

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FUNÇÃO ENDÓCRINA DO INTERFERON-TAU
DURANTE O RECONHECIMENTO MATERNO DA
GESTAÇÃO EM OVINOS**

TESE DE DOUTORADO

Alfredo Quites Antoniazzi

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**FUNÇÃO ENDÓCRINA DO INTERFERON-TAU DURANTE O
RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM
OVINOS**

por

Alfredo Quites Antoniazzi

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. João Francisco Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**FUNÇÃO ENDÓCRINA DO INTERFERON-TAU DURANTE O
RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM OVINOS**

elaborada por
Alfredo Quites Antoniazzi

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

João Francisco Coelho de Oliveira, Dr.
(Presidente/Orientador)

Thomas R. Hansen, PhD. (CSU)

José Carlos Ferrugem Moraes, Dr. (EMBRAPA)

Mario Binelli, PhD. (USP)

Luiz Ernani Henkes, Dr. (Unipampa)

Santa Maria, 09 de junho de 2010.

DEDICATÓRIA

Dedico o meu trabalho a minha família.

Especialmente ao meu filho Benjamin e a minha esposa Mauren.

AGRADECIMENTOS

A minha família. Ao meu pai e minha mãe, pelos ensinamentos de vida, por todo apoio em meus estudos e sempre ao meu lado. As minhas irmãs Isabel e Luiza, que sempre me apoiaram. A Mauren que me apoiou incondicionalmente, com muita paciência, compreensão e muita ajuda em todos os momentos.

Ao Dr. João Francisco “JF” de Oliveira, meu orientador, sempre a disposição e pronto para ajudar.

Ao Dr. Thomas R. Hansen, que me recebeu em seu laboratório para meu estágio sanduíche.

Ao Dr. Luiz Henkes, que nos recebeu em Fort Collins. Pelos ensinamentos e amizade.

Aos membros do Hansen lab.

Ao Juliano Silveira pela ajuda nas necropsias e com biologia molecular.

A toda equipe do ARBL.

Ao BioRep.

Ao CNPq, CAPES e USDA pelo apoio financeiro.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

FUNÇÃO ENDÓCRINA DO INTERFERON-TAU DURANTE O RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM OVINOS

Autor: Alfredo Quites Antoniazzi

Orientador: João Francisco Coelho de Oliveira

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de junho de 2010.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta do interferon-tau (IFNT) em tecidos extra uterinos utilizando dois modelos experimentais. O primeiro, com a utilização de amostras coletadas nos dias 12, 13, 14 e 15 do ciclo estral ou da gestação e o segundo com a instalação de bombas osmóticas de infusão contínua por 24 ou 72 horas. Formulou-se a hipótese que o IFNT é liberado na veia uterina em torno do dia 13 da gestação. Também, que após 24 ou 72 horas de infusão na veia uterina, o interferon-tau é capaz de induzir a expressão de genes estimulados pelo interferon (ISGs) no corpo lúteo, fígado e endométrio. A resposta no corpo lúteo é capaz de modular genes envolvidos na luteólise. Para isso, foram coletados endométrio, corpo lúteo, fígado, veia uterina, sangue das veias jugular e uterina, nos dias 12, 13, 14 e 15 do ciclo estral ou gestação. A instalação das bombas osmóticas de infusão por 24 e 72 horas foi realizada no dia 10 do ciclo estral, onde metade dos animais receberam infusão de albumina bovina (grupo BSA) e outra metade de IFNT recombinante ovino (ro; grupo roIFNT). Nos animais infundidos por 24 horas, metade de cada grupo BSA ou roIFNT, recebeu um desafio com prostaglandina F2 alfa (PGF; grupos BSA+PGF e roIFNT + PGF) 12 horas após a instalação das bombas. Concentrações sericas de progesterona foram iguais nos dias 12 e 13, e diminuíram ($P<0,05$) a menos de 1 ng/ml entre os dias 14 e 15 nos animais cíclicos. A expressão de ISG15 endometrial aumentou ($P<0,05$) no dia 13 em ovelhas prenhes, e permaneceu elevada até o dia 15. A expressão dos receptores de estrógeno alfa (ESR1) e de ocitocina (OXTR) aumentaram ($P<0,05$) em ovelhas cíclicas comparadas com prenhes no dia 14, permanecendo elevadas no dia 15. A expressão de ISG15 na veia uterina não apresentou diferença em função da gestação. A expressão dos receptores de Interferon tipo I não apresentou diferença em função da prenhez no corpo lúteo. No corpo lúteo e fígado, a expressão de ISG15 aumentou no dia 14 da gestação, permanecendo no dia 15. A expressão luteal de ESR1, OXTR, receptores de PGF (PTGFR), e E2 subtipos 2 (PTGER2), 3 (PTGER3) e 4 (PTGER4) não apresentaram diferença em função da gestação nos dias 12, 13, 14, e 15. Após 24 horas de infusão, a expressão luteal de ESR1, OXTR, PTGER2 e PTGER3, não apresentaram diferenças. O transportador de prostaglandinas diminuiu nos grupos BSA+PGF, roIFNT e roIFNT+PGF ($P<0,001$). O receptor PTGFR diminuiu a expressão ($P<0,001$) nos grupos roIFNT e roIFNT+PGF, e o receptor PTGER4 aumentou ($P<0,05$) nos

grupos roIFNT e roIFNT+PGF. Em 72 horas de infusão, não foi observada diferença na secreção de progesterona. A expressão de ISG15 nos animais do grupo roIFNT aumentou ($P < 0,01$) no corpo lúteo, fígado e endométrio. Assim, a função endócrina do IFNT ocorre com a expressão de ISG15 no dia 14 da gestação no corpo lúteo e no fígado. Portanto, a ação endócrina do IFNT acontece entre os dias 13 e 14 da gestação e pode proteger o corpo lúteo por mecanismos complementares ao mecanismo anti luteolítico parácrino endometrial.

Palavras-chave: IFNT, ISG15, gestação, ovinos.

ABSTRACT

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ENDOCRINE ACTION OF INTERFERON-TAU DURING THE MATERNAL RECOGNITION OF PREGANANCY IN SHEEP

Author: Alfredo Quites Antoniazzi

Advisor: João Francisco Coelho de Oliveira

Date and Place of defense: Santa Maria, June 09, 2010.

The objective of the present study is to evaluate interferon-tau (IFNT) endocrine action in extra uterine tissues. The first approach consists of collecting samples from ewes on days 12, 13, 14 and 15 of the estrous cycle or early pregnancy. The second, consists of installing osmotic pumps to deliver a continuous concentration of recombinant ovine (ro) IFNT into the uterine vein for 24 or 72 hours. Our hypothesis is that endocrine release of IFNT into the uterine vein occurs as early as Day 13 of pregnancy. Also, that 24 and 72 hours infusion of roIFNT induces ISGs in the CL, liver and endometrium and IFNT has endocrine action on the CL to modulate major genes involved in luteolysis. Endometrium, liver, corpus luteum, uterine vein, jugular and uterine vein blood were collected from cyclic (NP) and pregnant (P) ewes on Days 12, 13, 14 and 15. Instalation of 24 and 72 hour pumps was done on Day 10 of the estrous cycle. Half were infused with BSA and the other half with roIFNT. Only in the 24 hour infusion, half of each group was challenged with a PGF injection at 12 hours following pump installation. Concentrations of progesterone in serum were similar on Days 12 and 13 and then declined ($P<0.05$) to less than 1 ng/ml in NP ewes between Days 14 and 15. Endometrial ISG15 mRNA increased ($P<0.05$) in P versus NP ewes by Day 13 and remained greater through Day 15. Endometrial ESR1 and OXTR mRNAs were up-regulated ($P<0.05$) in NP compared to P ewes by Day 14, and remained up-regulated on Day 15. Uterine vein ISG15 mRNA was not affected by pregnancy status. IFNAR1 and IFNAR2 mRNA were present in the CL, but did not change due to pregnancy status. ISG15 mRNA in CL and liver increased ($P<0.05$) by Day 14 and remained up-regulated on Day 15 in P compared to NP ewes. The expression of ESR1, OXTR, PTGFR, PTGER2, PTGER3 and PTGER4 did not change in the corpus luteum during Days 12, 13, 14 and 15 related to pregnancy status. Following the 24 hour infusion, ESR1, OXTR, PTGER2 and PTGER3 mRNA were not affected, but SLCO2A1 mRNA decreased ($P<0.001$) in BSA+PGF, roIFNT and roIFNT+PGF compared to BSA-infused ewes. PTGFR mRNA was down regulated ($P<0.001$) in roIFNT and roIFNT+PGF compared to BSA and BSA+PGF-infused ewes. PTGER4 mRNA was greater ($P<0.05$) in roIFNT and roIFNT+PGF compared to BSA, but not compared to BSA+PGF-infused ewes. After 72 hours, concentrations of progesterone did not differ in roIFNT- compared to BSA-infused ewes. ISG15 mRNA was induced in the CL,

liver and endometrium in roIFNT- compared with BSA-infused ewes. Endocrine action of IFNT occurred through up-regulation of ISG15 mRNA in CL and liver by Day 14 of pregnancy. It is concluded that IFNT has endocrine effects on the CL between Days 13 and 14 of pregnancy and may protect the CL through mechanisms that are complementary, yet independent to its paracrine effects on the OXTR endometrial pathway.

Key words: IFNT, ISG15, pregnancy, sheep.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIG 1. Progesterone levels and intra uterine response during early pregnancy. Concentration of serum progesterone (A) in non-pregnant and pregnant ewes of estrous cycle or early pregnancy. Relative expression to *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$) of mRNA levels of *ISG15* (B), *ESR1* (C) and *OXTR* (D) in the endometrium, on Days 12, 13, 14 and 15 from estrous cycle or early pregnancy in sheep. Data are presented as mean (\pm SEM). * ($P < 0.05$)..... 49

FIG 2. Blood levels of ISG15 in the jugular and uterine veins blood. Relative expression to *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$) of mRNA levels for *ISG15* in the jugular (A) and uterine vein (B) blood on Days 12, 13, 14 and 15 from estrous cycle or early pregnancy in sheep. Data are presented as mean (\pm SEM). * ($P < 0.05$). 50

FIG 3. ISG15 response to early pregnancy in extra uterine tissues (Uterine vein, liver and corpus luteum). Relative expression to *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$) of mRNA levels for *ISG15*. Uterine vein (A), Liver (B) and Corpus luteum (C) *ISG15* mRNA expression on Days 12, 13, 14 and 15 from estrous cycle or early pregnancy in sheep. Data are presented as mean (\pm SEM). * ($P < 0.05$). 51

FIG 4. Prostaglandin transporter expression in the uterine vein tissue and corpus luteum. Relative expression to *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$) of mRNA levels for *SLCO2A1*. Uterine vein (A) and Corpus luteum (B) on Days 12, 13, 14 and 15 from estrous cycle or early pregnancy in sheep. Data are presented as mean (\pm SEM). * ($P < 0.05$). 52

CAPÍTULO 2

FIG 1. Progesterone levels during 72 hour infusion of roIFNT into the uterine vein. Concentration of serum progesterone at 0 (surgery), 24, 48 and 72 hours following osmotic pump installation and delivery of 200 μ g BSA or roIFNT/d. Data are presented as mean (\pm SEM). 82

FIG 2. Interferon Type 1 receptor (IFNAR1 and IFNAR2) mRNA concentrations in CL ipsilateral or contralateral to uterine vein infusion of either BSA or roIFNT (200µg/d for 3d). Values represent the mean \pm SEM of mRNA expression relative to *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$) of mRNA concentrations for *IFNAR1* (A) and *IFNAR2* (B) * (P<0.05) 83

FIG 3. *ISG15* mRNA expression in the CL, liver and endometrium following 72 hour infusion of BSA or roIFNT (200µg/d) into the uterine vein, beginning on Day 10 of estrous cycle. Relative expression to *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$) of mRNA levels for *ISG15* in the corpus luteum (ipsi and contralateral), liver and endometrium. Data are presented as mean (\pm SEM). * (P<0.05)... 84

FIG 4. Luteal *SLCO2A1*, *PTGFR* and *PTGER4* mRNA concentrations following 24 and 72 hour infusion of BSA or roIFNT (200 µg/d) into the uterine vein. Relative expression to *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$) of mRNA levels for *SLCO2A1* 24 (A) and 72 hours (D), *PTGFR* 24 (B) and 72 hours (E), and *PTGER4* 24 (C) and 72 hours (F) following osmotic infusion of BSA and roIFNT into the uterine vein, beginning at Day 10 of estrous cycle. Data are presented as mean (\pm SEM)..... 85

FIG 5. Endometrial *ESR1* and *OXTTR* mRNA concentrations following 24 and 72 hour infusion of BSA or roIFNT (200 µg/d) into the uterine vein. Relative expression to *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$) of mRNA levels for *ESR1* 24 (A) and 72 hours (C), and *OXTTR* 24 (B) and 72 hours (D) following 24 and 72 hour infusion of BSA and roIFNT into the uterine vein, beginning at Day 10 of estrous cycle. Data are presented as mean (\pm SEM)..... 86

FIG 6. Immunohistochemistry of *ISG15* and *PTGFR* protein in ovine CL following 24 hour infusion of . Representative immunohistochemical localization of *ISG15* (A) and *PTGFR* (B) in CL following 24 hour infusion of BSA or roIFNT (200 µg/d) into the uterine vein beginning on Day 10 of estrous cycle..... 87

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
SUMÁRIO	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O Corpo Lúteo	15
2.2 Luteólise.....	16
2.3 Receptores e transportador de prostaglandinas.....	18
2.4 Reconhecimento Materno da Gestação.....	19
2.5 O gene do interferon-tau	20
2.6 Receptores de Interferon tipo I e Genes estimulados por Interferons (ISGs)	21
2.7 Ação endócrina do interferon-tau	22
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	23
4. MODELOS EXPERIMENTAIS	24
5. CAPÍTULO 1	26
6. CAPÍTULO 2.....	53
7. DISCUSSÃO	88
8. CONCLUSÃO	91
9. REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

O reconhecimento materno da gestação é o período em que o concepto sinaliza sua presença para a mãe. Em ruminantes, este período requer o alongamento do embrião, que coincide com a máxima produção de interferon-tau (IFNT; Farin *et al.*, 1989; Guillomot *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 2002). O IFNT é um produto secretado pelo embrião de ruminantes em maior quantidade antes da implantação (Farin *et al.*, 1989; Guillomot *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 2002). É classificado como interferon do tipo I e sua principal função é evitar o retorno à ciclicidade preservando funcionamento do corpo lúteo durante a gestação (Roberts *et al.*, 2008). O IFNT produzido pelo concepto age de maneira parácrina no útero prevenindo a expressão dos receptores de estrógenos (ESR1) e oxitocina (OXTR) no epitélio luminal endometrial evitando a liberação de pulsos luteolíticos de prostaglandina F2 alfa (PGF; (Spencer e Bazer, 1996), hormônio responsável pelo início da luteólise (McCracken *et al.*, 1970). O IFNT liga-se a receptores de interferon tipo 1 (IFNAR1 e IFNAR2) com sinalização via Jak/STAT (Binelli *et al.*, 2001). Além da sua ação durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes, o IFNT aumenta a expressão de vários genes estimulados por interferons (ISGs) no útero (Mirando *et al.*, 1991), no corpo lúteo (Chen *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008) e em células sanguíneas (Yankey *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2006).

Recentemente, foi sugerido que o IFNT possui ação endócrina no corpo lúteo ovino (Oliveira *et al.*, 2008) e em recentes experimentos foi avaliada a expressão de ISGs em tecidos extra uterinos durante o início da prenhez em ovelhas. A ISG15 é uma proteína expressa no útero durante o início da gestação em resposta ao IFNT e possui função semelhante a uma ubiquitina (Austin *et al.*, 1996). Por imunohistoquímica foi também identificada a presença de ISG15 em células luteais grandes do corpo lúteo de ovelhas no dia 15 da gestação (Oliveira *et al.*, 2008). Nesse mesmo estudo também foi realizado um ensaio antiviral em sangue da veia jugular, artéria e veia uterina. Foi observada maior atividade antiviral no sangue da veia uterina em animais prenhes. Essa resposta antiviral típica de interferons tipo I é compatível com a produção de IFNT durante o reconhecimento materno da gestação e sua atividade endócrina. Em outro estudo (Bott *et al.*, 2009), foram realizados ensaios antivirais com amostras de soro tratadas com anticorpo anti IFNT. Não foram observadas atividade antiviral nessas amostras, confirmando que a atividade antiviral detectada anteriormente referente a interferons do tipo I era correspondente ao IFNT.

Adicionalmente, pela primeira vez foi relatado a extensão do ciclo (pseudo gestação) além do dia 32 com a infusão na veia uterina de IFNT recombinante ovino por 7 dias.

Apesar da comprovação da saída do IFNT do útero durante o reconhecimento materno da gestação em ovinos, pouco se sabe em relação a ação endócrina do IFNT em tecidos extra uterinos. Neste contexto, o tecido alvo para futuras investigações é o corpo lúteo, por ser responsável pela produção de progesterona e pela proximidade ao útero. Basedo nisso, a hipótese a ser testada é que a entrada do IFNT na circulação da veia uterina ocorre em torno do dia 13 de gestação em concentrações suficientes para ativar receptores e estimular respostas (ISGs) em tecidos extra uterinos, tais como sangue (linfócitos), veia uterina, corpo lúteo e fígado. Além disso, que a infusão contínua de IFNT recombinante ovino com a utilização de uma bomba osmótica por 24 ou 72 horas na veia uterina, seria capaz de mimetizar o mecanismo endócrino do IFNT durante o reconhecimento materno da gestação em ovinos. Portanto, o presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a função endócrina do IFNT durante o período de reconhecimento materno da gestação em ruminantes. E também avaliar a resposta da infusão de roIFNT por 24 e 72 horas na veia uterina em tecidos extra uterinos, bem como no endométrio. Os resultados serão apresentados sob a forma de manuscritos, que posteriormente serão submetidos a um periódico científico. O primeiro manuscrito resulta dos experimentos relacionados ao ciclo estral e início da prenhez, já o segundo resulta dos experimentos relacionados a infusão contínua de roIFNT por 24 e 72 horas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Corpo Lúteo

O corpo lúteo foi primeiramente identificado por Coiter (1573) que observou no ovário a presença de cavidades preenchidas por conteúdo amarelado. Graaf (1672) deu a descrição definitiva ao observar que após o coito existia a presença de “corpos globulares” em ovários de coelhos que permaneciam até o momento do parto. Mas foi Malpighi (1689) que detalhou a estrutura microscópica destas estruturas nomeando-as de corpus luteum, literalmente corpo amarelo. Beard (1897) postulou que o corpo lúteo é responsável pela supressão da ovulação e estro durante a prenhez e Fraenkel (1903) demonstrou que era necessário para implantação e manutenção da gestação. Vários grupos mais tarde (1934), isolaram um hormônio, nomeado de progesterona por Slotta (1934), sugerindo sua fórmula estrutural, neste mesmo ano sintetizada por Butenandt e Westphal. Assim, o corpo lúteo é uma glândula temporária formada a partir de um folículo que ovulou, tendo como sua secreção primária a progesterona, esteróide necessário para o estabelecimento e manutenção da gestação, e ciclicidade ovariana na maioria dos mamíferos (McCracken *et al.*, 1999; Niswender *et al.*, 2000; Davis e Rueda, 2002).

O pico pré ovulatório de LH resulta na luteinização das células da teca e granulosa, alterando a rota esteroidogênica para a produção de progesterona pelas células luteais esteroidogênicas (Richards e Hedin, 1988; Wuttke *et al.*, 1998). As células luteais originadas das células da teca e granulosa dão origem a dois tipos celulares que diferem morfológica e fisiologicamente. As células originadas das células da granulosa têm sido consideradas células luteais grandes e aquelas da teca de células luteais pequenas. Além das células esteroidogênicas o corpo lúteo ainda possui células endoteliais, fibroblastos e leucócitos (Channing, 1969a; b). Em ovinos, foram isoladas e identificadas os dois tipos de células esteroidogênicas (Fitz *et al.*, 1982). Estes dois tipos celulares, grandes e pequenas, podem ser identificadas através de características morfológicas e bioquímicas (Niswender *et al.*, 1985). As células luteais grandes secretam aproximadamente 7 vezes mais progesterona quando não estimuladas quando comparadas com as pequenas (Kenny *et al.*, 1989). Ainda, as células luteais grandes são ditas esteroidogênicas constitutivas, porque apresentam proteína quinase A (PKA) constitutivamente ativa (Bogan e Niswender, 2007).

A disponibilização de colesterol livre pela colesterol esterase é a primeira etapa para a síntese de esteróides que é regulada agudamente por sistemas de segundos mensageiros (PKA) (Caffrey *et al.*, 1979). O passo seguinte, o transporte de colesterol pela membrana da mitocôndria pela enzima proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR), é considerado limitante para a esteroidogênese. Lin *et al.* (1995), observaram que uma mutação no gene StAR levou a uma menor produção de esteróides adrenais e gonadais. O colesterol no interior da mitocôndria é clivado pela enzima P-450 Side Chain Cleavage (SCC), levando a síntese de pregnenolona, o primeiro esteróide na esteroidogênese. A conversão de pregnenolona a progesterona ocorre no retículo endoplasmático liso pela enzima 3-beta hidroxisteróide desidrogenase (3 β -HSD). A rota de produção de progesterona é a menos complexa no ovário e as células adquirem capacidade de produção de progesterona em grandes quantidades com o aumento na expressão das enzimas necessárias para conversão de colesterol em progesterona (P-450 SCC e 3 β -HSD) e a diminuição de enzimas que convertem progesterona a estrógenos (17 α -hidroxilase e aromatase; (Bao e Garverick, 1998).

A progesterona age no endométrio como um fator de diferenciação (Cummings e Yochim, 1984). Também induz diferenciação do estroma, estimula secreções das glândulas endometriais, acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular e mudam o padrão de secreção de proteínas pelas células endometriais. Essas proteínas uterinas proporcionam um ambiente apropriado para o desenvolvimento inicial do embrião (para revisão (Niswender *et al.*, 2000).

2.2 Luteólise

Os ruminantes são espécies ovuladoras espontâneas e dependem inicialmente do agente luteolítico (PGF) uterino para restabelecer seu ciclo estral até que ocorra o reconhecimento de uma prenhez (Mccracken *et al.*, 1999). A PGF foi identificada como o fator uterino responsável pelo início da luteólise (Mccracken *et al.*, 1970). Na ovelha a fonte uterina de PGF é o epitélio endometrial luminal e epitélio glandular superficial (Gray *et al.*, 2000). A regressão luteal é dividida em duas fases: a luteólise funcional que compreende a diminuição na produção de progesterona e a luteólise estrutural que corresponde à regressão estrutural do corpo lúteo (Davis e Rueda, 2002).

No início do diestro a secreção de progesterona favorece o acúmulo de fosfolipídeos de membrana para síntese de PGF (Mccracken *et al.*, 1984) e bloqueia o aparecimento de

ESR1 e OXTR (Spencer *et al.*, 1995). A progesterona pode agir nos OXTR por uma via não genômica bloqueando o sítio de ligação da ocitocina (Bishop e Stormshak, 2006) ou de maneira indireta, inibindo a síntese de ESR1 e consequentemente OXTR. Ao final da fase luteal, a progesterona causa *down regulation* de seus receptores, permitindo um retorno da ação estrogênica centralmente no hipotálamo e periferalmente no útero (Mccracken *et al.*, 1999), permitindo um rápido aumento na expressão de ESR1 (Spencer *et al.*, 1995). Os estrógenos determinam o aumento da expressão de OXTR no endométrio (Spencer *et al.*, 1995) e liberação de ocitocina pela hipófise posterior. A ligação da ocitocina com seu receptor estimula a síntese e secreção de PGF. Em ruminantes, existem pulsos luteais de ocitocina síncronos com pulsos de PGF (Mccracken *et al.*, 1999). A ação da ocitocina na síntese de PGF foi sugerida através da ativação da rota da fosfolipase C (PLC) (Fleet *et al.*, 1994). No entanto, outros estudos indicaram que a ocitocina ativa diretamente a fosfolipase A2 (PLA2) (Lee e Silvia, 1994). A ação da ocitocina em seus receptores provoca a liberação de pulsos de PGF responsáveis pelo início das luteólise (Wathes e Lamming, 1995).

Uma rota local esta envolvida na luteólise em bovinos, porcos da índia, hamsters, ratos, ovelha e suínos. Em bovinos, ovinos e suínos, a arteria ovarica está em íntima aposição à veia útero ovariana, e somente na vaca e na ovelha a area de contato e aumentada em função da arteria apresentar um tortuoso caminho sobre a veia (Ginther, 1974). McCracken e colaboradores (Mccracken *et al.*, 1971) relatam que quando se injeta PGF na veia uterina de ovelha, a PGF passa diretamente para a arteria ovariana ispilateral. Em outro experimento, Ginther et al. causaram luteólise na ovelha com 2 mg de PGF quando injetado intra uterino e regressão parcial quando injetado sistemicamente (Douglas e Ginther, 1973). Assim, a PGF sai do útero em direção ao ovário pelo mecanismo de contra corrente entre a veia uterina e a artéria ovárica (Ginther, 1974).

Prostaglandinas endometriais chegam ao corpo lúteo pela circulação local, sistêmica ou ambas, ambas na dependência da espécie de mamíferos. A produção intraluteal de prostaglandinas já foi reportada em várias espécies, suportando a idéia da ação local no controle da funcionalidade do corpo lúteo (Mccracken *et al.*, 1999; Niswender *et al.*, 2000; Davis e Rueda, 2002). Existem várias evidências de um sistema luteal de metabolismo, transporte e sinalização de PGE2 e PGF sugerindo que as prostaglandinas luteais possam contribuir para uma autoregulação do corpo lúteo (Hayashi *et al.*, 2003; Arosh, Banu, Chapdelaine *et al.*, 2004). E ainda, a estimulação luteal pela PGF aumenta a liberação de ocitocina luteal (Flint e Sheldrick, 1982), que potencializa a liberação de PGF uterina (Wathes e Lamming, 1995) e luteal (Shirasuna *et al.*, 2007).

2.3 Receptores e transportador de prostaglandinas

Prostaglandinas são sintetizadas a partir do ácido araquidônico, que apesar da característica lipofílica, se difundem fracamente pelas membranas celulares (Schuster, 1998). A PGF e a PGE2 exercem seus efeitos primariamente a partir de receptores acoplados a proteína G, PTGFR e PTGER, respectivamente. O PTGFR foi clonado em camundongos (Sugimoto *et al.*, 1994), humanos (Abramovitz *et al.*, 1994), bovinos (Sakamoto *et al.*, 1994) e ovinos (Graves *et al.*, 1995). O PTGER possui subtipos 1, 2, 3, and 4, e o PTGFR possui A e B (Narumiya *et al.*, 1999). As isoformas do PTGFR A e B em ovinos possuem a mesma sequência de amino ácidos, porém a forma A possui 46 amino ácidos adicionais, sugerindo que a forma B é truncada em relação a A (Pierce *et al.*, 1997). Os subtipos PTGER2 e PTGER4 estão acoplados a adenilato ciclase e exercem sua função ativando AMPc, que por sua vez ativa PKA. Já os subtipos PTGER1 e o PTGFR são acoplados a PLC gerando dois segundos mensageiros, o inositol tri fosfato (IP3), que gera um aumento no cálcio intracelular, e diacil glicerol (DAG) que ativa proteína quinase C (PKC). Existem ainda 4 isoformas do receptor PTGER3, com grande variação de mecanismos de ação, desde inibição de AMPc até um aumento de cálcio intracelular (Narumiya *et al.*, 1999). No corpo lúteo foi identificada a maior concentração de PTGFR (Powell *et al.*, 1974), com maior expressão nas células luteais grandes (Schwall *et al.*, 1986), que são a maior fonte de progesterona (Harrison *et al.*, 1987) e OXT (Rodgers *et al.*, 1983).

Em estudos com corpo lúteo, bovinos apresentaram receptores PTGFR em células endoteliais e células luteais pequenas em quantidade pouco significantes, ao contrário das células luteais grandes, nas quais são abundantes (Sakamoto *et al.*, 1994). Já em ovelhas foi identificado somente nas células luteais grandes, enquanto que as células luteais pequenas não respondem a ação da PGF (Niswender, 2002). A resposta luteal a PGF é a diminuição da síntese de progesterona, pela diminuição da captação e transporte de colesterol celular e pela diminuição da expressão de enzimas esteroidogênicas (Niswender *et al.*, 2000).

O corpo lúteo bovino apresenta todos os componentes necessários para a síntese, transporte e sinalização das prostaglandinas, e talvez estejam envolvidos com a vida e função luteal (Arosh, Banu, Kimmins *et al.*, 2004). Em experimentos utilizando cultura de endométrio ovino, foi avaliada a síntese de PGF e PGE2 nos dias 13, 15 e 17 do ciclo estral e da prenhez. Nenhuma diferença foi detectada no dia 13. A síntese de PGF foi maior no dia 15

e apresentou tendência a ser maior no dia 17 da prenhez do que nos dias 15 e 17 do ciclo estral. Já a PGE2 apresentou maior síntese no dia 15 e 17 da prenhez do que do ciclo estral. Quando foram avaliadas *in vivo*, a síntese das PGF e PGE2 seguiram o mesmo padrão descrito previamente *in vitro*. Isto demonstra que a secreção de PGF e PGE2 estão aumentadas no início da prenhez e suporta a hipótese que PGE2 possui papel importante na manutenção do corpo lúteo durante o início da prenhez (Ellinwood *et al.*, 1979).

O transportador de prostaglandina (SLCO2A1) foi identificado no endométrio ovino (Banu *et al.*, 2008) e transporta PGs tanto para o interior quanto para o exterior da célula. Em bovinos, acredita-se que o SLCO2A1 está envolvido em transporte celular tanto de PGF quanto de PGE2 no útero e no seu transporte do útero para o ovário através do plexo útero-ovariano. Em razão da função das prostaglandinas na regulação da função do corpo lúteo, parece ser importante avaliar a contribuição SLCO2A1 no corpo lúteo (Arosh, Banu, Chapdelaine *et al.*, 2004).

2.4 Reconhecimento Materno da Gestação

O reconhecimento materno da gestação pode ser considerado como a interação entre a mãe e o conceito, que sinaliza sua presença e a necessidade de manutenção da gestação. Este tipo de comunicação ocorre em diversos momentos durante a gestação, mas um dos momentos críticos em ruminantes envolve a regulação da manutenção do corpo lúteo pelo conceito, ou seja, uma atenuação da secreção luteolítica de PGF. Experimentos pioneiros realizados por Moor e Rowson na década de 60, proporcionaram evidências que o reconhecimento da gestação na ovelha ocorria entre os dias 12 e 13 de prenhez. Em 1966, foram realizados experimentos com transferência de embriões para úteros com porções isoladas. Os embriões transferidos eram capazes de manter 80% dos corpus lúteos adjacentes ao corno uterino grávido, enquanto que, transferidos para o corno uterino contralateral, não tiveram efeito na vida luteal. E quando a transferência de embriões foi realizada em receptoras com corpo lúteo nos dois ovários, o embrião foi capaz de manter somente o CL ipsilateral (Moor e Rowson, 1966). Já em 1976, Mapletoft *et al.* (Mapletoft *et al.*, 1976), realizaram experimentos isolando o corno uterino contralateral a prenhez e anastomozaram a artéria ovariana ipsilateral à prenhez com o ovário contralateral. O corpo lúteo do ovário contralateral quando anastomozado com a artéria ovarica do corno ipsilateral manteve a prenhez.

No final da década de 70 foi estabelecido que a manutenção do corpo lúteo no início da gestação é resultado da produção de um fator protéico produzido pelo concepto (Martal *et al.*, 1979). No início da década de 80, foi purificada uma proteína secretada pelo concepto ovino com características de uma anti-luteolísina. Essa proteína era o principal produto de conceptos ovinos em cultura e foi inicialmente chamada de proteína X (Godkin *et al.*, 1982). Esta proteína, posteriormente denominada de trofoblastina ovina (oTP-1), era a de maior abundância secretada pelo concepto entre os dias 10 e 12 da prenhez (Godkin *et al.*, 1984).

Já no final da década de 80 esta proteína foi associada com a função anti-luteolítica e consequentemente o reconhecimento materno da gestação, e após o conhecimento de sua sequência (Imakawa *et al.*, 1987) foi renomeada para interferon-tau (IFNT; (Roberts *et al.*, 1989; Roberts *et al.*, 1992), devido a sua semelhança estrutural com os interferons tipo I. Essa associação atraiu atenção, pois além das funções anti-virais e imunomoduladoras dos Interferons, essa proteína possuía ação no contexto reprodutivo.

O concepto ovino secreta IFNT entre os dias 10 e 21-25, com pico de secreção entre os dias 14 e 16 da gestação. Já no bovino a secreção ocorre entre os dias 12 e 21-26, com pico entre os dias 15 e 16 (Farin *et al.*, 1990; Roberts, 1991; Roberts *et al.*, 1991). Como resposta, o IFNT inibe a transcrição de receptores de estrógenos (ESR1; (Spencer e Bazer, 1995; 1996) e ocitocina (OXTR; (Spencer e Bazer, 1996; Chen *et al.*, 2006) no endométrio no momento do reconhecimento materno da gestação, evitando a luteólise na ovelha (Zarco, Stabenfeldt, Basu *et al.*, 1988; Zarco, Stabenfeldt, Quirke *et al.*, 1988). Esse momento na ovelha, corresponde a elongação do blastocisto esférico em filamentosos entre os dias 10 e 17 da gestação (Spencer *et al.*, 2004).

2.5 O gene do interferon-tau

O gene do IFNT expresso pelo concepto dos ruminantes possui uma homologia de aproximadamente 70% com o interferon-omega de humanos. Apresenta uma única região de leitura (do inglês *open reading frame*) de 595 pares de bases, que codifica uma sequência primária (pré-proteína) de 195 aminoácidos, com uma região sinalizadora com 23 aminoácidos, que é clivada para formar a proteína de 172 aminoácidos (Roberts *et al.*, 2003).

O início da expressão do gene do IFNT parece ser programado geneticamente independente do ambiente uterino, pois ele é expresso em sistemas *in vivo* e *in vitro*. No entanto, a produção de IFNT é influenciada pelo ambiente uterino, pois a produção *in vitro*

aumenta na presença de tecido uterino (Kerbler *et al.*, 1997). A expressão termina com a implantação, pois o contato do trofoblasto com o endométrio cessa a produção de IFNT (Demmers *et al.*, 2001).

Recentemente foram identificados alguns fatores de transcrição que possuem papel importante na regulação da transcrição do gene do IFNT. O fator de transcrição Ets2 possui um papel fundamental na regulação da transcrição de IFNT durante o início da prenhez (Ezashi *et al.*, 1998), juntamente com outros co-ativadores e repressores (para revisão ver (Ealy e Yang, 2009).

2.6 Receptores de Interferon tipo I e Genes estimulados por Interferons (ISGs)

Os receptores de interferon tipo I (IFNAR1 e IFNAR2) são expressos em todos os tecidos corporais e tem como função principal mediar respostas antivirais. Também estão localizados no útero ovino, para mediar respostas maternas em função do IFNT produzido pelo concepto (Rosenfeld *et al.*, 2002). O IFNT se liga a esses receptores para exercer sua ação, e a via de transdução de sinais é a Jak/STAT, onde as proteínas tirosino-quinases fosforilam proteínas STAT formando complexos multiméricos agindo como fatores de transcrição (Binelli *et al.*, 2001). Esses complexos se ligam em regiões definidas no DNA chamadas de elemento responsivo à estimulação por interferons (ISRE) regulando a expressão de ISGs (Hansen *et al.*, 1999).

Dentre os ISGs que aumentam sua expressão durante o início da gestação em resposta ao IFNT, estão o 2',5' oligoadenilato sintetase (OAS; (Mirando *et al.*, 1991; Schmitt *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 2001), o gene de resistência ao myxovirus 1 (MX1; (Ott *et al.*, 1998) e o gene estimulado pelo interferon 15 (ISG15; (Naivar *et al.*, 1995; Austin *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1999). Estudos recentes demonstraram a expressão de ISGs em células do sangue (Yankey *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2006; Gifford *et al.*, 2007) e corpo lúteo (Oliveira *et al.*, 2008), logo após a sinalização por IFNT no início da gestação em ruminantes.

O ISG15 recebeu inicialmente o nome de proteína com reação cruzada a ubiquitina por apresentar reação cruzada com o anticorpo contra ubiquitina (Austin *et al.*, 1996). E também foi demonstrada estar aumentada no endométrio de camundongos (Austin *et al.*, 2003) e humanos (Bebington *et al.*, 1999) em resposta a gestação. O ISG15 é induzido por interferon tipo I e pode conjugar-se a outras proteínas (Loeb e Haas, 1992).

2.7 Ação endócrina do interferon-tau

Estudos recentes avaliaram a expressão de ISG15 em tecidos extra uterinos durante o início da gestação em ovinos (Oliveira *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2009). A expressão de ISG15 foi maior em células luteais grandes no dia 15 da gestação comparado com células luteais grandes de ovelhas não prenhes com a utilização de PCR em tempo real, western blot e imunohistoquímica (Oliveira *et al.*, 2008). Também foi realizado um ensaio antiviral para avaliar níveis de IFN no sangue da veia e artéria uterina e veia jugular. Os resultados do ensaio antiviral apresentaram maiores níveis de bioatividade de IFN no sangue de animais prenhes no dia 15 da gestação, quando comparados a animais não prenhes (Oliveira *et al.*, 2008). Posteriormente, amostras de soro sanguíneo da veia uterina de animais prenhes no dia 15 da gestação que foram pré-adsorvidos com anticorpo anti-IFNT, apresentaram uma menor atividade antiviral. Portanto, este resultado indica que o IFN tipo I responsável pela atividade antiviral na veia uterina no dia 15 da gestação é o IFNT (Bott *et al.*, 2009).

Um novo modelo para estudar a ação endócrina do IFNT foi desenvolvido (Bott *et al.*, 2009). Inicialmente, dois diferentes métodos foram testados. O primeiro foi uma única injeção na artéria ovárica e o segundo foi a instalação de uma bomba osmótica para infusão contínua na veia uterina. Os dois métodos foram eficazes e induziram ISGs no CL. No entanto, a infusão contínua de IFNT na veia uterina resultou em maior expressão de ISG15 luteal comparada a injeção única na artéria ovarica. Por esta razão, a infusão contínua de IFNT na veia uterina foi escolhida como modelo para avaliar a função endócrina do IFNT. Um dos resultados mostrou que a infusão contínua de roIFNT por 7 dias na veia uterina, iniciando no dia 10 do ciclo estral, prolongou o intervalo entre estros por mais de 32 dias (Bott *et al.*, 2009).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

Após a identificação da ação antiviral no sangue da veia uterina em função do IFNT durante o período de reconhecimento materno da gestação em ruminantes (Oliveira *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2009), estudos e pesquisas vem sendo desenvolvidos com outra abordagem. Anteriormente, alguns genes foram avaliados em tecidos extra uterinos, com a hipótese da existência de uma interferomedina. Logo, pode se avaliar a influência endócrina do IFNT em outros órgãos, como o corpo lúteo. Assim, ainda ficam algumas perguntas, se o mecanismo antiluteolítico e luteotrófico endometrial e luteal possuem similaridades. Durante um certo período do início da gestação, o corpo lúteo quando desafiado com PGF diminui a produção de progesterona, mas recupera, o que não acontece durante o mesmo período do ciclo estral.

No presente estudo foi utilizado um modelo experimental que pudessemos avaliar diferentes respostas em função do ciclo estral ou início da gestação. Foram escolhidos os dias 12, 13, 14 e 15 do ciclo estral ou da gestação em ovinos, para que o IFNT, inicialmente secretado em torno do dia 10 da gestação pelo concepto, tenha um período de ação. Ainda, utilizamos um modelo de infusão contínua de IFNT recombinante ovino por 24 ou 72 horas diretamente na veia uterina no dia 10 do ciclo estral, para avaliarmos somente a função endócrina do IFNT, eliminando a ação de prostaglandinas endometriais deste mecanismo. Portanto, a hipótese é que o IFNT tem ação endócrina durante o reconhecimento materno da gestação em ovinos e que a infusão contínua de roIFNT na veia uterina por 24 ou 72 horas é capaz de mimetizar respostas endócrinas do IFNT da gestação. Para isso, os objetivos foram avaliar respostas a gestação em tecidos extra uterinos nos dias 12, 13, 14 e 15 do ciclo estral e início da gestação e avaliar a resposta no endométrio e tecidos extra uterinos após a infusão contínua de roIFNT por 24 ou 72 horas na veia uterina, iniciando no dia 10 do ciclo estral.

4. MODELOS EXPERIMENTAIS

4.1 Dia do ciclo estral e início da prenhez

Ovelhas adultas foram observadas diariamente para comportamento de estro com a utilização de machos caudoepididimectomizados. O dia em que a fêmea apresentou comportamento de estro foi considerado dia 0, onde metade delas foram colocadas com carneiro fértil e a outra metade mantidas sem qualquer contato. Assim os grupos foram determinados de acordo com o estatus de prenhez (não prenhe = NP e prenhe = P) e dias após a detecção do estro (12, 13, 14 e 15). Nos dias 12, 13, 14 e 15 do ciclo estral ou início da gestação as ovelhas foram eutanasiadas. Sangue das veias jugular e uterina, corpo lúteo, endométrio, veia uterina (tecido) e fígado foram coletados. Animais prenhes foram confirmados pela presença do embrião.

4.2 Infusão de roIFNT na veia uterina por 24 ou 72 horas

Ovelhas adultas foram observadas diariamente para comportamento de estro com a utilização de rufios e o dia de comportamento de estro foi considerado dia 0. No dia 10 bombas osmóticas foram carregadas com BSA (200µg) ou roIFNT (200µg), conectadas a um cateter, que foram implantadas cirurgicamente sobre o útero com o cateter inserido na veia uterina, como descrito em Bott *et al.* (2009). O cateter foi inserido na veia uterina proximal ao útero em relação ao plexo útero-ovarico. Em animais com a presença de CL nos dois lados, um deles foi anotado como ipsilateral e o outro como contralateral a implantação da bomba. Para garantir que a bomba estava infundindo quantidades especificadas pelo fabricante, dois animais foram eutanasiados adicionalmente as 12 h e 50% do conteúdo foi verificado. A proteção pela pré exposição ao IFNT foi verificada pelo desafio com a injeção de 4mg/58kg de PGF (i.m.) 12 h após a instalação das bombas em metade de cada grupo (BSA e roIFNT).

Ainda, bombas osmóticas de infusão contínua por 3 dias foram carregadas com BSA ou roIFNT (200µg/dia), instaladas cirurgicamente no dia 10 do ciclo estral com descrito para as bombas de infusão contínua por 24 horas. Sangue foi coletado no momento da cirurgia, 24, 48 e 72 h após a cirurgia para avaliação de níveis de progesterona. Todos os animais foram

eutanasiados 72 h após a infusão contínua de BSA ou roIFNT para coleta de CL, endométrio, fígado e sangue das veias jugular e uterina, como mencionado anteriormente.

5. CAPÍTULO 1

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:

**TEMPORAL CONTROL OF ENDOMETRIAL AND
ENDOCRINE ACTIVATION OF INTERFERON
STIMULATED GENES DURING EARLY PREGNANCY IN
SHEEP.**

**Alfredo Q. Antoniazzi, Ryan L. Ashley, Natalia P. Smirnova, Brett T.
Webb, Cristina M. Weiner, João F. C. Oliveira, Thomas E. Spencer, Fuller
W. Bazer, Thomas R. Hansen.**

Biology of Reproduction, 2010

FIGURE 1

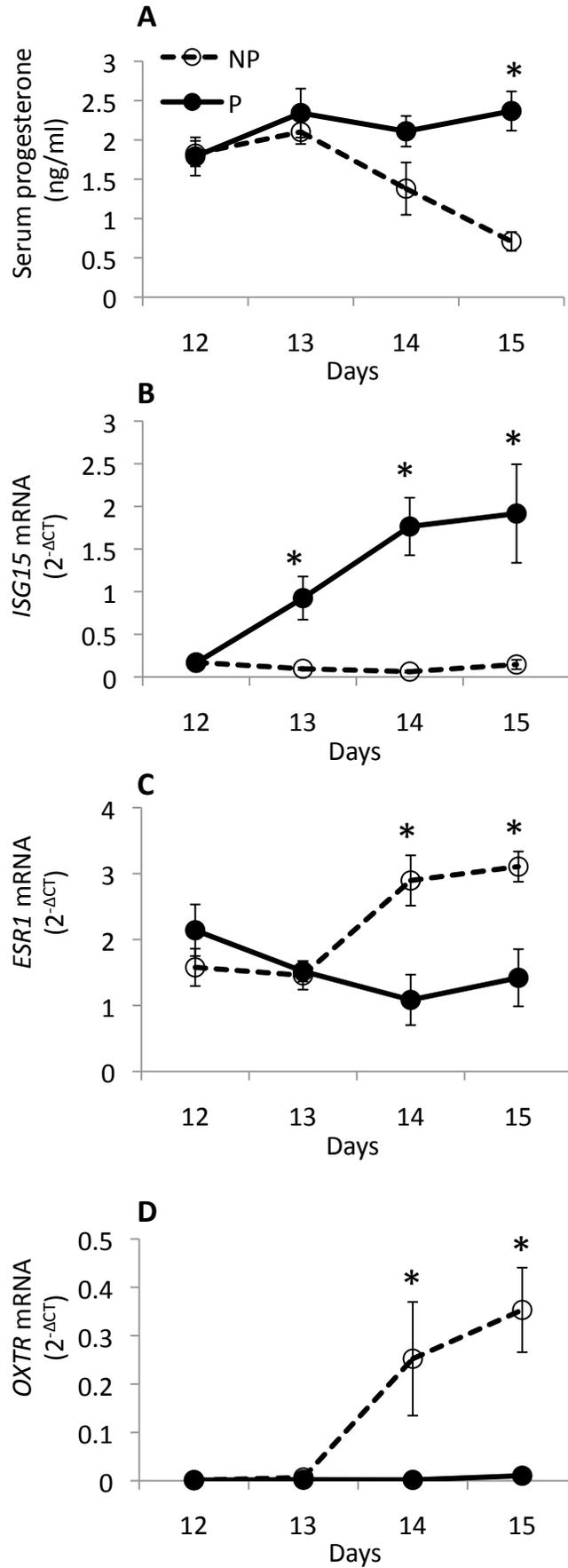


FIGURE 2

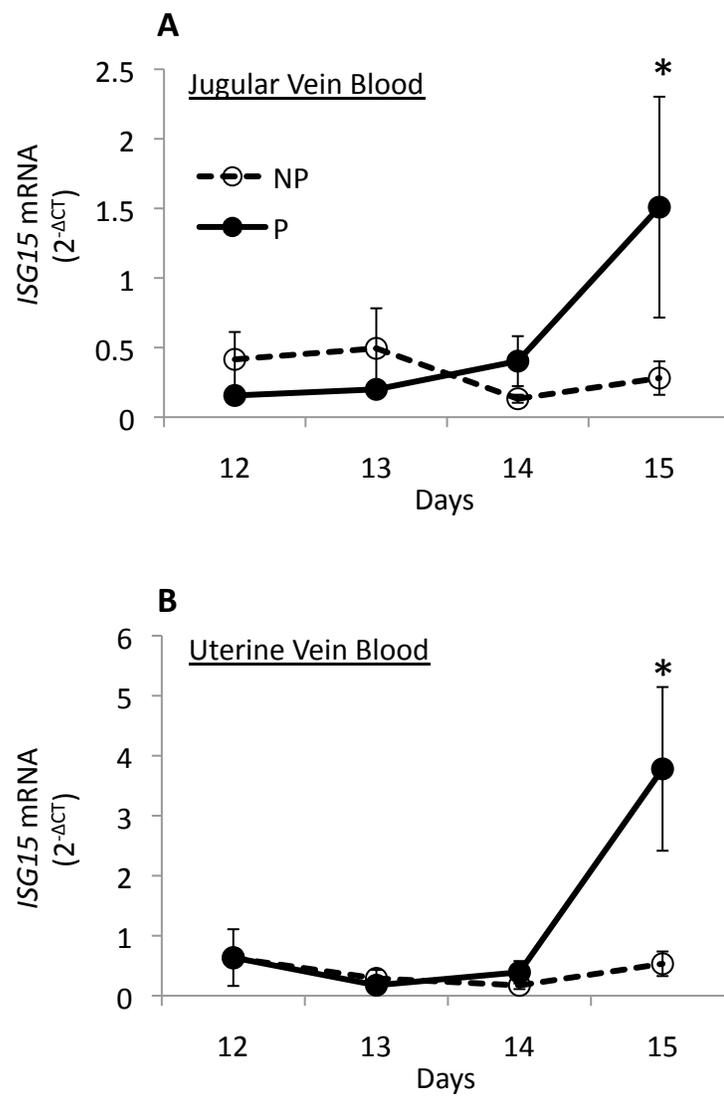


FIGURE 3

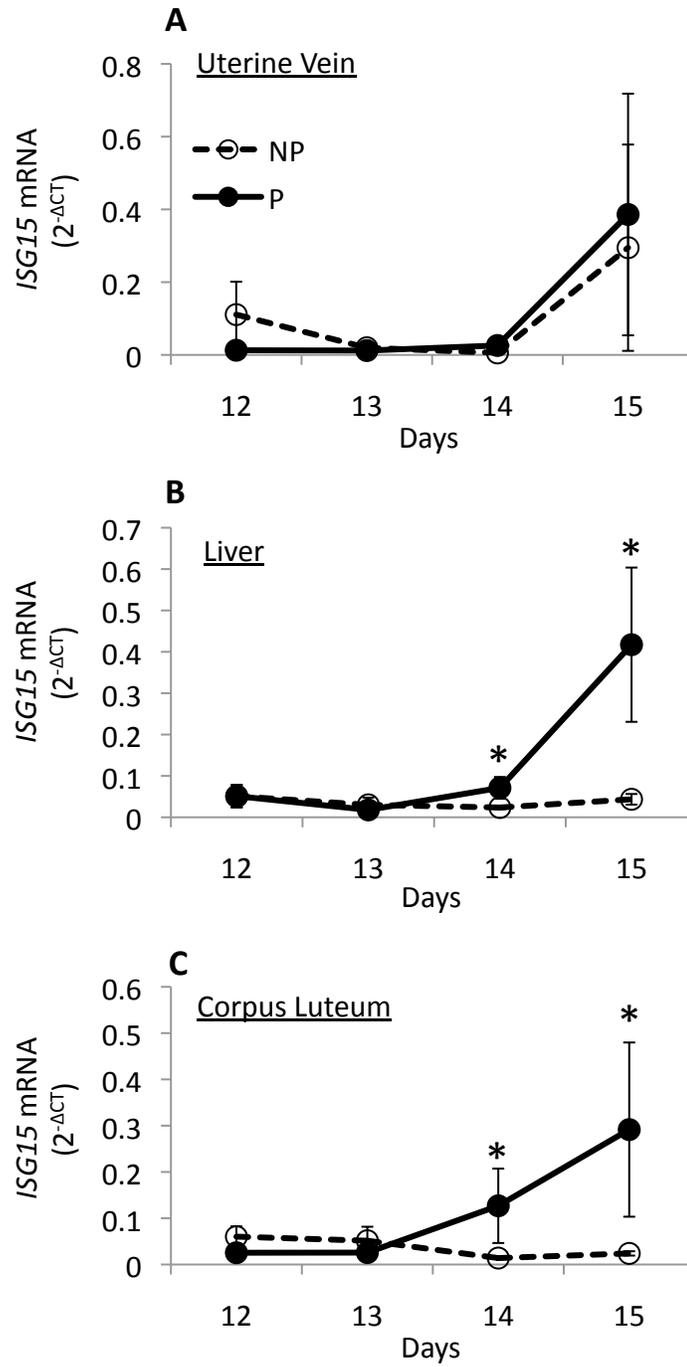
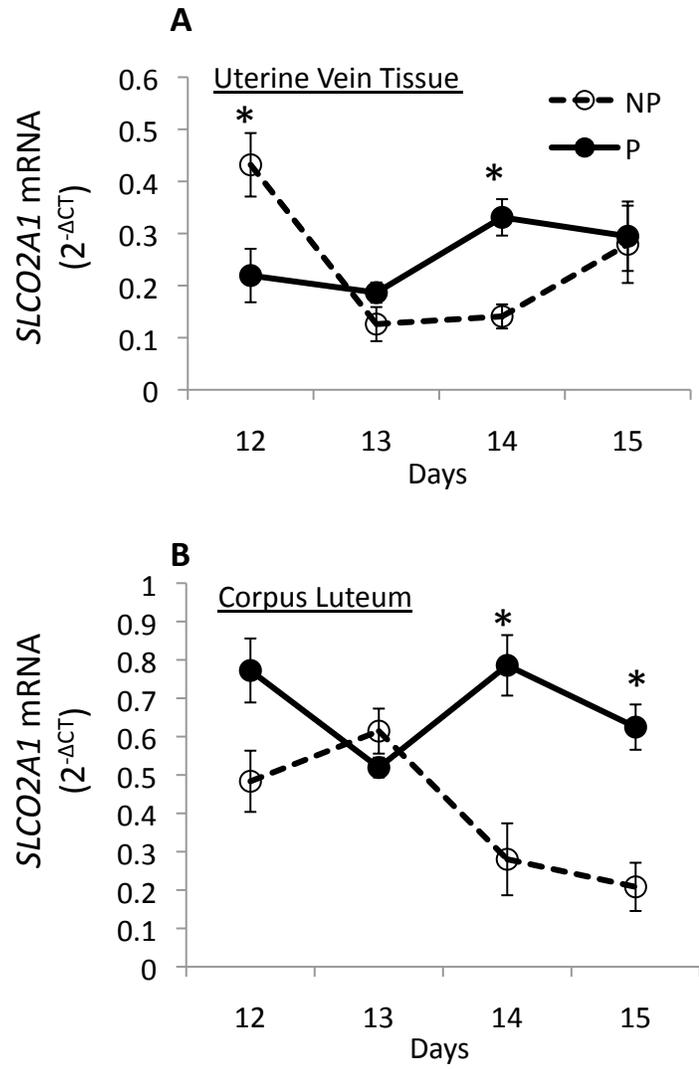


FIGURE 4



6. CAPÍTULO 2

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:

**ENDOCRINE DELIVERY OF OVINE INTERFERON-TAU
INTO THE UTERINE VEIN HAS SYSTEMIC EFFECTS IN
EXTRA UTERINE TISSUES**

**Alfredo Q. Antoniazzi, Ryan L. Ashley, Luiz E. Henkes, Rebecca C. Bott,
Natalia P. Smirnova, Brett T. Webb, Jason E. Bruemmer, Gordon D.
Niswender, João F. C. Oliveira, Fuller W. Bazer, Thomas R. Hansen.**

Biology of Reproduction, 2010

FIGURE 1

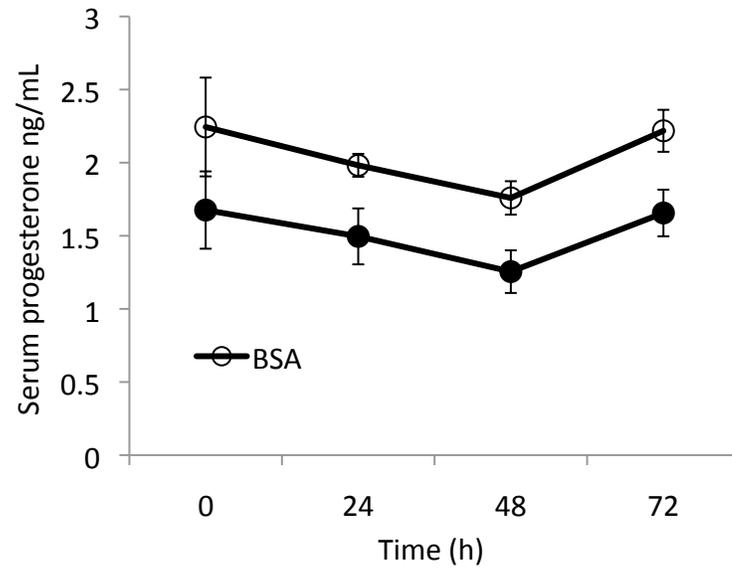


FIGURE 2

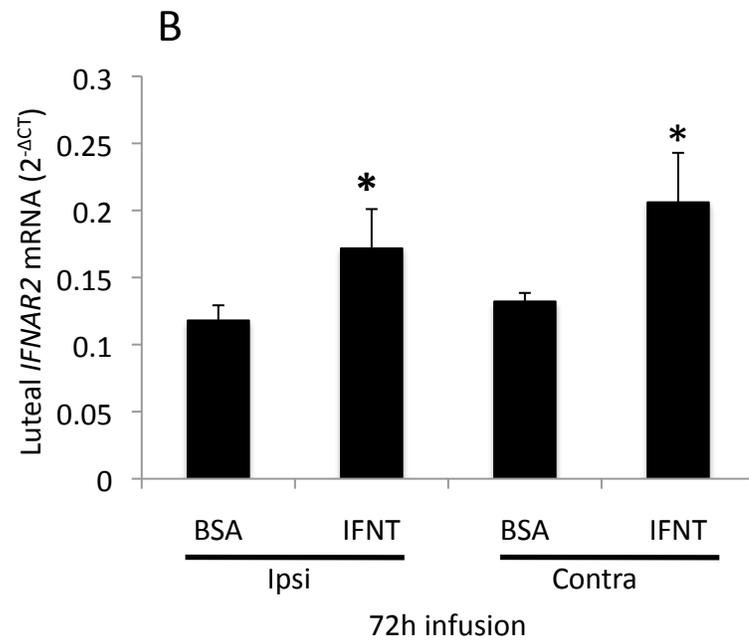
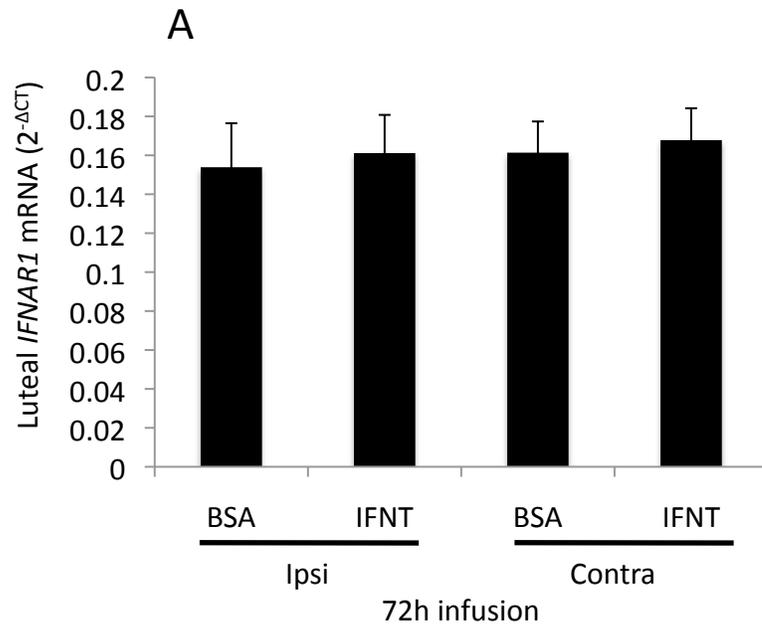


FIGURE 3

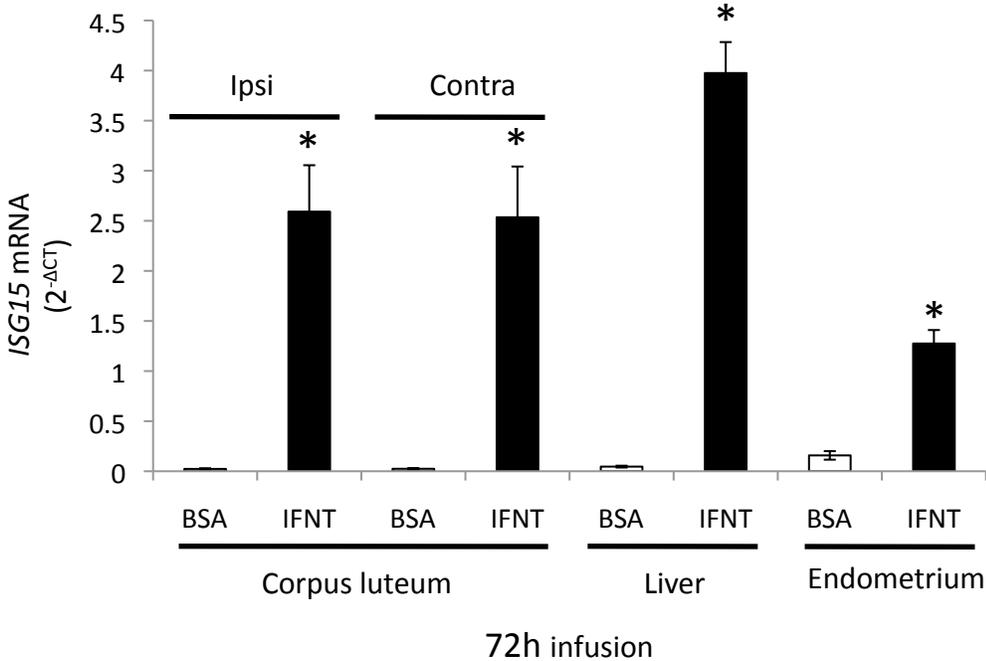


FIGURE 4

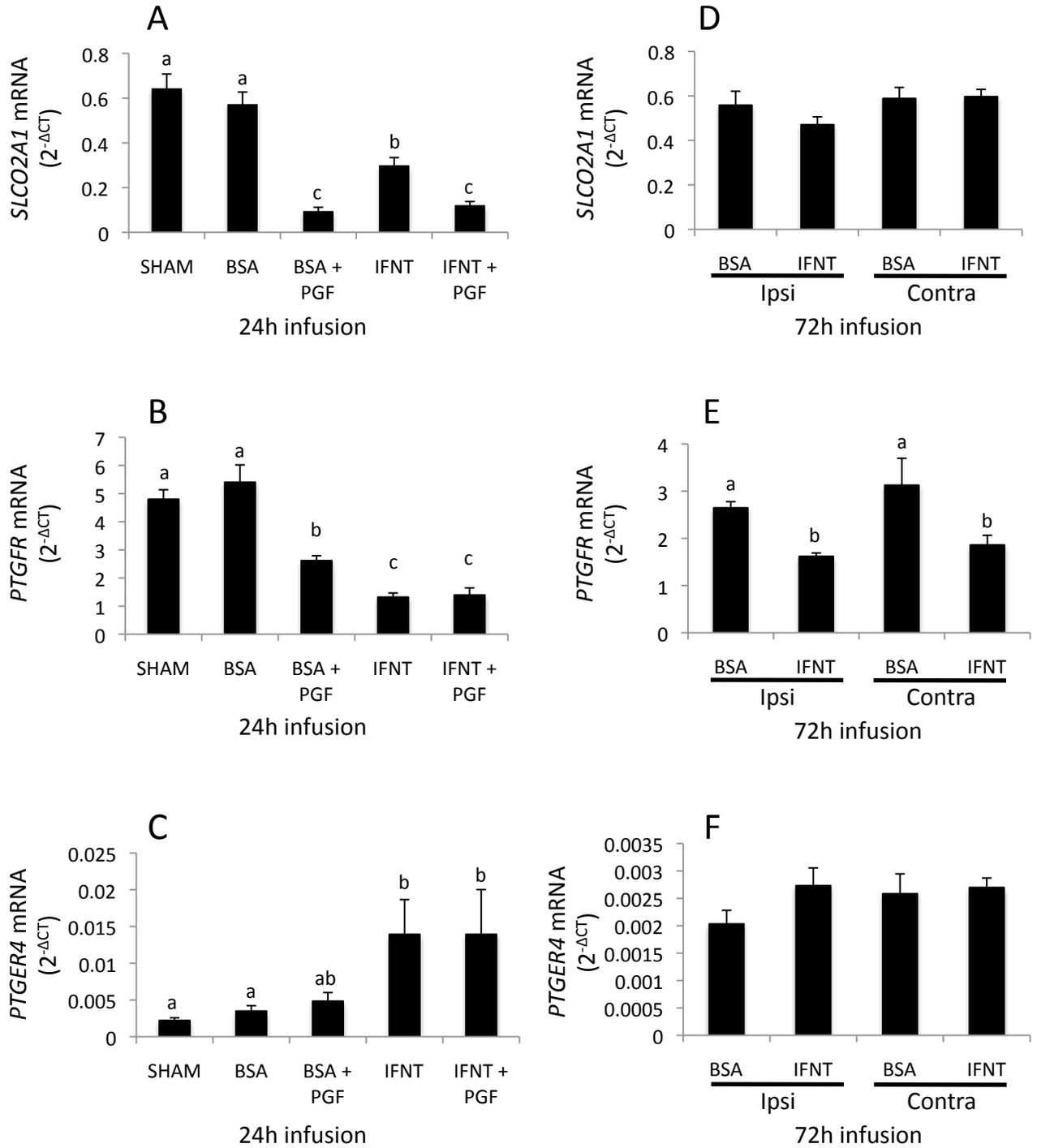


FIGURE 5

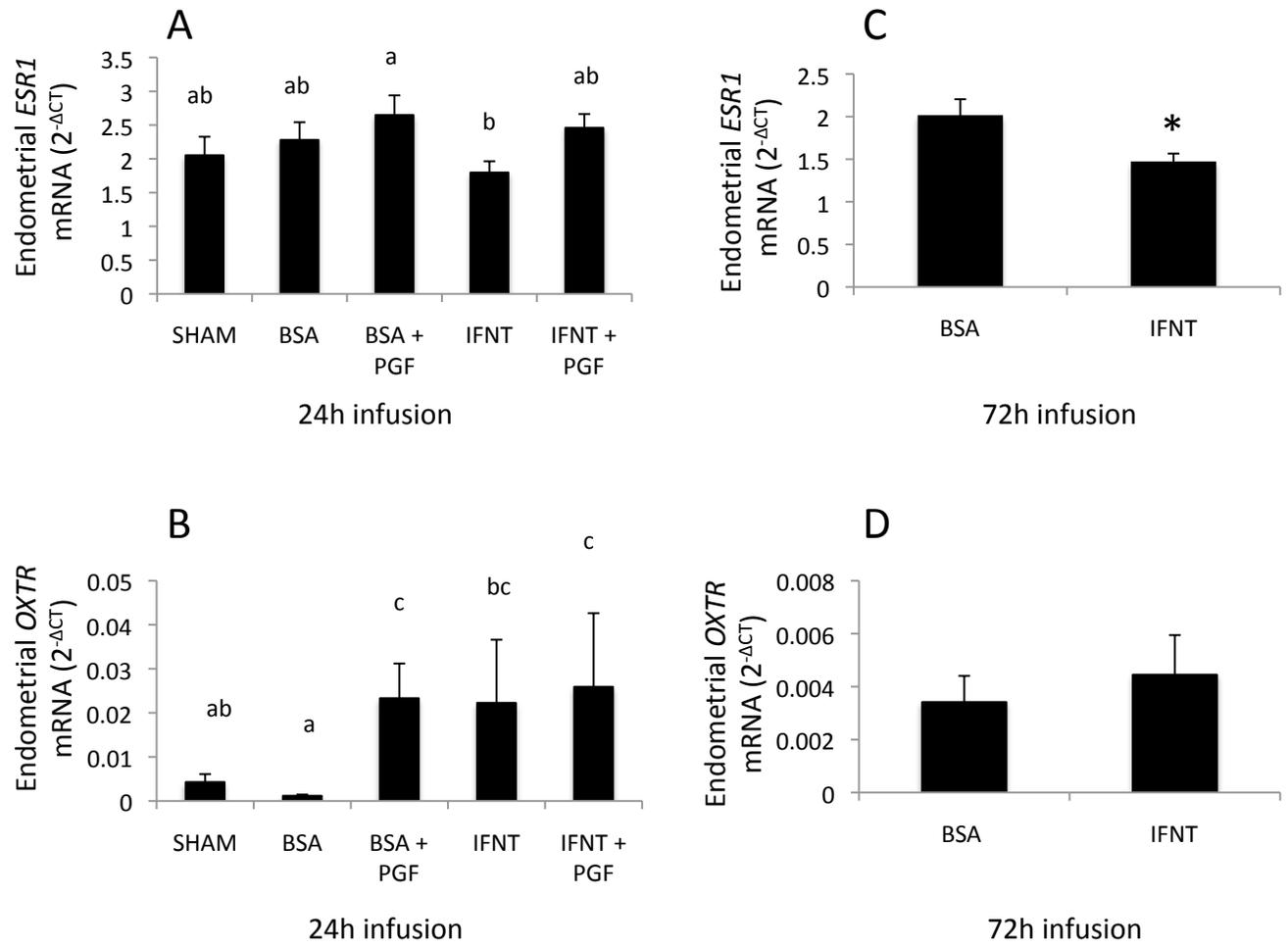
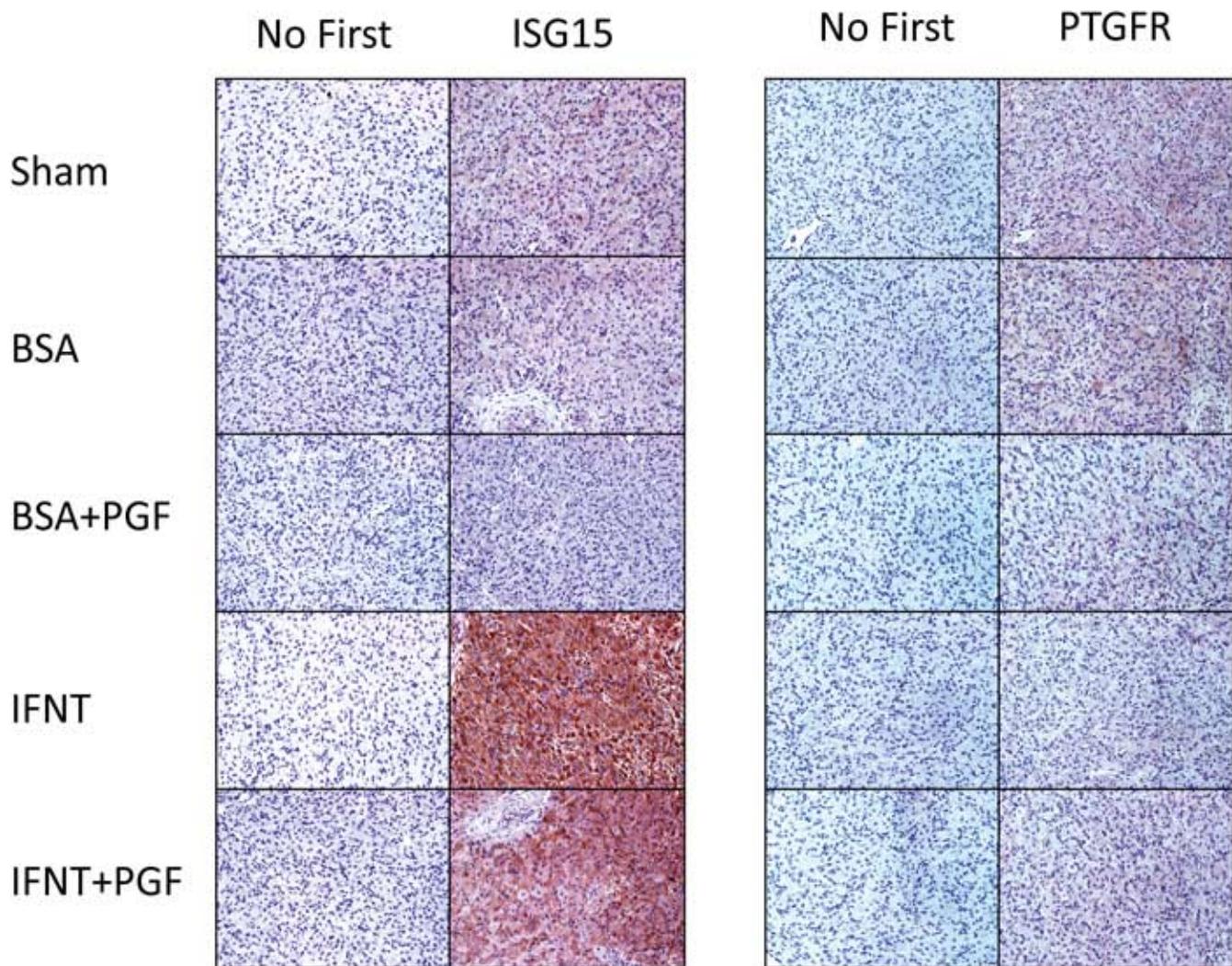


FIGURE 6



7. DISCUSSÃO

A avaliação da concentração de progesterona associados a respostas endometriais (parácrina) e tecidos extra uterinos (endócrina) no início da prenhez em ovelhas, são apresentadas pela primeira vez em conjunto. Foi avaliada a expressão do gene ISG15 nos dias 12, 13, 14 e 15 do ciclo estral ou gestação, no endométrio, corpo lúteo, fígado, veia uterina e sangue. Neste mesmo estudo, também foi avaliado a expressão dos genes ESR1 e OXTR, bem como genes envolvidos em mecanismos anti-luteolíticos e luteotróficos no corpo lúteo, que possivelmente estão regulados durante o período de reconhecimento materno da gestação em ovinos. Além deste desenho experimental, foi utilizado um modelo *in vivo* para avaliação da ação endócrina do IFNT. Foram utilizadas bombas osmóticas instaladas no dia 10 do ciclo estral, para infundir IFNT recombinante ovino na veia uterina durante o período de 24 ou 72 horas. Nesses experimentos foram avaliados os genes analisados previamente durante o ciclo estral e início da gestação caracterizando um perfil da função parácrina e endócrina do IFNT no início da gestação.

A progesterona age no endométrio como fator de diferenciação (Cummings e Yochim, 1984), estimula secreções glandulares e altera o padrão de secreção de proteínas endometriais. Essas proteínas são responsáveis pelo desenvolvimento inicial do embrião (para revisão ver (Niswender *et al.*, 2000)). Neste estudo demonstramos que, primeiramente, a concentração de progesterona diminui em ovelhas não prenhes nos dias 14-15 com níveis menores que 1ng/ml. Quando utilizamos os modelos de infusão de INFT recombinante ovino *in vivo* por 72 horas, os níveis de progesterona são similares, tanto no grupo controle quanto no grupo IFNT. Esperávamos que os níveis de progesterona fossem mantidos com a infusão de IFNT e diminuídos no grupo controle. Provavelmente a instalação das bombas no dia 10 do ciclo seja muito cedo para contar com PGF endógena para causar luteólise. Logo, ao traçarmos um paralelo entre os experimentos (ciclo estral e início da gestação vs. infusão), observamos que o declínio de progesterona não acontece até o dia 13 e 14 nos animais cíclicos. Portanto, para testar a hipótese de proteção luteal com infusão de IFNT por 72 horas e PGF endógena, a instalação das bombas de infusão deve ser entre os dias 11 e 12 do ciclo.

O ISG15 apresenta grande expressão endometrial no dia 18 da gestação em bovinos (Austin *et al.*, 2004). Níveis de RNAm para ISG15 foram descritos em ovinos entre os dias 11 a 120. No endométrio de ovinos, foi avaliado ISG15 inicialmente no dia 11 e logo após no dia 15 (Joyce *et al.*, 2005), não demonstrando o dia que ocorre o aumento na expressão. Nos

resultados do primeiro experimento, o momento do aparecimento de RNAm para ISG15 no endométrio, é no dia 13 da gestação. Estes dados seguem a produção e síntese de IFNT pelo conceito ovino, que inicia a secreção no dia 10 com pico entre os dias 14 e 16 da gestação (Farin *et al.*, 1990).

A expressão de ISGs durante o reconhecimento materno da gestação foram relatados em tecidos extra uterinos, dentre os quais, o corpo lúteo (Chen *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). Neste estudo foi avaliado a expressão de ISG15 na veia uterina, no fígado e no corpo lúteo, nos dias 12, 13, 14 e 15 do ciclo estral ou início da gestação em ovinos. Na veia uterina não foi observado nenhuma diferença. No fígado e corpo lúteo, ocorreu um aumento na expressão no dia 14 da gestação, um dia mais tarde que a expressão endometrial. Na infusão de IFNT, tanto por 24 (Bott *et al.*, 2009) quanto 72 horas, os níveis de expressão de ISG15 no corpo lúteo, fígado e endométrio apresentaram-se semelhantes em relação ao tempo de infusão. Quando comparamos os modelos de infusão com os dias do ciclo estral e início da prenhez, os níveis de expressão de ISG15 foram em torno de dez vezes maiores durante a infusão. Logo, a dose de IFNT recombinante ovino utilizado nas bombas pode ter sido mais alta que os níveis fisiológicos estimados. Porém, ainda não existem dados de valores fisiológicos de IFNT liberados na veia uterina.

Ainda, estudos demonstraram a expressão de ISGs no sangue, tais como Mx (Yankey *et al.*, 2001) e ISG15 (Han *et al.*, 2006) (Oliveira *et al.*, 2008). Níveis de ISG15 associados a concentração de progesterona foram avaliados no sangue dos dias 15 a 21 para prever vacas não prenhes. ISG15 sanguíneo foi capaz de prever 100% de vacas não-prenhes, confirmado por ultrassom 32 dias após inseminação artificial (Han *et al.*, 2006). O desenho experimental do ciclo estral e início da gestação caracteriza o perfil de expressão de ISG15 no sangue das veias jugular e uterina nos dias 12, 13, 14 e 15. Em ambas veias, a expressão de ISG15 apresentou-se aumentada apenas no dia 15 da gestação, com maiores valores na veia uterina. Neste sentido a expressão dos receptores de estrógeno alfa (ESR1) e ocitocina (OXTR) foram avaliadas durante o ciclo estral e início da gestação na ovelha. Os níveis de ESR1 estão elevados no dia 1, diminuem até o dia 11 e voltam a aumentar entre os dias 11 e 15 do ciclo estral. Enquanto que entre os dias 11 e 15 da gestação, o ESR1 diminui sua expressão endometrial (Spencer e Bazer, 1995). Em outro estudo foram avaliados ESR1 e OXTR endometriais no dia 15 do ciclo estral ou da gestação, e animais prenhes apresentam uma menor expressão (Spencer e Bazer, 1996). A ação do IFNT no reconhecimento da gestação em ovinos, ocorre pela supressão da expressão de ESR1 e OXTR, evitando pulsos luteolíticos de PGF (Spencer e Bazer, 1996). Os resultados do presente experimento mostram que o

aumento da expressão de ESR1 e OXTR acontece no dia 14 em animais cíclicos, ou seja, a supressão da expressão de ESR1 e OXTR em animais prenhes acontece um dia após do aparecimento de ISG15 endometrial em animais prenhes.

A partir da identificação de uma maior atividade antiviral no sangue da veia uterina de ovelhas prenhes no dia 15 (Oliveira *et al.*, 2008), nosso grupo tem utilizado bombas osmóticas para avaliar funções endócrinas do IFNT durante o reconhecimento materno da gestação em ovinos. Em outro experimento (Bott *et al.*, 2009), as amostras de sangue da veia uterina de animais prenhes no dia 15 foram tratadas com anticorpo anti IFNT, e não apresentaram atividade antiviral. Logo, chega-se a conclusão que o responsável pela atividade antiviral na veia uterina de animais prenhes no dia 15 é o IFNT. Também foi demonstrado a extensão do ciclo (pseudo gestação), além do dia 32 com a infusão de IFNT recombinante ovino por 7 dias, a partir da instalação de bombas osmóticas no dia 10 do ciclo estral (Bott *et al.*, 2009).

Com a publicação da comunicação endócrina do IFNT (Oliveira *et al.*, 2008), o presente experimento verificou a ação do IFNT em genes relacionados com a luteólise no corpo lúteo. Os genes ESR1 e OXTR não apresentaram diferença no corpo lúteo durante o ciclo estral e início da prenhez. Logo, o mecanismo intraluteal anti-luteolítico durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes é diferente do endometrial com relação a supressão do ESR1 e OXTR. Também foram avaliados os receptores PTGFR e PTGERs, bem como seu transportador. Nenhuma diferença foi detectada no ciclo estral e início da gestação com relação aos receptores de prostaglandinas. No entanto, o transportador de prostaglandina apresenta maior expressão luteal em animais prenhes nos dias 12, 14 e 15 da prenhez, podendo estar envolvido com maior necessidade de transporte de PGs intraluteal. Quando utilizamos os modelos *in vivo*, observamos os mesmos resultados. Alguns genes apresentam diferentes padrões de expressão nas 24 e outros nas 72 horas de infusão. Porém, o único gene com resultados consistentes nos modelos de infusão foi o receptor PTGFR. Pela primeira vez foi demonstrado a supressão da expressão de PTGFR com infusão de IFNT recombinante ovino por 24 e 72 horas na veia uterina. No entanto, o padrão foi diferente do observado durante o ciclo estral e início da prenhez, onde não foram observadas diferenças em animais não prenhes e prenhes durante os dias 12, 13 14 e 15. Para isso, mais estudos são necessários para interpretar esses mecanismos.

8. CONCLUSÃO

O conceito ovino inicia a secreção de IFNT em torno do dia 10 da gestação que resulta no aumento da expressão de ISG15 endometrial no dia 13 da gestação. No dia 14 ocorre a supressão da expressão de ESR1 e OXTR endometrial em ovelhas prenhes. Estes resultados demonstram a ação parácrina do IFNT na expressão de ISG15, ESR1 e OXTR no endométrio. No entanto, o fígado e o corpo lúteo apresentaram um aumento na expressão de ISG15 a partir do dia 14, aumentando ainda mais no dia 15 da gestação. A resposta hepática e luteal mais tarde que a endometrial, demonstra claramente que a ação endócrina do IFNT inicia em torno do dia 14 da gestação. E por fim, no dia 15, os níveis de progesterona se mantêm nas ovelhas prenhes. Esses resultados demonstram temporalmente a seqüência de eventos relacionados ao reconhecimento materno da gestação em ovinos (expressão de ISG15 em resposta ao IFNT). Primeiramente ocorre aumento de ISG15 endometrial no dia 13 e em tecidos extra uterinos no dia 14, com posterior declínio na concentração de progesterona em ovelhas cíclicas no dia 15. Assim, o Interferon-tau possui ação endócrina no corpo lúteo entre os dias 13 e 14 da gestação. Esta ação endócrina no corpo lúteo pode proteger contra a luteólise por mecanismos complementares, independente da ação parácrina endometrial.

O controle da ação da PGF intraluteal durante o reconhecimento materno da gestação em ovinos pode ser controlado pela regulação do PTGFR e seu transportador, e não pela regulação da síntese de PGF. A diminuição da expressão de PTGFR nos modelos de infusão não foi confirmada pelo perfil de expressão durante o ciclo estral e início da gestação. Assim, mais estudos são necessários para confirmar a supressão de PTGFR pelo IFNT.

9. REFERÊNCIAS

ABRAMOVITZ, M. *et al.* Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. **J Biol Chem**, v. 269, n. 4, p. 2632-6. 1994.

AROSH, J. A. *et al.* Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2551-60. 2004.

_____. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5280-93. 2004.

AUSTIN, K. J. *et al.* Interferon-stimulated gene-15 (Isg15) expression is up-regulated in the mouse uterus in response to the implanting conceptus. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3107-13. 2003.

_____. Localization of ISG15 and conjugated proteins in bovine endometrium using immunohistochemistry and electron microscopy. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 967-75. 2004.

_____. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. **Biol Reprod**, v. 54, n. 3, p. 600-6. 1996.

BANU, S. K. *et al.* Molecular cloning and characterization of prostaglandin (PG) transporter in ovine endometrium: role for multiple cell signaling pathways in transport of PGF2alpha. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 219-31. 2008.

BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J Anim Sci**, v. 76, n. 7, p. 1903-21. 1998.

BEBINGTON, C. *et al.* Ubiquitin cross-reactive protein gene expression is increased in decidualized endometrial stromal cells at the initiation of pregnancy. **Mol Hum Reprod**, v. 5, n. 10, p. 966-72. 1999.

BINELLI, M. *et al.* Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. **Biol Reprod**, v. 64, n. 2, p. 654-65. 2001.

BISHOP, C. V.; STORMSHAK, F. Nongenomic action of progesterone inhibits oxytocin-induced phosphoinositide hydrolysis and prostaglandin F2alpha secretion in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 937-42. 2006.

BOGAN, R. L.; NISWENDER, G. D. Constitutive steroidogenesis in ovine large luteal cells may be mediated by tonically active protein kinase A. **Biol Reprod**, v. 77, n. 2, p. 209-16. 2007.

BOTT, R. C. *et al.* Uterine Vein Infusion of Interferon Tau (IFNT) Extends Luteal Life Span in Ewes. **Biol Reprod**. 2009.

CAFFREY, J. L. *et al.* The activity of ovine luteal cholesterol esterase during several experimental conditions. **Biol Reprod**, v. 21, n. 3, p. 601-8. 1979.

CHANNING, C. P. Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. **J Endocrinol**, v. 45, n. 2, p. 297-308. 1969a.

_____. Studies on tissue culture of equine ovarian cell types: pathways of steroidogenesis. **J Endocrinol**, v. 43, n. 3, p. 403-14. 1969b.

CHEN, Y. *et al.* Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. **Endocrinology**, v. 147, n. 5, p. 2127-37. 2006.

CUMMINGS, A. M.; YOCHIM, J. M. Differentiation of the uterus in preparation for gestation: a model for the action of progesterone. **J Theor Biol**, v. 106, n. 3, p. 353-74. 1984.

DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 7, p. 1949-1978. 2002.

DEMMERS, K. J. *et al.* Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 41-9. 2001.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Luteolysis following a single injection of prostaglandin F2alpha in sheep. **J Anim Sci**, v. 37, n. 4, p. 990-3. 1973.

EALY, A. D.; YANG, Q. E. Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. **Am J Reprod Immunol**, v. 61, n. 2, p. 95-106. 2009.

ELLINWOOD, W. E. *et al.* Maintenance of the corpus luteum of early pregnancy in the ewe. II. Prostaglandin secretion by the endometrium in vitro and in vivo. **Biol Reprod**, v. 21, n. 4, p. 845-56. 1979.

EZASHI, T. *et al.* Control of interferon-tau gene expression by Ets-2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 14, p. 7882-7. 1998.

FARIN, C. E. *et al.* Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biol Reprod**, v. 43, n. 2, p. 210-8. 1990.

_____. In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. **Mol Endocrinol**, v. 3, n. 7, p. 1099-107. 1989.

FITZ, T. A. *et al.* Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biol Reprod**, v. 27, n. 3, p. 703-11. 1982.

FLEET, I. R. *et al.* Unilateral control of ovarian oxytocin release and the facilitatory effects of insulin-like growth factor-I in sheep. **J Reprod Fertil**, v. 100, n. 2, p. 623-8. 1994.

FLINT, A. P.; SHELDRIK, E. L. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. **Nature**, v. 297, n. 5867, p. 587-8. 1982.

GIFFORD, C. A. *et al.* Regulation of Interferon-Stimulated Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Pregnant and Bred, Nonpregnant Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 274-280. 2007.

GINTHER, O. J. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **J Anim Sci**, v. 39, n. 3, p. 550-64. 1974.

GODKIN, J. D. *et al.* Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at day 13-21. **J Reprod Fertil**, v. 65, n. 1, p. 141-50. 1982.

_____. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. **Endocrinology**, v. 114, n. 1, p. 120-30. 1984.

GRAVES, P. E. *et al.* Cloning of a receptor for prostaglandin F2 alpha from the ovine corpus luteum. **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3430-6. 1995.

GRAY, C. A. *et al.* Ovine Uterine Gland Knock-Out Model: Effects of Gland Ablation on the Estrous Cycle. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 448-456. 2000.

_____. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, v. 124, n. 2, p. 289-300. 2002.

GUILLOMOT, M. *et al.* Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. **Biol Cell**, v. 68, n. 3, p. 205-11. 1990.

HAN, H. *et al.* Low Blood ISG15 mRNA and Progesterone Levels are Predictive of Non-Pregnant Dairy Cows. **Journal of Endocrinology**, v. accepted, n. for publication. 2006.

HANSEN, T. R. *et al.* Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 54, p. 329-39. 1999.

HARRISON, L. M. *et al.* Progesterone production, LH receptors, and oxytocin secretion by ovine luteal cell types on days 6, 10 and 15 of the oestrous cycle and day 25 of pregnancy. **J Reprod Fertil**, v. 79, n. 2, p. 539-48. 1987.

HAYASHI, K. *et al.* Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 70, n. 3-4, p. 339-49. 2003.

IMAKAWA, K. *et al.* Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. **Nature**, v. 330, n. 6146, p. 377-9. 1987.

JOHNSON, G. A. *et al.* Endometrial ISG17 mRNA and a related mRNA are induced by interferon-tau and localized to glandular epithelial and stromal cells from pregnant cows. **Endocrine**, v. 10, n. 3, p. 243-52. 1999.

_____. Effects of the Estrous Cycle, Pregnancy, and Interferon Tau on 2',5'-Oligoadenylate Synthetase Expression in the Ovine Uterus. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1392-1399. 2001.

JOYCE, M. M. *et al.* Interferon stimulated gene 15 conjugates to endometrial cytosolic proteins and is expressed at the uterine-placental interface throughout pregnancy in sheep. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 675-84. 2005.

KENNY, N. *et al.* Morphometric quantification of mitochondria in the two steroidogenic ovine luteal cell types. **Biol Reprod**, v. 40, n. 1, p. 191-6. 1989.

KERBLER, T. L. *et al.* Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 3, p. 703-14. 1997.

LEE, J. S.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms mediating the stimulation of ovine endometrial secretion of prostaglandin F₂ alpha in response to oxytocin: role of phospholipase A₂. **J Endocrinol**, v. 141, n. 3, p. 491-6. 1994.

LIN, D. *et al.* Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. **Science**, v. 267, n. 5205, p. 1828-31. 1995.

LOEB, K. R.; HAAS, A. L. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. **J Biol Chem**, v. 267, n. 11, p. 7806-13. 1992.

MAPLETOFT, R. J. *et al.* The ovarian artery as the final component of the local luteotropic pathway between a gravid uterine horn and ovary in ewes. **Biol Reprod**, v. 15, n. 3, p. 414-21. 1976.

MARTAL, J. *et al.* Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. **J Reprod Fertil.**, v. 56, n. 1, p. 63-73. 1979.

MCCRACKEN, J. A. *et al.* Factors affecting the secretion of steroids from the transplanted ovary in the sheep. **Recent Prog Horm Res**, v. 27, p. 537-82 passim. 1971.

_____. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiol Rev**, v. 79, n. 2, p. 263-323. 1999.

_____. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F₂-alpha. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 30, n. 4, p. 544-546. 1970.

_____. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation. **Animal Reproduction Science**, v. 7, n. 1, p. 31-55. 1984.

- MIRANDO, M. A. *et al.* Stimulation of 2',5'-oligoadenylate synthetase activity in sheep endometrium during pregnancy, by intrauterine infusion of ovine trophoblast protein-1, and by intramuscular administration of recombinant bovine interferon-alpha I1. **J Reprod Fertil**, v. 93, n. 2, p. 599-607. 1991.
- MOOR, R. M.; ROWSON, L. E. Local maintenance of the corpus luteum in sheep with embryos transferred to various isolated portions of the uterus. **J Reprod Fertil**, v. 12, n. 3, p. 539-50. 1966.
- NAIVAR, K. A. *et al.* Secretion of bovine uterine proteins in response to type I interferons. **Biol.Reprod.**, v. 52, n. 4, p. 848-854. 1995.
- NARUMIYA, S. *et al.* Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1193-226. 1999.
- NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333-339. 2002.
- NISWENDER, G. D. *et al.* Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol Rev**, v. 80, n. 1, p. 1-29. 2000.
- _____. Regulation of luteal function in domestic ruminants: new concepts. **Recent Prog Horm Res**, v. 41, p. 101-51. 1985.
- OLIVEIRA, J. F. *et al.* Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1252-9. 2008.
- OTT, T. L. *et al.* Effects of the Estrous Cycle and Early Pregnancy on Uterine Expression of Mx Protein in Sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 4, p. 784-794. 1998.
- PIERCE, K. L. *et al.* Cloning of a carboxyl-terminal isoform of the prostanoid FP receptor. **J Biol Chem**, v. 272, n. 2, p. 883-7. 1997.
- POWELL, W. S. *et al.* Prostaglandin F2alpha receptor in ovine corpora lutea. **Eur J Biochem**, v. 41, n. 1, p. 103-7. 1974.
- RICHARDS, J. S.; HEDIN, L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Annu Rev Physiol**, v. 50, p. 441-63. 1988.
- ROBERTS, R. M. A role for interferons in early pregnancy. **Bioessays**, v. 13, n. 3, p. 121-6. 1991.
- ROBERTS, R. M. *et al.* Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. **Semin Cell Dev Biol**, v. 19, n. 2, p. 170-7. 2008.
- _____. Unique features of the trophoblast interferons. **Pharmacol Ther**, v. 51, n. 3, p. 329-45. 1991.

_____. Interferons as hormones of pregnancy. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 3, p. 432-452. 1992.

_____. Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. **Reprod Suppl**, v. 61, p. 239-51. 2003.

_____. Interferon production by the preimplantation sheep embryo. **J Interferon Res.**, v. 9, n. 2, p. 175-187. 1989.

RODGERS, R. J. *et al.* Large luteal cells the source of luteal oxytocin in the sheep. **Endocrinology**, v. 113, n. 6, p. 2302-4. 1983.

ROSENFELD, C. S. *et al.* Expression of interferon receptor subunits, IFNAR1 and IFNAR2, in the ovine uterus. **Biol Reprod**, v. 67, n. 3, p. 847-53. 2002.

SAKAMOTO, K. *et al.* Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F2 alpha receptor. **J Biol Chem**, v. 269, n. 5, p. 3881-6. 1994.

SCHMITT, R. A. *et al.* Uterine cellular changes in 2',5'-oligoadenylate synthetase during the bovine estrous cycle and early pregnancy. **Biol Reprod**, v. 48, n. 3, p. 460-6. 1993.

SCHUSTER, V. L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. **Annu Rev Physiol**, v. 60, p. 221-42. 1998.

SCHWALL, R. H. *et al.* Differential regulation by LH and prostaglandins of steroidogenesis in small and large luteal cells of the ewe. **J Reprod Fertil**, v. 76, n. 2, p. 821-9. 1986.

SHIRASUNA, K. *et al.* Positive Association, in Local Release, of Luteal Oxytocin with Endothelin 1 and Prostaglandin F2alpha During Spontaneous Luteolysis in the Cow: A Possible Intermediary Role for Luteolytic Cascade Within the Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 6, p. 965-970. 2007.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1527-1543. 1995.

_____. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 1144-7. 1996.

SPENCER, T. E. *et al.* Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. **Endocrinology**, v. 136, n. 11, p. 4932-44. 1995.

_____. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v. 128, n. 6, p. 657-68. 2004.

SUGIMOTO, Y. *et al.* Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin F receptor. **J Biol Chem**, v. 269, n. 2, p. 1356-60. 1994.

WATHES, D. C.; LAMMING, G. E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 49, p. 53-67. 1995.

WUTTKE, W. *et al.* Regulation of steroid production and its function within the corpus luteum. **Steroids**, v. 63, n. 5-6, p. 299-305. 1998.

YANKEY, S. J. *et al.* Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. **J Endocrinol**, v. 170, n. 2, p. R7-11. 2001.

ZARCO, L. *et al.* Modification of prostaglandin F-2 alpha synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. **J Reprod Fertil**, v. 83, n. 2, p. 527-36. 1988.

_____. Release of prostaglandin F-2 alpha and the timing of events associated with luteolysis in ewes with oestrous cycles of different lengths. **J Reprod Fertil**, v. 83, n. 2, p. 517-26. 1988.

