FS Mesquita, and CMB Membrive** 2014 The role
400 of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Animal*
401 *Reproduction* **v.11** 246-253.

402 **Binelli, M, SC Scolari, G Pugliesi, V Van Hoeck, AM Gonella-Diaza, SC Andrade,**

403 **GR Gasparin, and LL Coutinho** 2015 The transcriptome signature of the
404 receptive bovine uterus determined at early gestation. *PLoS One* **10** e0122874.

405 **Bishop, CV** 2013 Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium.

406 *Frontiers in neuroscience* **7**.

- 407 **Blitek, A, and M Szymanska** 2017 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)
408 isoforms are differentially expressed in peri-implantation porcine conceptuses.
409 *Theriogenology* **101** 53-61.
- 410 **Bossaert, P, JL Leroy, S De Vliegher, and G Opsomer** 2008 Interrelations between
411 glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first
412 ovulation in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci* **91** 3363-3371.
- 413 **Bossis, I, RP Wettemann, SD Welty, JA Vizcarra, LJ Spicer, and MG Diskin** 1999
414 Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine
415 function preceding cessation of ovulation. *J Anim Sci* **77** 1536-1546.
- 416 **Bridges, G, M Mussard, C Burke, and M Day** 2010 Influence of the length of
417 proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci*
418 **117** 208-215.
- 419 **Carvalho, JBP, NAT Carvalho, EL Reis, M Nichi, AH Souza, and PS Baruselli**
420 2008 Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in Bos
421 indicus, Bos indicus × Bos taurus, and Bos taurus heifers. *Theriogenology* **69**
422 167-175.
- 423 **Chapman, RS, PC Lourenco, E Tonner, DJ Flint, S Selbert, K Takeda, S Akira,**
424 **AR Clarke, and CJ Watson** 1999 Suppression of epithelial apoptosis and
425 delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of
426 Stat3. *Genes Dev* **13** 2604-2616.
- 427 **Chapwanya, A, KG Meade, F Narciandi, P Stanley, JF Mee, ML Doherty, JJ**
428 **Callanan, and C O'Farrelly** 2010 Endometrial biopsy: a valuable clinical and
429 research tool in bovine reproduction. *Theriogenology* **73** 988-994.

- 430 **Chung, CD, J Liao, B Liu, X Rao, P Jay, P Berta, and K Shuai** 1997 Specific
431 inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* **278** 1803-1805.
- 432 **Dadarwal, D, R Mapletoft, G Adams, L Pfeifer, C Creelman, and J Singh** 2013
433 Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef
434 cattle after fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* **79** 859-866.
- 435 **Dery, M-C, V Leblanc, C Shooner, and E Asselin** 2003 Regulation of Akt expression
436 and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle.
437 *Reproductive Biology and Endocrinology* **1** 47.
- 438 **Dochi, O, K Takahashi, T Hirai, H Hayakawa, M Tanisawa, Y Yamamoto, and H**
439 **Koyama** 2008 The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-
440 breeding dairy cattle. *Theriogenology* **69** 124-128.
- 441 **Gani, M, M Amin, M Alam, M Kayesh, M Karim, M Samad, and M Islam** 2008
442 Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy
443 cows. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* **6** 79-86.
- 444 **Gasperin, BG, MT Rovani, R Ferreira, GF Ilha, V Bordignon, PBD Gonçalves,**
445 **and R Duggavathi** 2015 Functional status of STAT3 and MAPK3/1 signaling
446 pathways in granulosa cells during bovine follicular deviation. *Theriogenology*
447 **83** 353-359.
- 448 **Guzeloglu Kayisli, O, UA Kayisli, G Luleci, and A Arici** 2004 In Vivo and In Vitro
449 Regulation of Akt Activation in Human Endometrial Cells Is Estrogen
450 Dependent. *Biol Reprod* **71** 714-721.
- 451 **Jang, HD, K Yoon, YJ Shin, J Kim, and SY Lee** 2004 PIAS3 suppresses NF- κ B-
452 mediated transcription by interacting with the p65/RelA subunit. *Journal of*
453 *Biological Chemistry* **279** 24873-24880.

- 454 **Katagiri, S, and M Moriyoshi** 2013 Alteration of the Endometrial EGF Profile as a
455 Potential Mechanism Connecting the Alterations in the Ovarian Steroid
456 Hormone Profile to Embryonic Loss in Repeat Breeders and High-producing
457 Cows. *Journal of Reproduction and Development* **59** 415-420.
- 458 **Katagiri, S, and Y Takahashi** 2006 Potential relationship between normalization of
459 endometrial epidermal growth factor profile and restoration of fertility in repeat
460 breeder cows. *Anim Reprod Sci* **95** 54-66.
- 461 **Kimura, M, T Nakao, M Moriyoshi, and K Kawata** 1987 Luteal phase deficiency as
462 a possible cause of repeat breeding in dairy cows. *British Veterinary Journal*
463 **143** 560-566.
- 464 **Lamming, GE, and GE Mann** 1995 Control of endometrial oxytocin receptors and
465 prostaglandin F₂ alpha production in cows by progesterone and oestradiol. *J*
466 *Reprod Fertil* **103** 69-73.
- 467 **Levay, PF, and M Viljoen** 1995 Lactoferrin: a general review. *Haematologica* **80** 252-
468 267.
- 469 **Liu, Y, PK Li, C Li, and J Lin** 2010 Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-
470 apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells. *J Biol Chem* **285** 27429-
471 27439.
- 472 **López-Gatius, F, M López-Béjar, M Fenech, and R Hunter** 2005 Ovulation failure
473 and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. *Theriogenology* **63**
474 1298-1307.
- 475 **Madsen, CA, GA Perry, CL Mogck, RF Daly, MD MacNeil, and TW Geary** 2015
476 Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy
477 establishment in beef cows. *Anim Reprod Sci* **158** 96-103.

- 478 **Matsuoka, S, M Yamaguchi, and A Matsukage** 1994 D-type cyclin-binding regions
479 of proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry* **269** 11030-
480 11036.
- 481 **Pellegrini, C, I Gori, C Achtari, D Hornung, E Chardonens, D Wunder, M Fiche,**
482 **and GO Canny** 2012 The expression of estrogen receptors as well as GREB1,
483 c-MYC, and cyclin D1, estrogen-regulated genes implicated in proliferation, is
484 increased in peritoneal endometriosis. *Fertility and sterility* **98** 1200-1208.
- 485 **Peres, RFG, IC Júnior, OGS Filho, GP Nogueira, and JLM Vasconcelos** 2009
486 Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and
487 nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination.
488 *Theriogenology* **72** 681-689.
- 489 **Perry, G, and B Perry** 2008 Effects of standing estrus and supplemental estradiol on
490 changes in uterine pH during a fixed-time artificial insemination protocol. *J*
491 *Anim Sci* **86** 2928-2935.
- 492 **Ribeiro, ES, LF Greco, RS Bisinotto, FS Lima, WW Thatcher, and JE Santos**
493 2016a Biology of preimplantation conceptus at the onset of elongation in dairy
494 cows. *Biol Reprod* **94** 97, 91-18.
- 495 **Ribeiro, ES, JE Santos, and WW Thatcher** 2016b Role of lipids on elongation of the
496 preimplantation conceptus in ruminants. *Reproduction* **152** R115-R126.
- 497 **Richard, AJ, and JM Stephens** 2011 Emerging roles of JAK–STAT signaling
498 pathways in adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **22** 325-332.
- 499 **Sakaguchi, M, M Oka, T Iwasaki, Y Fukami, and C Nishigori** 2012 Role and
500 Regulation of STAT3 Phosphorylation at Ser727 in Melanocytes and Melanoma
501 Cells. *Journal of Investigative Dermatology* **132** 1877-1885.

- 502 **Sartori, R, R Sartor-Bergfelt, SA Mertens, JN Guenther, JJ Parrish, and MC**
503 **Wiltbank** 2002 Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and
504 Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. *Journal of*
505 *dairy science* **85** 2803-2812.
- 506 **Schats, R, AM Soto, and C Sonnenschein** 1984 Estrogen-induced cell multiplication:
507 direct or indirect effect on rat uterine cells? *Endocrinology* **115** 501-506.
- 508 **Seval, Y, H Cakmak, UA Kayisli, and A Arici** 2006 Estrogen-mediated regulation of
509 p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium. *The Journal of*
510 *Clinical Endocrinology & Metabolism* **91** 2349-2357.
- 511 **Socha, BM, M Łupicka, AA Szczepańska, and AJ Korzekwa** 2017 PPAR expression
512 throughout the oestrous cycle in the bovine endometrium. *Theriogenology* **100**
513 88-94.
- 514 **Sponchiado, M, NS Gomes, PK Fontes, T Martins, M del Collado, AdA Pastore, G**
515 **Pugliesi, MFG Nogueira, and M Binelli** 2017 Pre-hatching embryo-dependent
516 and -independent programming of endometrial function in cattle. *PLoS One* **12**
517 e0175954.
- 518 **Stevenson, KR, PR Riley, HJ Stewart, AP Flint, and DC Wathes** 1994 Localization
519 of oxytocin receptor mRNA in the ovine uterus during the oestrous cycle and
520 early pregnancy. *J Mol Endocrinol* **12** 93-105.
- 521 **Teng, CT** 1999 Regulation of lactoferrin gene expression by estrogen and epidermal
522 growth factor. *Cell biochemistry and biophysics* **31** 49-64.
- 523 **Wiltbank, M, A Gümen, and R Sartori** 2002 Physiological classification of
524 anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* **57** 21-52.

- 525 **Winuthayanon, W, SL Lierz, KC Delarosa, SR Sampels, LJ Donoghue, SC Hewitt,**
526 **and KS Korach** 2017 Juxtacrine Activity of Estrogen Receptor α in Uterine
527 Stromal Cells is Necessary for Estrogen-Induced Epithelial Cell Proliferation.
528 *Scientific Reports* **7** 8377.
- 529 **Zhu, L, and JW Pollard** 2007 Estradiol-17beta regulates mouse uterine epithelial cell
530 proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci*
531 *U S A* **104** 15847-15851.

532 **Legenda das Figuras**

533 Figura 1: Abundância relativa do RNAm dos genes *PTGS2* (A), *OTR* (B) e *PPARG* (C)
534 nas amostras de biópsia endometrial durante o proestro/estro, em animais selecionados
535 de acordo com a concentração intrafolicular de estradiol (alta ou baixa).

536

537 Figura 2: Correlação entre o nível intrafolicular de estradiol* e a abundância relativa
538 dos genes, em amostras de biopsia endometrial coletadas durante o proestro/estro de
539 bovinos.

540 *Transformada para escala logarítmica

541

542 Figura 3: Relação das proteínas fosforiladas (p-) e totais (t-) provenientes de células de
543 epitélio endometrial bovino (BEnEpC) após tratamento com 0, 20 e 200 pg/mL de
544 estradiol. A, D, G, J e N: relação pSTAT3/tSTAT3 aos 5, 10, 15, 30 e 60 min,
545 respectivamente. B, E, H, L, O: relação pAKT/tAKT aos 5, 10, 15, 30 e 60 min,
546 respectivamente. C, F, I, M, P: relação pMAPK/tMAPK aos 5, 10, 15, 30 e 60 min,
547 respectivamente.

548 ^{A,B,C} Expoentes distintos indicam diferença estatística $P \leq 0,05$.

549

550 Figura 4: Abundância relativa dos genes que demonstraram regulação ao tratamento
551 com estrógeno nas horas 6, 12 e 24 após o tratamento, em cultivo de células de epitélio
552 endometrial bovino (BEnEpC).

553 ^{A,B} Expoentes distintos indicam diferença estatística $P \leq 0,05$.

554 Figura 5: Relação das proteínas fosforiladas e totais, seguidas dos *imunoblots*
555 representativos, para os tratamentos com 0 e 200 pg/mL de estradiol sobre cultivo de
556 células de epitélio endometrial bovino (BEnEpC). AKT em 6 (A) e 24 horas (B).
557 MAPK em 6 (C) e 24 horas (D). STAT3 em 6 (E) e 24 horas (F).

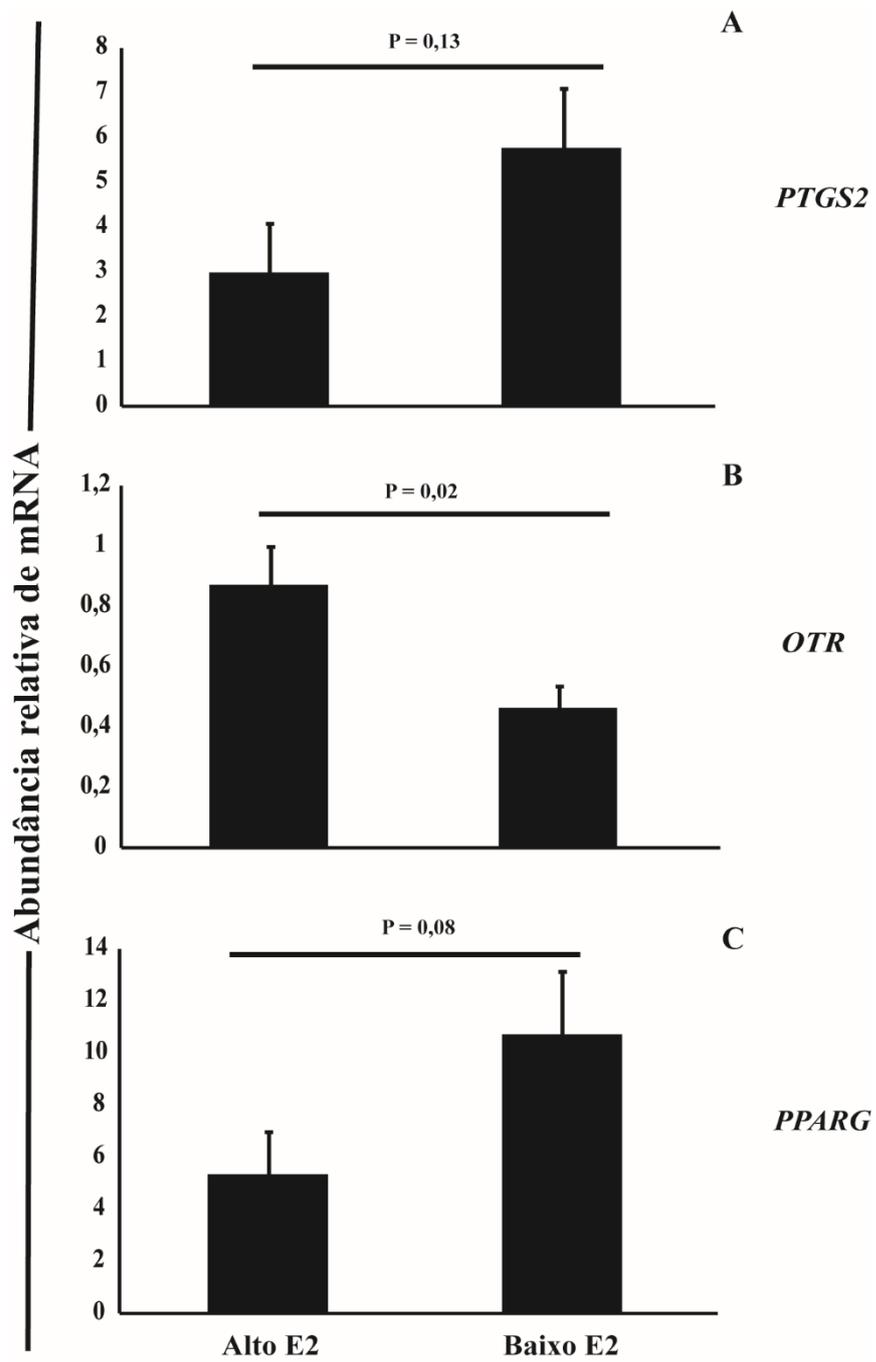
558

559 Figura 6: Teste de redução do MTS tetrazolium (CellTiter 96®) avaliado pela
560 absorvância em 492 nm. A: Correlação entre o número conhecido de células e a
561 absorvância para avaliação da eficiência do teste. B: avaliação da redução do MTS pelo
562 cultivo celular de epitélio endometrial bovino, com diferentes doses de estradiol
563 mantidas por 72 h.

564 ^{A,B} Expoentes distintos indicam diferença estatística $P \leq 0,05$.

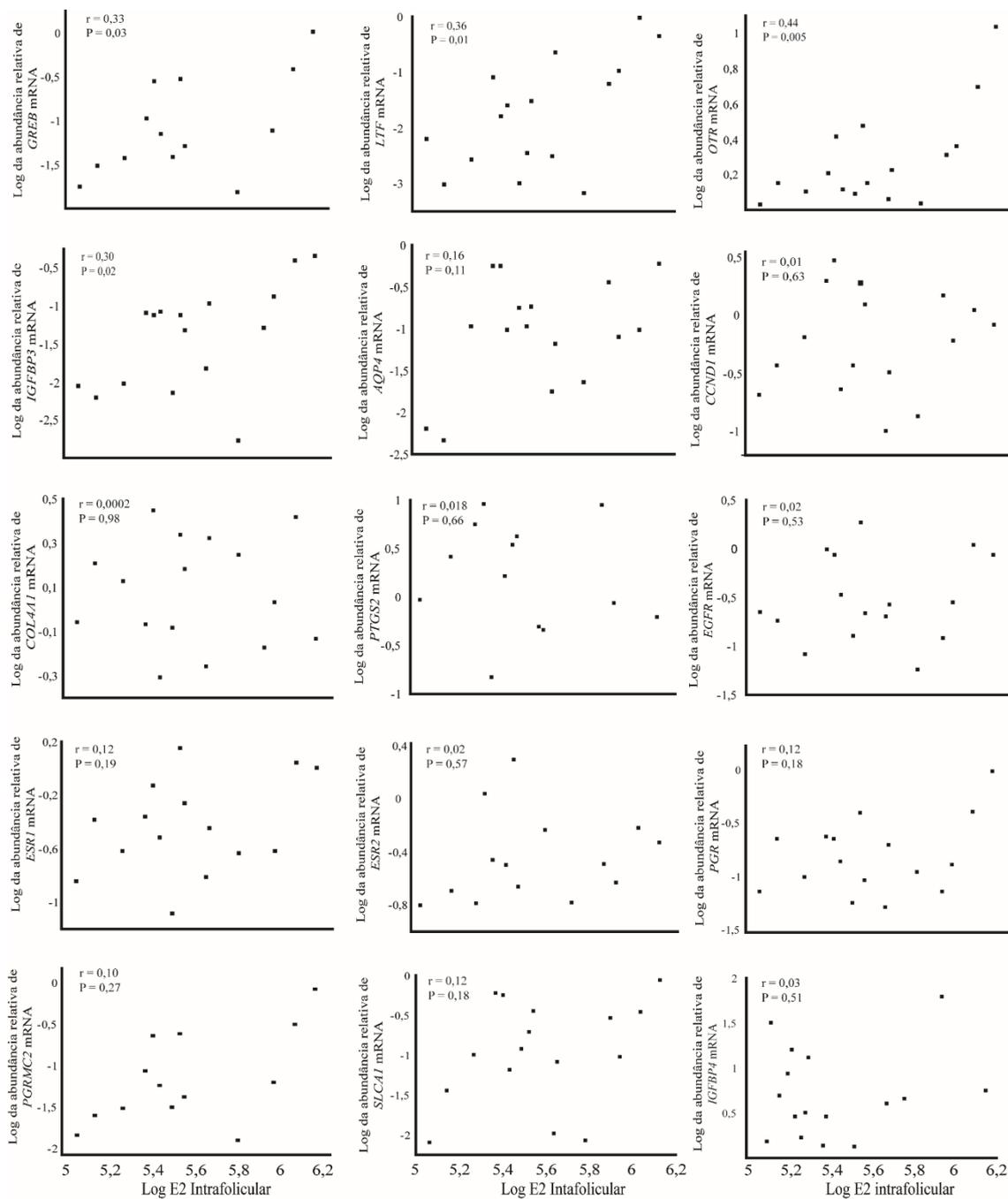
565 **Tabelas**566 Tabela 1: Sequência de primers usada para análise de expressão gênica, específicos para
567 *Bos taurus taurus*.

568	Gene	Sequência	Referência/nº de acesso
	<i>AQP4</i>	F GTGTCTGTTGCAGTGAGAT R CAAAGGGACCTGGGATTTAG	NM_181003.2
	<i>CCND1</i>	F AACTACCTGGACCGCTT R AGTGTAATGCACAGCTTCT	NM_001046273.2
	<i>COL4A1</i>	F CACGGCTACTCTTTGCTCTAC R GAAGGGCATGGTACTGAACTT	NM_001166511.2
	<i>PTGS2</i>	F TTTGACCCAGAGCTGCTTTT R GAAAGACGTCAGGCAGAAGG	NM_174445
	<i>EGFR</i>	F CCGTGAGTTGATCCTTGAATTCTC R GTCCGTAGGGCTTGGCAAAT	XM_592211.5
	<i>ESR1</i>	F CAGGCACATGAGCAACAAAG R TCCAGCAGCAGGTCGTAGAG	NM_001001443.1
	<i>ESR2</i>	F CAGCCGTCAGTTCTGTATGCA R TCCTTTTCAATGTCTCCCTGTTC	NM_174051.3
	<i>GREB1</i>	F CACCTGCGTGACAAGTTAC R GCTGGAATCCGCGATTGAAC	XM_010810188.1
	<i>LTF</i>	F GAAGGTAGATTCGGCGCTGTA R CAGTTTCCCTGAGGTTCTTCAAG	NM_180998.2
	<i>OTR</i>	F GTCAGCAACGTCAAGCTCATCT R AGACACTCCACATCTGCACGAA	NM_174134.2
	<i>PGR</i>	F GCCGCAGGTCTACCAGCCCTA R GTTATGCTGTCCTTCCATTGCCCTT	NM_001205356.1
	<i>PGRMC2</i>	F CAGGGGAAGAACCCTCAGAA R ATGAAGCCCCACCAGACATT	NM_001099060.1
	<i>SLC2A1</i>	F ATCATCTTCACCGTGCTCCTGGTT R TGTCACTTTGACTTGCTCCTCCCT	NM_174602
	<i>IGFBP3</i>	F AAAGAGATGTTTGAAATGCCTAGTTTT R TCAAACCTCGGTTTCACTGACTACTG	Voge et al. 2004
	<i>IGFBP4</i>	F GAGGAAAGAATGTATGTGCCTGATG R GACCACAAACGGAGGAGGAA	Voge et al. 2004
	<i>IGFBP2</i>	F CACCGGCAGATGGGCAA R GAAGGCGCATGGTGGAGAT	NM_174555.1
	<i>RELA</i>	F GAGATCATCGAGCAGCCCAA R ATAGTGGGGTGGGTCTTGGT	NM_001080242.2
	<i>CCND2</i>	F AGTGCGTGCGAAGGACATT R CCAAGAAGCGGTCCAGGTAA	NM_001076372.1
	<i>PGT</i>	F GTCATCGCTGGCCTCTCTAC R CAGCTACACGGGGAATGGTT	NM_174829.3
	<i>PPARG</i>	F CCAAGAATATCCCCGGCTTT R AGGCCAGCATCGTGAAATGA	NM_181024.2
	<i>LIFR</i>	F GGAACAGTTGTTTTGCGGGA R CTCCAAGGACGTCGGTCTTC	NM_001192263.2
	<i>LIF</i>	F AAAGTCCCGGCATCTAAGGT R TCATGAGGTTGCTGGGACAG	XM_015475541.1
	<i>PGRMC1</i>	F ACCAAAGGCCGCAAGTTCTA R AGGAGTGAGGTCGGAAAGGT	NM_001075133.1
	<i>IMPDH2</i>	F CATCACTCAGGAAGTGCTGGC R CGTCAGCAATGACAGGAAACA	NM_001034416.1
	<i>PIAS3</i>	F GAAGCGCACTTCACTTTGC R CCTGTATGGTATAATCGCATTG	XM_010803096.2
	<i>PRKAR2B</i>	F GGGCATTCAACGCTCCAGTA R CTGGATTGAGCATCATCTTCTTCT	NM_174649.2
	<i>XIAP</i>	F GGACGTGGATGTACTCCGTT R GCATGTTGTTCCCAAGGGT	XM_010821346.2
	<i>PCNA</i>	F CCCTTGAAGGATGAAAATGG R TCCCTAACACACCAGGAAGG	NM_001034494.1

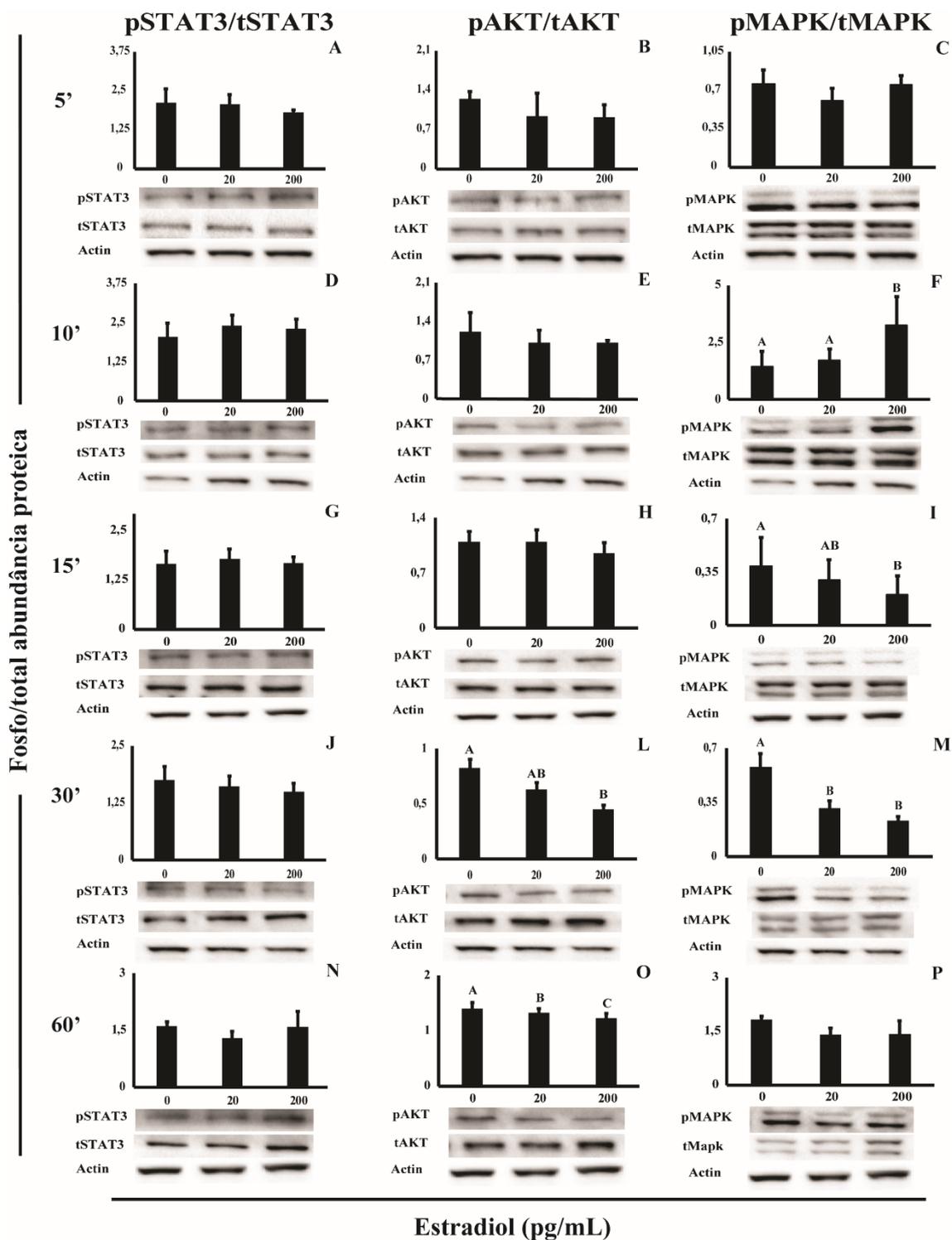
570 **Figuras**571 **Figura 1**

572

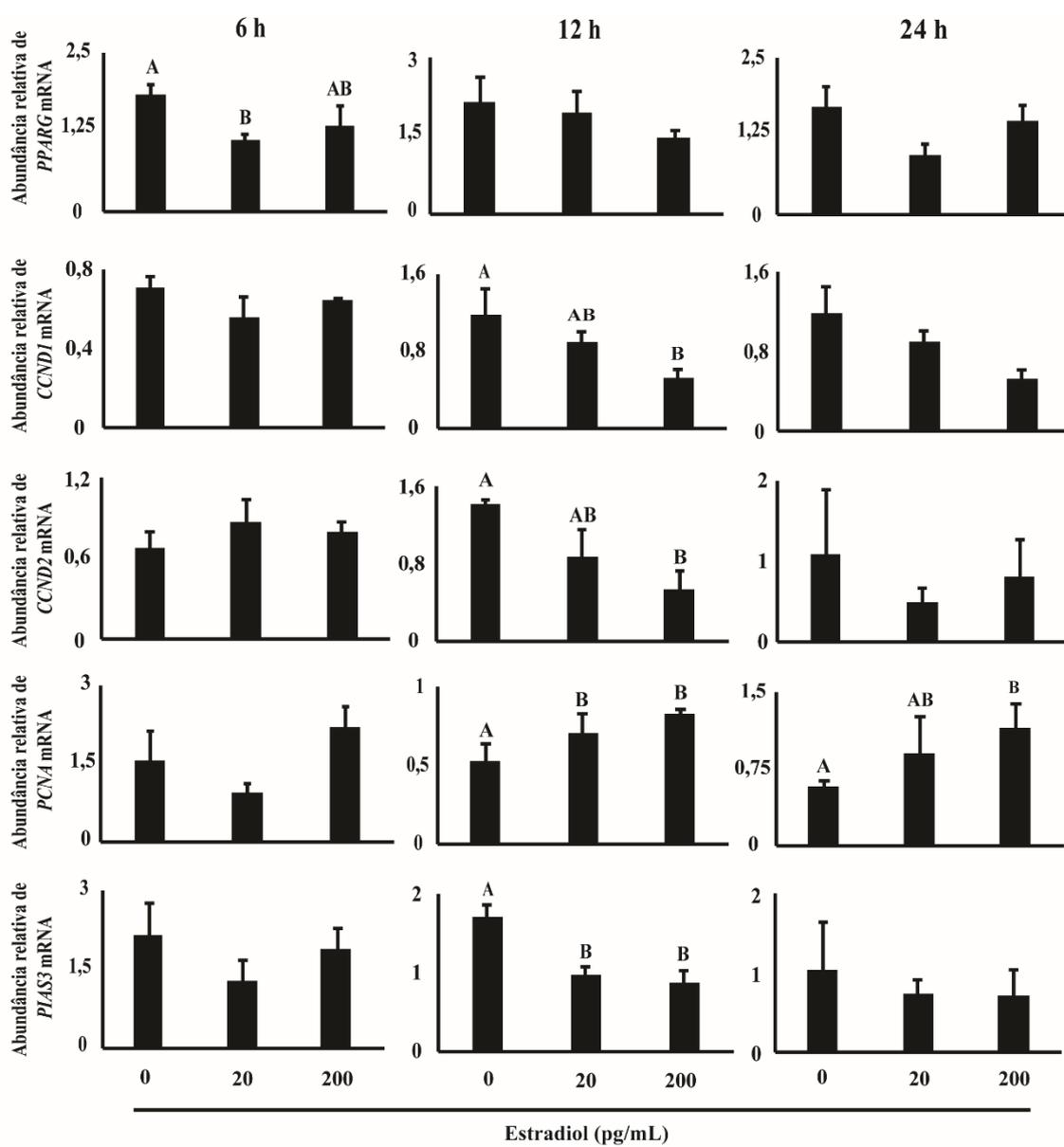
573 Figura 2



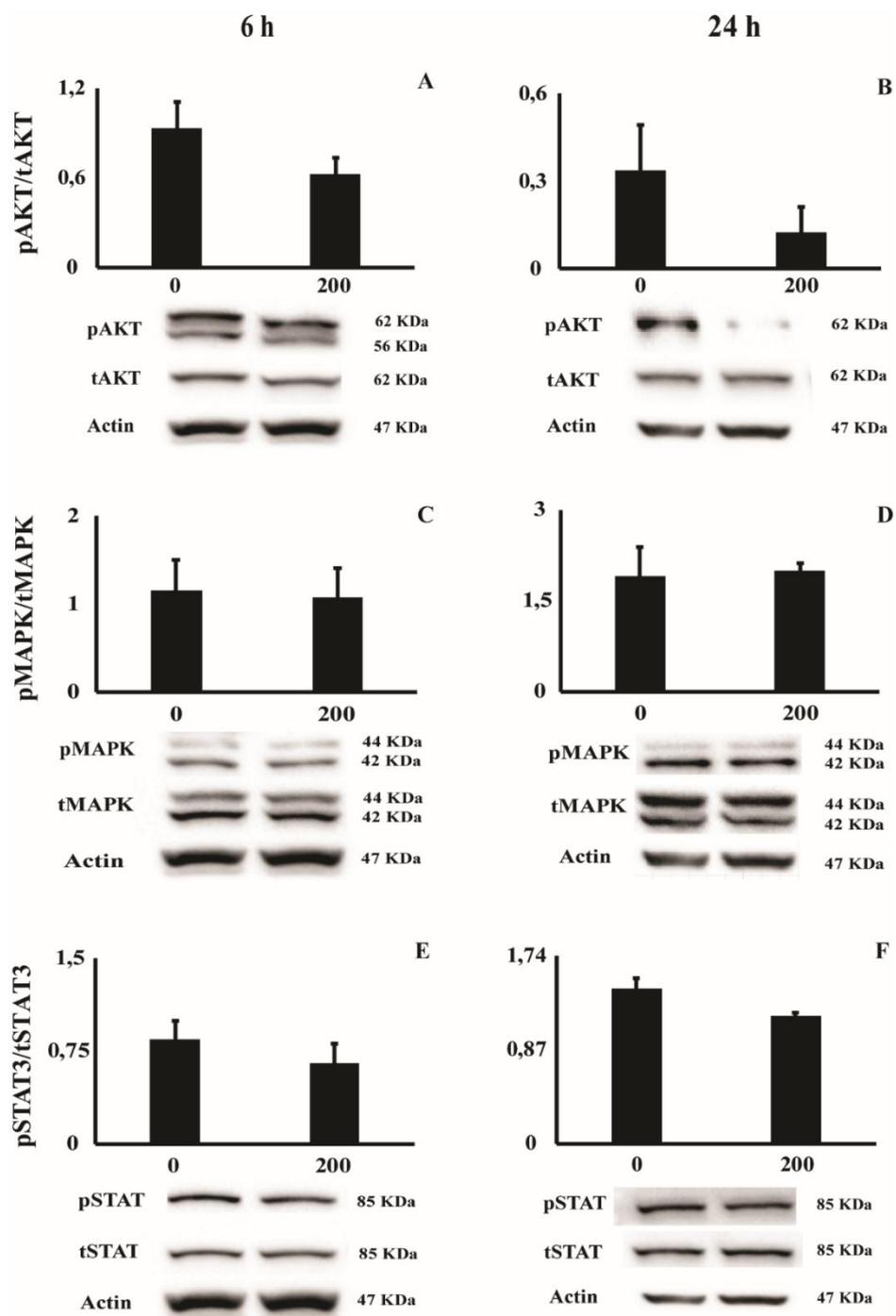
575 Figura 3



577 Figura 4

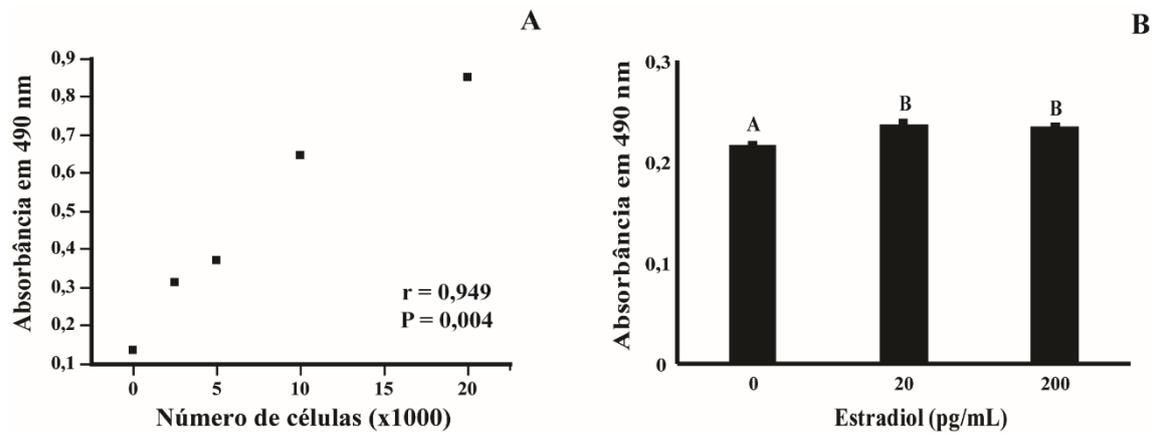
578
579

580 Figura 5



581

582 Figura 6



583

4 Considerações Finais

De forma geral, podemos concluir sobre a importância dos mediadores inflamatórios sobre o trato reprodutivo de ruminantes, podem ser utilizados para diagnosticar um efeito inflamatório agudo, traduzido como resposta a um estímulo estressor. Especificamente, no caso das técnicas avaliadas para coleta de embriões em ovelhas, identificamos ambas gerando igual resposta dos fatores avaliados ao longo do tempo.

Em um segundo momento, quando trabalhamos com um mediador inflamatório suplementado durante o proestro/estro em vacas, e avaliamos o efeito sobre o folículo e endométrio, não se observou um efeito marcado. Porém, confirmamos a possibilidade de efeito, pela presença do receptor *PTGFR* durante a ovulação nas células da granulosa, e durante o desenvolvimento folicular, prévio, durante e após a divergência, sendo regulado após a divergência nos folículos dominantes. Sobre o endométrio não foi observado efeito decorrente do tratamento com PGF durante o proestro/estro, com a dose de PGF utilizada.

No terceiro estudo, se identificou importantes genes regulados pelos níveis de estradiol endógeno no ambiente uterino de bovinos, estes podem estar relacionado com os efeitos positivos que o E2 acarreta no endométrio. De igual forma *in vitro*, consideramos que o cultivo de células de epitélio endometrial bovino (BEnEpC), é um modelo interessante para estudo da modulação do E2, desta forma sendo capaz de isolar uma resposta das células epiteliais especificamente. No modelo *in vitro*, se identificou a MAPK como sendo um mediador do estrógeno, associado a modulações gênicas que indicam proliferação celular, confirmada pelo aumento da atividade celular em resposta ao tratamento com estradiol.

5 Referências

- Acosta, T.J., Berisha, B., Ozawa, T., Sato, K., Schams, D., Miyamoto, A., 1999. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology of reproduction** 61, 1419-1425.
- Ainsworth, L., Tsang, B., Downey, B., Marcus, G., 1989. The synthesis and actions of steroids and prostaglandins during follicular maturation in the pig. **Journal of reproduction and fertility**. Supplement 40, 137-150.
- Algire, J.E., Srikandakumar, A., Guilbault, L.A., Downey, B.R., 1992. Preovulatory changes in follicular prostaglandins and their role in ovulation in cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research** 56, 67.
- Ambrose, D.J., Gobikrushanth, M., Zuidhof, S., Kastelic, J.P., 2015. Low-dose natural prostaglandin F2 α (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. **Theriogenology** 83, 529-534.
- Araújo, E.R., Sponchiado, M., Pugliesi, G., Van Hoeck, V., Mesquita, F.S., Membrive, C.M.B., Binelli, M., 2015. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. **Reproduction, Fertility and Development** 28, 1533.
- Archbald, L.F., Constant, S., Tran, T., Risco, C., Klapstein, E., Elliott, J., 1994. Effect of sequential treatment with prostaglandin F2 alpha and/or oxytocin on estrus and pregnancy rate of lactating dairy cows. **Theriogenology** 42, 773-780.
- Arosh, J.A., Banu, S.K., Chapdelaine, P., Madore, E., Sirois, J., Fortier, M.A., 2004. Prostaglandin Biosynthesis, Transport, and Signaling in Corpus Luteum: A Basis for Autoregulation of Luteal Function. **Endocrinology** 145, 2551-2560.
- Austin, E., Mihm, M., Ryan, M., Williams, D., Roche, J., 1999. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **Journal of animal science** 77, 2219.

Barros, F.F.P.C., Teixeira, P.P.M., Silva, M.A.M., Coelho, C.M.M., Lopes, M.C.S., Kawanami, A.E., Chung, D.G., Coutinho, L.N., Ribeiro, R.B., Padilha, L.C., Vicente, W.R.R., 2015. Single-port laparoscopic ovariectomy using a pre-tied loop ligature in Santa Ines ewes. **Ciênc. Rural** 45, 2033-2038.

Bastos, B.L., Meyer, R., Guimaraes, J.E., Ayres, M.C., Guedes, M.T., Moura-Costa, L.F., de Burghgrave, U.S., Sena, L., Azevedo, V., Portela, R.W., 2011. Haptoglobin and fibrinogen concentrations and leukocyte counts in the clinical investigation of caseous lymphadenitis in sheep. **Vet. Clin. Pathol.** 40, 496-503.

Basu, S., 2010. Bioactive eicosanoids: Role of prostaglandin F₂ α and F₂-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. **Molecules and Cells** 30, 383-391.

Berkova, N., Lemay, A., Dresser, D.W., Fontaine, J.-Y., Kerizit, J., Goupil, S., 2001. Haptoglobin is present in human endometrium and shows elevated levels in the decidua during pregnancy. **MHR: Basic science of reproductive medicine** 7, 747-754.

Bevers, M.M., Dieleman, S.J., 1987. Superovulation of cows with PMSG: Variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. **Animal reproduction science** 15, 37-52.

Binelli, M., Pugliesi, G., Hoeck, V.V., Sponchiado, M., Ramos, R.S., Oliveira, M.L., França, M.R., D'Alexandri, F.L., Mesquita, F.S., Membrive, C.M.B., 2014. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. **Animal Reproduction** v.11, 246-253.

Binelli, M., Scolari, S.C., Pugliesi, G., Van Hoeck, V., Gonella-Diaza, A.M., Andrade, S.C., Gasparin, G.R., Coutinho, L.L., 2015. The transcriptome signature of the receptive bovine uterus determined at early gestation. **PloS one** 10, e0122874.

Bionaz, M., Trevisi, E., Calamari, L., Librandi, F., Ferrari, A., Bertoni, G., 2007. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science** 90, 1740-1750.

Bishop, C.V., 2013. Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. **Frontiers in neuroscience** 7.

Blesson, C.S., Sahlin, L., 2014. Prostaglandin E and F receptors in the uterus. **Receptors & Clinical Investigation** 1.

Blitek, A., Szymanska, M., 2017. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms are differentially expressed in peri-implantation porcine conceptuses. **Theriogenology** 101, 53-61.

Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H., Wallach, D., 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. **Journal of Biological Chemistry** 270, 7795-7798.

Bossaert, P., Leroy, J.L., De Vliegher, S., Opsomer, G., 2008. Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. **J Dairy Sci** 91, 3363-3371.

Bossis, I., Wettemann, R.P., Welty, S.D., Vizcarra, J.A., Spicer, L.J., Diskin, M.G., 1999. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function preceding cessation of ovulation. **Journal of animal science** 77, 1536-1546.

Brännström, M., Koos, R.D., Le Maire, W.J., Janson, P.O., 1987. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced ovulation in the perfused rat ovary and its mediation by prostaglandins. **Biology of reproduction** 37, 1047-1053.

Bridges, G., Mussard, M., Burke, C., Day, M., 2010. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. **Animal reproduction science** 117, 208-215.

Bridges, P.J., Fortune, J.E., 2007. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. **Molecular and Cellular Endocrinology** 263, 1-9.

Browne, R.W., Koury, S.T., Marion, S., Wilding, G., Muti, P., Trevisan, M., 2007. Accuracy and Biological Variation of Human Serum Paraoxonase 1 Activity and Polymorphism (Q192R) by Kinetic Enzyme Assay. **Clinical Chemistry** 53, 310-317.

Butler, W., 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. **Animal reproduction science** 60, 449-457.

Candappa, I.B.R., Bartlewski, P.M., 2014. Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. **Reprod Biol Endocrinol** 12, 1-9.

Cao, Y., Zhang, J., Yang, W., Xia, C., Zhang, H.-Y., Wang, Y.-H., Xu, C., 2017. Serum paraoxonase as an indicator for fatty liver in sheep. **J. Vet. Res.** 61, 97-102.

Carvalho, J.B.P., Carvalho, N.A.T., Reis, E.L., Nichi, M., Souza, A.H., Baruselli, P.S., 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology** 69, 167-175.

Ceciliani, F., Ceron, J., Eckersall, P., Sauerwein, H., 2012. Acute phase proteins in ruminants. **J. Proteomics** 75, 4207-4231.

Chapman, R.S., Lourenco, P.C., Tonner, E., Flint, D.J., Selbert, S., Takeda, K., Akira, S., Clarke, A.R., Watson, C.J., 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. **Genes Dev** 13, 2604-2616.

Chapwanya, A., Meade, K.G., Narciandi, F., Stanley, P., Mee, J.F., Doherty, M.L., Callanan, J.J., O'Farrelly, C., 2010. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. **Theriogenology** 73, 988-994.

Chastant-Maillard, S., Quinton, H., Lauffenburger, J., Cordonnier-Lefort, N., Richard, C., Marchal, J., Mormede, P., Renard, J., 2003. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. **Reproduction** 125, 555-563.

Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K., 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. **Science** 278, 1803-1805.

Colazo, M.G., Martínez, M.F., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J., 2002. Effects of dose and route of administration of cloprostenol on luteolysis, estrus and ovulation in beef heifers. **Animal reproduction science** 72, 47-62.

Cook, R., 2015. World Beef Production: Ranking Of Countries. Beef 2 Live. (Obtenido de Beef2Life: <http://beef2live.com/story-world-cattle-inventory-ranking-countries-0-106905>).

Cook, R. 2016. World Cattle Inventory: Ranking of Countries (Obtenido de Beef2Life: <http://beef2live.com/story-world-cattle-inventory-ranking-countries-0-106905>).

Cuervo-Arango, J., Domingo-Ortiz, R., 2011. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. **Theriogenology** 75, 707-714.

Dadarwal, D., Mapletoft, R., Adams, G., Pfeifer, L., Creelman, C., Singh, J., 2013. Effect of progesterone concentration and duration of proestrus on fertility in beef cattle after fixed-time artificial insemination. **Theriogenology** 79, 859-866.

Davies, K., Bartlewski, P., Epp, T., Duggavathi, R., Barrett, D., Bagu, E., Cook, S., Rawlings, N., 2006. Does injection of prostaglandin F 2 α (PGF 2 α) cause ovulation in anestrus Western White Face ewes? **Theriogenology** 66, 251-259.

Davoodi, S., Cooke, R.F., Fernandes, A.C., Cappellozza, B.I., Vasconcelos, J.L., Cerri, R.L., 2016. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. **Theriogenology** 85, 645-655.

De Silva, M., Reeves, J.J., 1985. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **J Reprod Fertil** 75, 547-549.

Dennis, E.A., Norris, P.C., 2015. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. *Nature reviews*. **Immunology** 15, 511-523.

DeRossi, R., Carneiro, R.P.B., Ossuna, M.R., Zanenga, N.F., Alves, O.D., Jorge, T.P., Costa-e-Silva, E.V., Vasconcelos, J., 2009. Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. **Small Rumin. Res.** 83, 74-78.

Dery, M.-C., Leblanc, V., Shooner, C., Asselin, E., 2003. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17 β -estradiol in the rat uterus during estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology** 1, 47.

Deveci, H., Kükürt, A., Uzlu, E., Sözdutmaz, İ., Merhan, O., Aktaş, S., Alpay, M., Kaya, İ., Karapehlivan, M., 2017. Evaluation of paraoxonase activity, total sialic acid and oxidative stress in sheep with ecthyma contagiosa. **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.** 23, 453-457.

Dimitriadis, E., Robb, L., Salamonsen, L.A., 2002. Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. **Molecular human reproduction** 8, 636-643.

Dochi, O., Takahashi, K., Hirai, T., Hayakawa, H., Tanisawa, M., Yamamoto, Y., Koyama, H., 2008. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. **Theriogenology** 69, 124-128.

Downey, B.R., Ainsworth, L., 1980. Reversal of indomethacin blockade of ovulation in gilts by prostaglandins. **Prostaglandins** 19, 17-22.

Dunn, C.L., Critchley, H.O., Kelly, R.W., 2002. IL-15 regulation in human endometrial stromal cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism** 87, 1898-1901.

Eckersall, P., 2000. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. **Ir. Vet. J.** 53, 307-311.

Espey, L., Tanaka, N., Adams, R., Okamura, H., 1991. Ovarian hydroxyeicosatetraenoic acids compared with prostanoids and steroids during ovulation in rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism** 260, E163-E169.

Espey, L.L., Bellinger, A.S., Healy, J.A., 2003. **Chapter 9 - Ovulation: An Inflammatory Cascade of Gene Expression**, In: Adashi, P.C.K.L.Y. (Ed.) *The Ovary* (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 145-165.

Espey, L.L., Richards, J.S., 2006. **Chapter 11 - Ovulation**, In: Wassarman, J.D.N., T. M.; Plant, D.W.; Pfaff, J.R.G.; Challis, D.M.; Kretser, J.S.; Richards, P.M. (Ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Third Edition). Academic Press, St Louis, pp. 425-VI.

Fan, H.-Y., Liu, Z., Shimada, M., Sterneck, E., Johnson, P.F., Hedrick, S.M., Richards, J.S., 2009. MAPK3/1 (ERK1/2) in Ovarian Granulosa Cells Are Essential for Female Fertility. **Science** 324, 938-941.

Fazio, F., Ferrantelli, V., Cicero, A., Casella, S., Piccione, G., 2014. Utility of Acute Phase Proteins as Biomarkers of Transport Stress in Ewes and Beef Cattle. **Ital. J. Food Saf.** 3, 4210.

Fazio, F., Ferrantelli, V., Cicero, A., Casella, S., Piccione, G., 2015. Utility of acute phase proteins as biomarkers of transport stress in ewes and beef cattle. **Italian journal of food safety** 4.

Ferreira, R., Oliveira, J.F., Fernandes, R., Moraes, J.F., Gonçalves, P.B., 2007. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction** 134, 713-719.

Ferreira, S., Vane, J., 1967. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature** 216, 868-873.

Findlay, J.K., 1993. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. **Biology of reproduction** 48, 15-23.

Fortune, J.E., Willis, E.L., Bridges, P.J., Yang, C.S., 2009. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal Reproduction** 6, 60-71.

Gani, M., Amin, M., Alam, M., Kayesh, M., Karim, M., Samad, M., Islam, M., 2008. Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine** 6, 79-86.

Gasperin, B.G., Rovani, M.T., Ferreira, R., Ilha, G.F., Bordignon, V., Gonçalves, P.B.D., Duggavathi, R., 2015. Functional status of STAT3 and MAPK3/1 signaling pathways in granulosa cells during bovine follicular deviation. **Theriogenology** 83, 353-359.

Goldman, S., Shalev, E., 2004. MMPS and TIMPS in ovarian physiology and pathophysiology. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library** 9, 2474-2483.

Gonçalves, P.B., Ferreira, R., Gasperin, B., Oliveira, J.F., 2012. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. **Reproduction** 143, 11-20.

Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A., Koopmans, S.J., 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University*. **Science**. B 6, 1045-1056.

Gusmão, A.L., Silva, J.C., Bittencourt, T.C.C., Martins, L.E.P., Gordiano, H.D., Barbosa, L.P., 2009. Transcervical embryo recovery in Dorper ewes in the Brazilian semi-arid Northeast. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 61, 313-318.

Guzeloglu Kayisli, O., Kayisli, U.A., Luleci, G., Arici, A., 2004. In Vivo and In Vitro Regulation of Akt Activation in Human Endometrial Cells Is Estrogen Dependent. **Biology of reproduction** 71, 714-721.

Haimerl, P., Heuwieser, W., Arlt, S., 2013. Therapy of bovine endometritis with prostaglandin F: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science** 96, 2973-2987.

Herrler, A., Krusche, C.A., Müller-Schöttle, F., Beier, H.M., 2004. Haptoglobin expression and release by rabbit oviduct and endometrium, its localization in blastocyst extra-embryonic matrix and fluid during preimplantation time. **Human Reproduction** 19, 2730-2737.

Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., Lee, D.C., Threadgill, D.W., Conti, M., 2007. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. **Molecular and cellular biology** 27, 1914-1924.

Hsu, H., Xiong, J., Goeddel, D.V., 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. **Cell** 81, 495-504.

Iacovetta, C., Rudloff, E., Kirby, R., 2012. The role of aquaporin 4 in the brain. **Veterinary clinical pathology** 41, 32-44.

Iesaka, T., Sato, T., Igarashi, M., 1975. Role of Prostaglandin F₂ α in Ovulation. **Endocrinologia Japonica** 22, 279-285.

Ireland, J., Roche, J., 1982. Development of Antral Follicles in Cattle after Prostaglandin-Induced Luteolysis: Changes in Serum Hormones, Steroids in Follicular Fluid, and Gonadotropin Receptors*. **Endocrinology** 111, 2077-2086.

Jabbour, H.N., Sales, K.J., Smith, O.P.M., Battersby, S., Boddy, S.C., 2006. Prostaglandin receptors are mediators of vascular function in endometrial pathologies. **Molecular and cellular endocrinology** 252, 191-200.

Jang, H.D., Yoon, K., Shin, Y.J., Kim, J., Lee, S.Y., 2004. PIAS3 suppresses NF- κ B-mediated transcription by interacting with the p65/RelA subunit. **Journal of Biological Chemistry** 279, 24873-24880.

Jee, W., Ma, Y., 1997. The in vivo anabolic actions of prostaglandins in bone. **Bone** 21, 297-304.

Kalra, S., Kalra, P., 1984. Opioid-adrenergic-steroid connection in regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. **Neuroendocrinology** 38, 418-426.

Karsch, F.J., 1987. Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. **Annual review of physiology** 49, 365-382.

Katagiri, S., Moriyoshi, M., 2013. Alteration of the Endometrial EGF Profile as a Potential Mechanism Connecting the Alterations in the Ovarian Steroid Hormone Profile to Embryonic Loss in Repeat Breeders and High-producing Cows. **Journal of Reproduction and Development** 59, 415-420.

Katagiri, S., Takahashi, Y., 2004. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. **Theriogenology** 62, 103-112.

Katagiri, S., Takahashi, Y., 2006. Potential relationship between normalization of endometrial epidermal growth factor profile and restoration of fertility in repeat breeder cows. **Animal reproduction science** 95, 54-66.

Kawano, Y., Nakamura, S., Fukuda, J., Miyakawa, I., 2001. Synergistic Effect of Interleukin-1 α and Ceramide Analogue on Production of Prostaglandin E2 and F2 α by Endometrial Stromal Cells. **American Journal of Reproductive Immunology** 46, 393-398.

Ke, Y., Oskolkova, O.V., Sarich, N., Tian, Y., Sitikov, A., Tulapurkar, M.E., Son, S., Birukova, A.A., Birukov, K.G., 2017. Effects of prostaglandin lipid mediators on agonist-induced lung endothelial permeability and inflammation. **American journal of physiology**. Lung cellular and molecular physiology 313, L710-L721.

Kimura, M., Nakao, T., Moriyoshi, M., Kawata, K., 1987. Luteal phase deficiency as a possible cause of repeat breeding in dairy cows. **British Veterinary Journal** 143, 560-566.

Kingsley, D.M., 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes & development** 8, 133-146.

Knight, P.G., Glister, C., 2006. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction** 132, 191-206.

Komar, C.M., Berndtson, A.K., Evans, A.C., Fortune, J.E., 2001. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17 α -hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. **Biology of reproduction** 64, 1797-1805.

Kozai, K., Tokuyama, S., Szóstek, A.Z., Toishi, Y., Tsunoda, N., Taya, K., Sakatani, M., Takahashi, M., Nambo, Y., Skarzynski, D.J., Yamamoto, Y., Kimura, K., Okuda, K., 2016. Evidence for a PGF 2α auto-amplification system in the endometrium in mares. **Reproduction** 151, 517-526.

Lamb, G., Dahlen, C., Larson, J., Marquezini, G., Stevenson, J., 2010. Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. **Journal of animal science** 88, E181-E192.

Lamming, G.E., Mann, G.E., 1995. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F 2α production in cows by progesterone and oestradiol. **J Reprod Fertil** 103, 69-73.

Lands, W., 1979. The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. **Annual Review of Physiology** 41, 633-652.

Leonardi, C.E.P., Pfeifer, L.F.M., Rubin, M.I.B., Singh, J., Mapletoft, R.J., Pessoa, G.A., Bairy, A.M., Silva, C.A.M., 2012. Prostaglandin F 2α promotes ovulation in prepubertal heifers. **Theriogenology** 78, 1578-1582.

Levay, P.F., Viljoen, M., 1995. Lactoferrin: a general review. **Haematologica** 80, 252-267.

Lewis, G.S., 2004. Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal reproduction science** 82-83, 281-294.

Li, Q., Jimenez-Krassel, F., Bettegowda, A., Ireland, J.J., Smith, G.W., 2007. Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. **Journal of Endocrinology** 192, 473-483.

Lim, H., Gupta, R.A., Ma, W.-g., Paria, B.C., Moller, D.E., Morrow, J.D., DuBois, R.N., Trzaskos, J.M., Dey, S.K., 1999. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR δ . **Genes & development** 13, 1561-1574.

Lima, A.G., Costa, L.C., Alvarenga, M.A., Martins, C.B., 2015. Does Clinical Treatment with Phenylbutazone and Meloxicam in the Pre-ovulatory Period Influence the Ovulation Rate in Mares? **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene** 50, 771-775.

Lindell, J., Kindahl, H., Jansson, L., Edqvist, L., 1982. Post-partum release of prostaglandin F₂ α and uterine involution in the cow. **Theriogenology** 17, 237-245.

Liu, J., Carriere, P.D., Dore, M., Sirois, J., 1997. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. **Biology of reproduction** 57, 1524-1531.

Liu, Y., Li, P.K., Li, C., Lin, J., 2010. Inhibition of STAT3 signaling blocks the anti-apoptotic activity of IL-6 in human liver cancer cells. **The Journal of biological chemistry** 285, 27429-27439.

López-Gatius, F., López-Béjar, M., Fenech, M., Hunter, R., 2005. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. **Theriogenology** 63, 1298-1307.

Lowe, G.D., Rumley, A., Mackie, I.J., 2004. Plasma fibrinogen. **Annals of clinical biochemistry** 41, 430-440.

Lucy, M., 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of dairy science** 84, 1277-1293.

Luo, W., Wiltbank, M.C., 2006. Distinct regulation by steroids of messenger RNAs for FSHR and CYP19A1 in bovine granulosa cells. **Biology of reproduction** 75, 217-225.

LUQUE, E., HUTTER, J., MONTES, G., 1983. Regulación hormonal de los ciclos reproductivos en la vaca. **Revista de Medicina Veterinaria**, 190-211.

Madsen, C.A., Perry, G.A., Mogck, C.L., Daly, R.F., MacNeil, M.D., Geary, T.W., 2015. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. **Animal reproduction science** 158, 96-103.

Masoudi, R., Kohram, H., Shahne, A., Davoud, S., 2012. Effect of estradiol and oxytocin on ovine cervical relaxation. **Afr. J. Biotechnol.** 11, 2803-2806.

Matsuoka, S., Yamaguchi, M., Matsukage, A., 1994. D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. **Journal of Biological Chemistry** 269, 11030-11036.

Melendez, P., McHale, J., Bartolome, J., Archbald, L.F., Donovan, G.A., 2004. Uterine Involution and Fertility of Holstein Cows Subsequent to Early Postpartum PGF2 α Treatment for Acute Puerperal Metritis*. **Journal of Dairy Science** 87, 3238-3246.

Menchaca, A., Vilariño, M., Pinczak, A., Kmaid, S., Saldaña, J.M., 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology** 72, 477-483.

Mermillod, P., Oussaid, B., Cognie, Y., 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. **J Reprod Fertil Suppl** 54, 449-460.

Mesquita, F., Ramos, R., Pugliesi, G., Andrade, S., Van Hoeck, V., Langbeen, A., Oliveira, M., Gonella-Diaza, A., Gasparin, G., Fukumasu, H., 2015. The receptive endometrial transcriptomic signature indicates an earlier shift from proliferation to metabolism at early diestrus in the cow. **Biology of reproduction** 93.

Mitko, K., Ulbrich, S.E., Wenigerkind, H., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E., Bauersachs, S., 2008. Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. **Reproduction** 135, 225-240.

Mori, T., Kohda, H., Kinoshita, Y., Ezaki, Y., Morimoto, N., Nishimura, T., 1980a. Inhibition by indomethacin of ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in immature rats primed with pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal of Endocrinology** 84, 333-341.

Mori, T., Kohda, H., Kinoshita, Y., Ezaki, Y., Morimoto, N., Nishimura, T., 1980b. Inhibition by indomethacin of ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in immature rats primed with pregnant mare serum gonadotrophin. **The Journal of endocrinology** 84, 333-341.

Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Vet. J.** 168, 28-40.

Murdoch, W., Dailey, R., Inskeep, E., 1981. Preovulatory Changes in Prostaglandins E and F α in Ovine Follicles. **Journal of animal science** 53, 192-205.

Murdoch, W., Dunn, T., 1983. Luteal function after ovulation blockade by intrafollicular injection of indomethacin in the ewe. **Journal of reproduction and fertility** 69, 671-675.

Murdoch, W., Hansen, T., McPherson, L., 1993. A review—role of eicosanoids in vertebrate ovulation. **Prostaglandins** 46, 85-115.

Murdoch, W., Nix, K., Dunn, T., 1983. Dynamics of ovarian blood supply to periovulatory follicles of the ewe. **Biology of reproduction** 28, 1001-1006.

Murdoch, W.J., McDonnel, A.C., 2002. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. **Reproduction** 123, 743-750.

Naor, Z., Jabbour, H.N., Naidich, M., Pawson, A.J., Morgan, K., Battersby, S., Millar, M.R., Brown, P., Millar, R.P., 2007. Reciprocal cross talk between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and prostaglandin receptors regulates GnRH receptor expression and differential gonadotropin secretion. **Mol Endocrinol** 21, 524-537.

Neuvians, T.P., Schams, D., Berisha, B., Pfaffl, M.W., 2004. Involvement of Pro-Inflammatory Cytokines, Mediators of Inflammation, and Basic Fibroblast Growth Factor in Prostaglandin F₂α-Induced Luteolysis in Bovine Corpus Luteum¹. **Biology of reproduction** 70, 473-480.

Oliveira, F.C., Ferreira, C.E.R., Haas, C.S., Oliveira, L.G., Mondadori, R.G., Schneider, A., Rovani, M.T., Goncalves, P.B.D., Vieira, A.D., Gasperin, B.G., Lucia, T., Jr., 2017. Chemical castration in cattle with intratesticular injection of sodium chloride: Effects on stress and inflammatory markers. **Theriogenology** 90, 114-119.

Olofsson, J., Leung, P.C., 1994. Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. **Molecular and cellular endocrinology** 100, 87-91.

Panigone, S., Hsieh, M., Fu, M., Persani, L., Conti, M., 2008. Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. **Mol Endocrinol** 22, 924-936.

Park, J.Y., Su, Y.Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S.L., Conti, M., 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science** 303, 682-684.

Pellegrini, C., Gori, I., Achtari, C., Hornung, D., Chardonnens, E., Wunder, D., Fiche, M., Canny, G.O., 2012. The expression of estrogen receptors as well as GREB1, c-

MYC, and cyclin D1, estrogen-regulated genes implicated in proliferation, is increased in peritoneal endometriosis. **Fertility and sterility** 98, 1200-1208.

Pereira, M.H., Wiltbank, M.C., Vasconcelos, J.L., 2016. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. **J Dairy Sci** 99, 2237-2247.

Peres, R.F.G., Júnior, I.C., Filho, O.G.S., Nogueira, G.P., Vasconcelos, J.L.M., 2009. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology** 72, 681-689.

Perry, G., Perry, B., 2008. Effects of standing estrus and supplemental estradiol on changes in uterine pH during a fixed-time artificial insemination protocol. **Journal of animal science** 86, 2928-2935.

Pestano, H., Haas, C., Santos, M., Oliveira, F., Gasperin, B., 2017. Indução artificial de lactação em bovinos: histórico e evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 39, 315-321.

Petherick, J.C., McCosker, K., Mayer, D.G., Letchford, P., McGowan, M., 2011. Preliminary investigation of some physiological responses of *Bos indicus* heifers to surgical spaying. **Australian veterinary journal** 89, 131-137.

Petroff, M., Petroff, B., Pate, J., 1999. Expression of cytokine messenger ribonucleic acids in the bovine corpus luteum. **Endocrinology** 140, 1018-1021.

Pfeifer, L.F.M., Leonardi, C.E.P., Castro, N.A., Viana, J.H.M., Siqueira, L.G.B., Castilho, E.M., Singh, J., Krusser, R.H., Rubin, M.I.B., 2014. The use of PGF2 α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. **Theriogenology** 81, 689-695.

Pradiee, J., de Campos, F.T., Rincon, J., Collares, L., Goularte, K., Silveira, P., Pegoraro, L., Schneider, A., 2017. Paraoxonase 1 (PON1) activity in serum, follicular fluid and seminal plasma of sheep. **Reprod. Domest. Anim.**

Priedkalns, J., Weber, A.F., Zemjanis, R., 1968. Qualitative and quantitative morphological studies of the cells of the membrana granulosa, theca interna and corpus luteum of the bovine ovary. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie** 85, 501-520.

Rahe, C., Owens, R., Fleeger, J., Newton, H., Harms, P., 1980. Pattern of Plasma Luteinizing Hormone in the Cyclic Cow: Dependence upon the Period of the Cycle*. **Endocrinology** 107, 498-503.

Randel, R., Lammoglia, M., Lewis, A., Neuendorff, D., Guthrie, M., 1996. Exogenous PGF 2 α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. **Theriogenology** 45, 643-654.

Raz, A., Wyche, A., Siegel, N., Needleman, P., 1988. Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1. **Journal of Biological Chemistry** 263, 3022-3028.

Ribeiro, E.S., Greco, L.F., Bisinotto, R.S., Lima, F.S., Thatcher, W.W., Santos, J.E., 2016a. Biology of preimplantation conceptus at the onset of elongation in dairy cows. **Biology of reproduction** 94, 97, 91-18.

Ribeiro, E.S., Santos, J.E., Thatcher, W.W., 2016b. Role of lipids on elongation of the preimplantation conceptus in ruminants. **Reproduction** 152, R115-R126.

Richard, A.J., Stephens, J.M., 2011. Emerging roles of JAK–STAT signaling pathways in adipocytes. **Trends in Endocrinology & Metabolism** 22, 325-332.

Richards, J.S., 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocrine reviews** 15, 725-751.

Rijken-Zijlstra, T., Haadsma, M., Hammer, C., Burgerhof, J., Pelinck, M., Simons, A., van Echten-Arends, J., Arts, J., Land, J., Groen, H., 2013. Effectiveness of indometacin to prevent ovulation in modified natural-cycle IVF: a randomized controlled trial. **Reproductive biomedicine online** 27, 297-304.

Ruas, J.R.M., Torres, C.A.A., Borges, L.E., MARCATTI NETO, A., Machado, G.V., BORGES, A., 2000. Efeito da Suplementação protéica a pasto sobre eficiência reprodutiva e concentrações sanguíneas de colesterol, glicose e uréia, em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia** 29, 2043-2050.

Sá Filho, M.F., Gonella-Diaza, A.M., Mesquita, F.S., Pugliesi, G., Gasparin, G., Coutinho, L.L., Goissis, M.D., Mendanha, M.F., Sponchiado, M., Binelli, M., 2017. Impact of hormonal modulation at proestrus on ovarian responses and uterine gene expression of suckled anestrous beef cows. **Journal of animal science and biotechnology** 8, 79.

Sa Filho, M.F., Marques, M.O., Giroto, R., Santos, F.A., Sala, R.V., Barbuio, J.P., Baruselli, P.S., 2014. Resynchronization with unknown pregnancy status using progesterin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology** 81, 284-290.

Sakaguchi, M., Oka, M., Iwasaki, T., Fukami, Y., Nishigori, C., 2012. Role and Regulation of STAT3 Phosphorylation at Ser727 in Melanocytes and Melanoma Cells. **Journal of Investigative Dermatology** 132, 1877-1885.

Sakumoto, R., Berisha, B., Kawate, N., Schams, D., Okuda, K., 2000. Tumor necrosis factor- α and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of reproduction** 62, 192-199.

Salasel, B., Mokhtari, A., 2011. Effect of early postpartum PGF 2α treatment on reproductive performance in dairy cows with calving and puerperal traits. **Theriogenology** 76, 1723-1729.

Santos, J., Ferreira, R., Gasperin, B., Siqueira, L., Oliveira, J., Santos, R., Reis, A., Gonçalves, P., 2012. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System** 13, 91-98.

Santos, J.T., 2015. **Peptídeos Natriuréticos e Angiotensina-(1-7) durante o processo de ovulação em bovinos**. Tese, 81.

Sartori, R., Fricke, P.M., Ferreira, J.C., Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., 2001a. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol Reprod** 65, 1403-1409.

Sartori, R., Fricke, P.M., Ferreira, J.C.P., Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., 2001b. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. **Biology of reproduction** 65, 1403-1409.

Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., Wiltbank, M.C., 2002. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. **Journal of Dairy Science** 85, 2803-2812.

Sayasith, K., Bouchard, N., Doré, M., Sirois, J., 2006. Molecular cloning and gonadotropin-dependent regulation of equine prostaglandin F 2α receptor in ovarian

follicles during the ovulatory process in vivo. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators** 80, 81-92.

Schams, D., 1986. Luteal peptides and intercellular communication. **Journal of reproduction and fertility. Supplement** 34, 87-99.

Schats, R., Soto, A.M., Sonnenschein, C., 1984. Estrogen-induced cell multiplication: direct or indirect effect on rat uterine cells? **Endocrinology** 115, 501-506.

Schneider, A., Absalon-Medina, V., Esposito, G., Corrêa, M., Butler, W., 2013. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals** 48, 989-994.

Seval, Y., Cakmak, H., Kayisli, U.A., Arici, A., 2006. Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 91, 2349-2357.

Sheldon, I.M., Cronin, J.G., Healey, G.D., Gabler, C., Heuwieser, W., Streyll, D., Bromfield, J.J., Miyamoto, A., Fergani, C., Dobson, H., 2014. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction** 148, R41-R51.

Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A., Dobson, H., 2001. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. **The Veterinary record** 148, 172-175.

Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I., Richards, J.S., 2006. Paracrine and Autocrine Regulation of Epidermal Growth Factor-Like Factors in Cumulus Oocyte Complexes and Granulosa Cells: Key Roles for Prostaglandin Synthase 2 and Progesterone Receptor. **Molecular Endocrinology** 20, 1352-1365.

Silva, J., Figueiredo, J., Van den Hurk, R., 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology** 71, 1193-1208.

Silvia, W., Lewis, G., McCracken, J., Thatcher, W., Wilson Jr, L., 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 α during luteolysis in ruminants. **Biology of reproduction** 45, 655-663.

Simplício, K.M.M.G., Rocha, T.G., Sanchez, D.C.C., Cotrim, F.S., Silva, P.C., Fagliari, J.J., 2017. Serum concentrations of acute phase proteins in goats and ewes

with naturally acquired *Staphylococcus aureus* mastitis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 69, 285-292.

Singh, J., Murray, R.D., Mshelia, G., Woldehiwet, Z., 2008. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *The Veterinary Journal* 175, 301-309.
Skarzynski, D.J., Jaroszewski, J.J., Okuda, K., 2005. Role of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in luteolysis in cattle. **Domestic animal endocrinology** 29, 340-346.

Socha, B.M., Łupicka, M., Szczepańska, A.A., Korzekwa, A.J., 2017. PPAR expression throughout the oestrous cycle in the bovine endometrium. **Theriogenology** 100, 88-94.

Sponchiado, M., Gomes, N.S., Fontes, P.K., Martins, T., del Collado, M., Pastore, A.d.A., Pugliesi, G., Nogueira, M.F.G., Binelli, M., 2017. Pre-hatching embryo-dependent and -independent programming of endometrial function in cattle. **PLoS one** 12, e0175954.

Stevenson, K.R., Riley, P.R., Stewart, H.J., Flint, A.P., Wathes, D.C., 1994. Localization of oxytocin receptor mRNA in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. **J Mol Endocrinol** 12, 93-105.

Stocco, C., 2008. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. **Steroids** 73, 473-487.

Sudo-Hashai, L.S., 2010. **Capítulo 37 Prostaglandinas (Eicosanoides)**. Roberto DeLucia (Org.), 474.

Sugimoto, Y., Inazumi, T., Tsuchiya, S., 2014. Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. **Journal of biochemistry**, mvu081.

Teng, C.T., 1999. Regulation of lactoferrin gene expression by estrogen and epidermal growth factor. **Cell biochemistry and biophysics** 31, 49-64.

Tervit, H., Havik, P., 1976. A modified technique for flushing ova from the sheep uterus. **New Zealand veterinary journal** 24, 138-140.

Thomas, G., Martin, G., Ford, J., Moore, P., Campbell, B., Lindsay, D., 1988. Secretion of LH, FSH and oestradiol-17 β during the follicular phase of the oestrous cycle in the ewe. **Australian journal of biological sciences** 41, 303-308.

Tibbetts, T.A., Conneely, O.M., O'Malley, B.W., 1999. Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. **Biology of reproduction** 60, 1158-1165.

Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., Pennington, D.J., 2014. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843, 2563-2582.

Walsh, S.W., Mehta, J.P., McGettigan, P.A., Browne, J.A., Forde, N., Alibrahim, R., Mulligan, F., Loftus, B., Crowe, M.A., Matthews, D., 2012. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. **Physiological genomics** 44, 504-517.

Wells, B., Innocent, G.T., Eckersall, P.D., McCulloch, E., Nisbet, A.J., Burgess, S.T.G., 2013. Two major ruminant acute phase proteins, haptoglobin and serum amyloid A, as serum biomarkers during active sheep scab infestation. **Vet. Res.** 44, 103-103.

Williams, G., Amstalden, M., Garcia, M., Stanko, R., Nizielski, S., Morrison, C., Keisler, D., 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology** 23, 339-349.

Wiltbank, M., Gümen, A., Sartori, R., 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology** 57, 21-52.

Winuthayanon, W., Lierz, S.L., Delarosa, K.C., Sampels, S.R., Donoghue, L.J., Hewitt, S.C., Korach, K.S., 2017. Juxtacrine Activity of Estrogen Receptor α in Uterine Stromal Cells is Necessary for Estrogen-Induced Epithelial Cell Proliferation. **Scientific Reports** 7, 8377.

Zhang, S., Liu, B., Gao, L., Mao, W., Fu, C., Duritahala, D., Zhang, N., Zhang, Y., Shen, Y., Cao, J., 2017. Prostaglandin F₂ α -PTGFR signalling activation, growth factor expression and cell proliferation in bovine endometrial explants. **Reproduction, fertility, and development** 29, 2195-2205.

Zhu, L., Pollard, J.W., 2007. Estradiol-17 β regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104, 15847-15851.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal (Artigo 1)



Pelotas, 13 de novembro de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)

Para: Professor Arnaldo Diniz Vieira

Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “Níveis de estresse determinados por diferentes estratégias de coleta de embriões em ovinos”, processo nº23110.007357/2012-19, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitação: 31 ovinos com 4 anos de idade.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 7357).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Presidente da CEEA

Ciente em: 13 / 11 / 2012

Assinatura do Professor Responsável:

Anexo II - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal (Artigo 2)



Pelotas, 16 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Bernardo Garzeira Gasperin
Departamento de Patologia - Faculdade de Veterinária

Senhor Pesquisador:

A *CEEA* analisou a solicitação o projeto intitulado: “**Controle da ovulação em bovinos e suínos**”, processo nº23110.000288/2015-65, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 0288-2015**).

Vigência do Projeto: 17/11/2015 a 20/12/2019

Espécie/Linhagem: Suínos e Bovinos/variados

Nº de animais: 740 suínos e 110 bovinos

Idade: 4 meses a 4 anos (suínos) e 2 a 8 anos (bovinos)

Sexo: Fêmeas

Origem: Granjas comerciais de suínos e Fazenda Experimental de Bovinos

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2015

Assinatura do Professor Responsável: _____

Anexo III - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal (Artigo 3)



Pelotas, 27 de abril de 2016

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do estradiol no proestro/estro sobre ambiente folicular e uterino de bovinos", registrada com o nº23110.008447/2015-70, sob a responsabilidade de **Thomaz Lucia Jr.** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - atendeu às solicitações e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 11/04/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	28/04/2016 a 20/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Bovina/SRD
Nº de animais	60
Idade	3-6 anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Propriedade em Piratini/RS, BR 293-Km58

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº CEEA 8447-2015).


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:

Ciente em: 10/05/2016

