

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

**Karine de Vargas Aires**

**AÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO DURANTE O  
RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM OVELHAS  
APÓS BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO INDUZIDO**

Santa Maria, RS

2021

**Karine de Vargas Aires**

**AÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO DURANTE O RECONHECIMENTO  
MATERNO DA GESTAÇÃO EM OVELHAS APÓS BALANÇO ENERGÉTICO  
NEGATIVO INDUZIDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestra em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Quites Antoniazzi

Santa Maria, RS  
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Aires, Karine de Vargas

Ação da via de sinalização Hippo durante o reconhecimento materno da gestação em ovelhas após balanço energético negativo induzido / Karine de Vargas Aires.- 2021.

74 f.; 30 cm

Orientador: Alfredo Quites Antoniazzi

Coorientador: Paulo Bayard Dias Gonçalves

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Balanço energético negativo 2. Gestação inicial 3. Ovelhas 4. Reconhecimento materno da gestação 5. Via de sinalização Hippo I. Quites Antoniazzi, Alfredo II. Dias Gonçalves, Paulo Bayard III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, KARINE DE VARGAS AIRES, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Karine de Vargas Aires**


**AÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO DURANTE O RECONHECIMENTO  
MATERNO DA GESTAÇÃO EM OVELHAS APÓS BALANÇO ENERGÉTICO  
NEGATIVO INDUZIDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestra em Medicina Veterinária**.

**Aprovada em 25 de fevereiro de 2021:**

  
\_\_\_\_\_  
**Alfredo Quiles Antoniazzi, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/ Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Juliano Coelho da Silveira, PhD. (USP)**

  
\_\_\_\_\_  
**Marcos Henrique Barreta, Dr. (UFSC)**

Santa Maria  
2021

## AGRADECIMENTOS

À minha família.

À Universidade Federal de Santa Maria.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq, FAPERGS, FAPESP e Finep, por proporcionarem condições de trabalho e a realização dos experimentos. Agradeço especialmente a CAPES, pela bolsa de estudos.

Aos meus professores, especialmente meu orientador Alfredo Quites Antoniazzi e aos professores Valério Marques Portela e Gustavo Zamberlam, pela orientação, conhecimentos e ensinamentos compartilhados durante o período de mestrado.

À colega de mestrado e amiga Ana Paula da Silva, por toda a ajuda e companheirismo para que esse trabalho pudesse ser realizado. Muito obrigada!

Aos colegas de pós-graduação, Carolina, Daniele, Elisabeth, Igor, Júlia, Lady, Leonardo, Manuela, Mariani, Ricardo e Zigomar. Agradeço pelo convívio, conhecimento compartilhado, ajuda nos experimentos e por todos os momentos vividos durante esses dois anos.

A todos os estagiários e ICs pela ajuda, responsabilidade e dedicação.

À secretária do PPGMV, Maria pela paciência e comprometimento.

*"A ciência é o grande antídoto contra o veneno do entusiasmo e da superstição".*

*Adam Smith*

## RESUMO

### AÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO DURANTE O RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM OVELHAS APÓS BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO INDUZIDO

AUTORA: Karine de Vargas Aires  
ORIENTADOR: Alfredo Quites Antoniazzi

O período inicial da gestação é bastante crítico para a ocorrência de perdas embrionárias precoces e falhas na comunicação materno-fetal, e muitas vezes ocorre sob balanço energético negativo (BEN), que pode influenciar negativamente durante este período. A via de sinalização Hippo é altamente conservada entre as espécies, especialmente durante a embriogênese e faz parte do controle embrionário do Interferon tau (IFNT). Nosso estudo utilizou um modelo de BEN induzido durante o início da gestação em ovelhas para avaliar os efeitos na via de sinalização Hippo. Para isso, 21 ovelhas foram alocadas em quatro grupos: Controle não gestante (NP); controle gestante (P); BEN durante a primeira semana de gestação (FW); e BEN durante a segunda semana de gestação (SW). Os animais NP apresentaram maior mRNA para *BIRC5* e *CYR61* no corpo lúteo (CL) ( $P < 0,05$ ). A expressão de *CYR61* foi diferente entre os grupos FW e SW no CL ( $P < 0,05$ ). O grupo SW apresentou maior concentração de progesterona ( $P < 0,05$ ) que os demais grupos experimentais. Nossos resultados sugerem que o BEN não altera a sinalização embrionária inicial. O estresse metabólico tem uma grande influência na concentração circulante de progesterona. Além disso, a via de sinalização Hippo parece ser inativa no endométrio durante a gestação inicial, devido à grande proliferação endometrial no Dia 17. No entanto, no CL a via de sinalização Hippo é inativa durante o ciclo estral, provavelmente devido à apoptose. No entanto, nos animais gestantes, a via de sinalização Hippo é ativa no CL, o que sugere que a síntese de progesterona pode ser independente da via de sinalização Hippo.

**Palavras-chave:** BEN. Gestação inicial. Ovelhas. Reconhecimento materno. Via de sinalização Hippo.

## ABSTRACT

### **ACTION OF THE HIPPO SIGNALING PATHWAY DURING THE MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY IN EWES AFTER INDUCED NEGATIVE ENERGY BALANCE**

AUTHOR: Karine de Vargas Aires  
ADVISOR: Alfredo Quitas Antoniazzi

The initial period of pregnancy is very critical for the occurrence of early embryonic losses and failures in maternal-fetal communication and often occurs under a negative energy balance (NEB), which can affect negatively during this period. The Hippo signaling pathway is highly conserved between species, especially during embryogenesis, and is part of the embryonic control of Interferon tau (IFNT). Our study uses a NEB model induced during early pregnancy in ewes to evaluate the effects on the Hippo signaling pathway. For this, 21 ewes were allocated to four groups: Non-pregnant control (PN); pregnant control (P); NEB during the first week of pregnancy (FW); and NEB during the second week of pregnancy (SW). The group NP was greater mRNA for *BIRC5* and *CYR61* in the corpus luteum (CL) ( $P < 0.05$ ). The expression of *CYR61* was different between the FW and SW groups in the CL ( $P < 0.05$ ). The SW group had a greater concentration of progesterone ( $P < 0.05$ ) than other experimental groups. Our results obtained that NEB does not alter the initial embryonic signaling. Metabolic stress has a major influence on the circulating concentration of progesterone. Also, the Hippo signaling pathway appears to be inactive in the endometrium during early pregnancy, due to the large endometrial proliferation on Day 17. However, in CL the Hippo signaling pathway is inactive during the estrous cycle, probably due to apoptosis. However, in pregnant animals, the Hippo signaling pathway is active in the CL, which means that progesterone tuning can be independent of the Hippo signaling pathway.

**Keywords:** Early pregnancy. Ewes. Hippo pathway. Maternal recognition. NEB.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### DISSERTAÇÃO

- Figura 1 - Desenvolvimento embrionário inicial em ruminantes.....16
- Figura 2 - Mecanismo de ação clássico do IFNT e efeito antiluteolítico..... 18
- Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização Hippo-YAP/TAZ.....21

### ARTIGO

- Figure 1 - Relative mRNA expression of Interferon-stimulated gene (*ISG15*) on ovine luteal and endometrium from ipsi- and contralateral horn to corpus luteum and corpus luteum. ....62
- Figure 2 - Relative mRNA expression of genes associated with Hippo pathway on ovine endometrium.....62
- Figure 3 - Relative mRNA expression of genes associated with Hippo pathway.....63
- Figure 4 - Relative mRNA expression for *3βHSD* in the ewes luteal cells..... 64
- Figure 5 - Progesterone concentration (ng/mL) on blood serum on Day 16.....64
- Figure 6 - Localization of Total YAP and Phospho-YAP (Ser127) and TAZ in luteal cells.....65

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

Table 1 - Primers for quantitative real-time PCR analysis. ....	59
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO.....	15
2.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO.....	19
2.3 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO EM RUMINANTES.....	25
<b>3 ARTIGO</b> .....	29
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de estabelecimento da gestação em ruminantes domésticos necessita de três estágios distintos: sinalização e reconhecimento materno da gestação, implantação e placentação (GUILLOMOT, 1995; HANSEN, Thomas R.; SINEDINO; SPENCER, Thomas E., 2017; SPENCER, Thomas E. et al., 2007). As perdas embrionárias precoces influenciam os índices reprodutivos em ruminantes e estima-se que 20% a 50% das perdas gestacionais ocorrem entre a primeira semana de gestação, que correspondem ao intervalo entre os dias 8 e 27, período que coincide com o reconhecimento materno da gestação (WILTBANK et al., 2016). O Interferon-tau (IFNT) é uma citocina secretada pelas células do trofoblasto embrionário que age de maneira parácrina no útero e diminui a expressão dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio, impedindo a ação luteolítica da PGF (ROBERTS, R. M. et al., 2003). Além disso, o IFNT estimula a expressão de ISGs no endométrio, corpo lúteo e células sanguíneas (OLIVEIRA, João F. et al., 2008).

Vários reguladores transcricionais e fatores coativadores controlam a transcrição do IFNT durante o início da gestação. Fatores derivados do útero estimulam a produção de IFNT, e várias vias de sinalização estão funcionalmente ligadas à expressão de IFNT (EALY, Alan D.; YANG, Q. E., 2009). A via de sinalização Hippo parece estar envolvida no processo de controle do IFNT. Estudos sugerem que a realocação de TEAD e / ou degradação de YAP após sua fosforilação desregula a transcrição do gene IFNT após implantação do conceito no endométrio (KUSAMA et al., 2016).

A via de sinalização Hippo tem funções na determinação do tamanho de órgãos, participando dos mecanismos de diferenciação, proliferação e apoptose de células de diversos tecidos, sobretudo durante a embriogênese. No contexto da fisiopatologia da reprodução, na vida adulta, existe um aumento crescente no número de evidências ligando a via Hippo tanto à fisiologia ovariana quanto a processos patológicos como o cisto folicular ovariano ou mesmo câncer ovariano. (GUAN, F.-X. Y. And K.-L., 2013; MENG; MOROISHI; GUAN, K. L., 2016). O principal efetor da via, *Yes-Associated protein 1* (YAP 1), é expresso nas células da granulosa e desempenha um papel crítico no desenvolvimento folicular (LV et al., 2019). Os coativadores de transcrição desempenham papéis importantes na proliferação das células da granulosa e na síntese de estradiol, demonstrando que a proteína YAP e o *transcriptional co-activator with PDZ-binding motif* (TAZ) estão presentes no ovário e sua localização depende da densidade celular. Por meio do uso de imunohistoquímica, verificou-se que o YAP está amplamente localizado nas células da granulosa e da teca dos folículos em desenvolvimento,

além do corpo lúteo (PLEWES et al., 2019). Estudos confirmaram que membros da via Hippo são expressos no endométrio e que seus padrões de expressão mudam ao longo do ciclo menstrual, sugerindo que a via Hippo está envolvida na regulação da fisiologia endometrial em mulheres (STRAKOVA et al., 2010).

YAP é um potente estimulador do crescimento e proliferação celular, processos que consomem energia. A regulação da via Hippo por AMPK sugere que o estado metabólico pode funcionar como um ponto de verificação para a atividade de promoção do crescimento por YAP. Em condições de privação de nutrientes ou baixa energia, a atividade de YAP precisa ser restringida para evitar o esgotamento de energia causado por processos anabólicos (YU; ZHAO, B.; GUAN, K. L., 2015). Descobertas recentes revelaram que a via do Hippo é regulada por metabólitos celulares e vias metabólicas, incluindo glicose, ácidos graxos livres, AMPK e mTOR. Evidências mostram que o metabolismo da glicose através da via da glicólise, aumenta a ligação de YAP/TEAD, ativando a transcrição dependente de YAP e, portanto, o crescimento celular. Todos esses achados suportam uma função anteriormente desconhecida da via Hippo na regulação do metabolismo (ARDESTANI; LUPSE; MAEDLER, 2018).

Antes do parto, durante o período de transição, ocorre balanço energético negativo (BEN), sendo a principal causa de hipercetonemia em ovelhas (LACETERA et al., 2001; SAUN, VAN, 2000). A toxemia da gestação (cetose clínica) ocorre frequentemente entre as últimas três a seis semanas de gestação (SAUN, VAN, 2000; SCHLUMBOHM, Christina; HARMEYER, 2008), enquanto a cetose subclínica ocorre frequentemente nas primeiras duas semanas após o parto até seis semanas após o parto (FEIJÓ et al., 2015) com prevalência de 18% (PANOUSIS et al., 2012). Durante o BEN ocorrem alterações na regulação endócrina que levam à ampla mobilização de tecido corporal, especialmente tecido adiposo, para suprir as necessidades nutricionais, manutenção da gestação e produção de leite (DRACKLEY, 1999).

A hipercetonemia ocorre devido à falha dos mecanismos adaptativos ao BEN (HERDT, 2000). O BEN diminui a concentração de oxaloacetato e seus precursores, desencadeando hipercetonemia. Consequentemente, a oxidação de grandes quantidades de Acetil-CoA do metabolismo dos ácidos graxos não esterificados (NEFA) via ciclo tricarboxílico torna-se limitada redirecionando este composto para cetogênese (BERGMAN, 1971; CALDEIRA, 2005). O padrão para diagnosticar BEN e cetose é avaliar a concentração de ácido  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) porque é mais estável no sangue do que outros corpos cetônicos, como acetona ou acetoacetato (TYÖPPÖNEN; KAUPPINEN, 1980).

O BEN diminui a fertilidade em ruminantes e o efeito da cetose subclínica foi associado a menores taxas de prenhez em vacas leiteiras (CAIXETA et al., 2017; OSPINA et al., 2010;

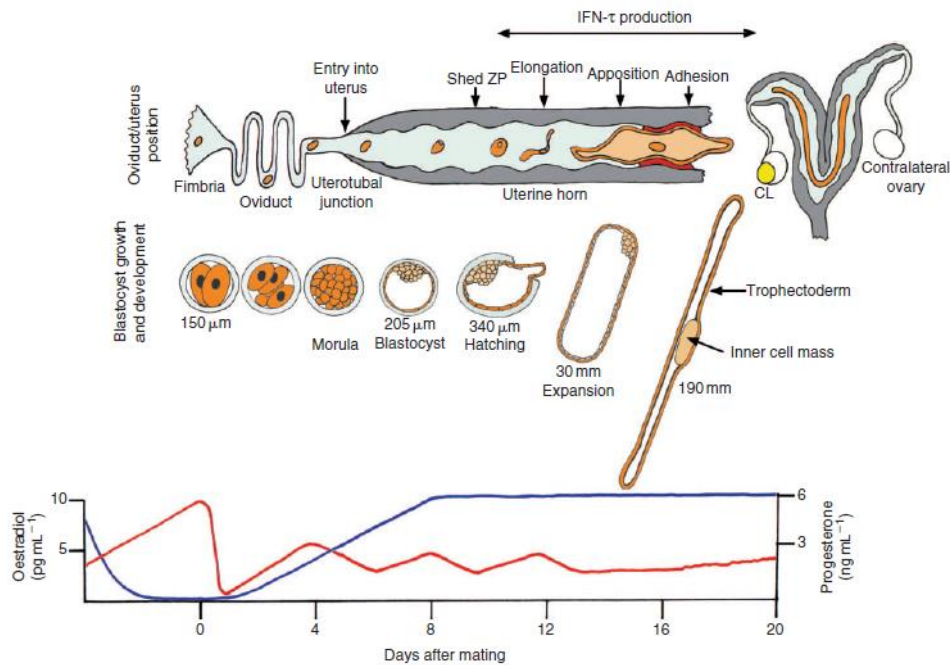
SANTOS, J. E. et al., 2010; WALSH, R. B. et al., 2007) e menores taxas na primeira inseminação artificial (RIBEIRO et al., 2013; WALSH, R. B. et al., 2007). A desnutrição diminui o número de folículos emergentes e o número de folículos capazes de ovular em ovelhas (ABECIA, J. A. et al., 2006). A qualidade do oócito é drasticamente reduzida após a exposição aos NEFA durante a maturação final, diminuindo a qualidade do embrião (DESMET et al., 2016; HOECK, V. VAN et al., 2013; HOECK, Veerle VAN et al., 2011). Um estudo sugeriu um efeito da nutrição materna na secreção de IFNT, onde embriões coletados no dia 15 de gestação de ovelhas magras apresentaram redução da atividade antiviral (ABECIA, J. A. A.; FORCADA, F.; LOZANO, 1999). Consequentemente, nosso estudo levanta a hipótese de que o balanço energético negativo influencia a comunicação materno-embriônica, impactando negativamente no reconhecimento materno da gestação e a via de sinalização Hippo pode estar associada a este processo. Nosso estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do balanço energético negativo, induzido na primeira ou segunda semana de desenvolvimento embrionário, na expressão de componentes e genes alvo, relacionados a via de sinalização do Hippo no endométrio e corpo lúteo de ovelhas no dia 17 de gestação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

O reconhecimento materno da gestação é o período em que o concepto possui capacidade de sinalizar sua presença para a fêmea. Em ruminantes, esse período coincide com o alongamento do embrião e a máxima produção de Interferon tau (IFNT) (Figura 1) (ANTONIAZZI, et al., 2011). Estudos de (ROWSON; MOOR, 1967), demonstraram as primeiras evidências de que o concepto tinha capacidade de produzir substâncias antiluteolíticas, e assim, prolongar a vida útil do corpo lúteo a ação da PGF em ovelhas quando localizado no corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo (MOOR; ROWSON, 1966). Anos mais tarde, o fator proteico antiluteolítico foi denominado trofoblastina (MARTAL et al., 1979), já na década de 1980, foi purificada uma proteína secretada pelo concepto ovino com características de uma anti-luteolisina. Essa proteína, foi inicialmente denominada proteína X (GODKIN et al., 1984) e posteriormente de trofoblastina ovina (oTP-1), sendo secretada em maior abundância entre os dias 10 e 12 da gestação (GODKIN; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M., 1984). Posteriormente, esta proteína teve sua função anti-luteolítica comprovada e foi associada ao reconhecimento materno da gestação. IMAKAWA et al. (1987) realizaram o sequenciamento, e então, esta proteína foi renomeada para IFNT devido a sua semelhança estrutural com os interferons tipo I (ROBERTS, et al., 1989; ROBERTS; CROSS; LEAMAN, 1992). O concepto bovino secreta IFNT entre os dias 12 e 21, com pico entre os dias 15 e 16 (ANTONIAZZI, et al., 2011). O IFNT inibe a transcrição dos receptores de estrógeno - ESR1 e ocitocina – OXTR no endométrio, consequentemente evitando a luteólise (SPENCER, Thomas E.; BAZER, Fuller W., 1996).

Figura 1 - Desenvolvimento embrionário inicial em ruminantes.



Fonte: (SPENCER, Thomas E. et al., 2007)

### 2.1.1 O gene do IFNT

O gene do IFNT expresso pelo concepto dos ruminantes possui uma homologia de aproximadamente 70% com o interferon- $\omega$  de humanos (ROBERTS, R. M. et al., 2003). O gene apresenta uma única matriz de leitura de 595 pares de bases, que codifica uma sequência primária (pré-proteína) de 195 aminoácidos, com uma região sinalizadora de 23 aminoácidos, que é clivada para formar a proteína de 172 aminoácidos (ROBERTS, R. M. et al., 2003). O início da expressão do gene do IFNT parece ser programado geneticamente independente do ambiente uterino, sendo expresso em sistemas *in vivo* e *in vitro*. No entanto, a produção de IFNT é influenciada pelo ambiente uterino, pois há um aumento na produção de IFNT *in vitro* na presença de tecido uterino (KERBLER et al., 1997). A expressão termina com a implantação embrionária, pois o contato do trofoblasto com o endométrio cessa a produção de IFNT (DEMMERS; DERECKA; FLINT, 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, juntamente com outros co-ativadores e repressores (EALY, Alan D.; YANG, Q. E., 2009).

### **2.1.2 Receptores de Interferon tipo I e genes estimulados por interferons (ISGs)**

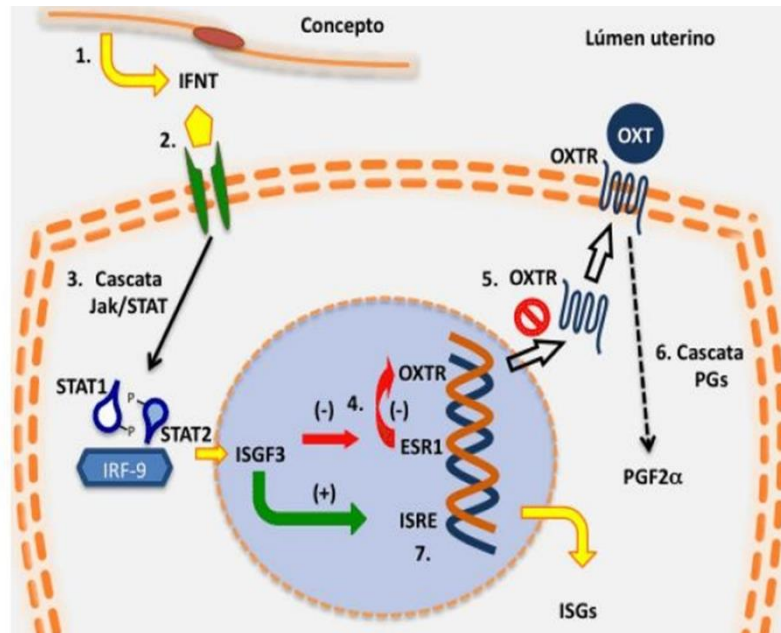
Os receptores de interferon tipo I (IFNAR1 e IFNAR2) são expressos em todos os tecidos corporais e tem como função principal mediar respostas antivirais. No útero ovino, esses receptores estão localizados para mediar respostas maternas em função do IFNT produzido pelo concepto (ROSENFELD, Cheryl S. et 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 tirosina-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, T. R. 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; (JOHNSON, Greg A. et al., 2001), o gene de resistência ao myxovirus 1 (MX1; (OTT, Troy L. et al., 1998) e o gene estimulado pelo interferon 15 (ISG15; (JOHNSON, Greg A. et al., 1999). Estudos recentes demonstraram a expressão de ISGs em células do sangue (GIFFORD et al., 2007) e corpo lúteo (BOTT, Rebecca C. et al., 2009; OLIVEIRA, João F. 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, Kathy J. et al., 1996). E também foi demonstrada estar aumentada no endométrio de camundongos (AUSTIN, Kathy J. et al., 2003) e humanos (BEBINGTON; DOHERTY; FLEMING, S. D., 1999) no início da gestação. O ISG15 é induzido por interferon tipo I e pode conjugar-se a outras proteínas (LOEB; HAAS, 1992).

### **2.1.3 Ações do IFNT**

Atualmente, sabe-se que o IFNT atua mediante 3 vias de sinalização: parácrina, endócrina e autócrina. Atua por via parácrina no útero, inibindo a expressão dos receptores de estrógenos (ESR1) e de ocitocina (OXTR) no epitélio luminal (Figura 2) (SPENCER, Thomas E.; BAZER, Fuller W., 1996). A supressão desses receptores evita a liberação de pulsos

luteolíticos de PGF (SPENCER, Thomas E.; BAZER, Fuller W., 1996), que é o hormônio responsável pelo início da luteólise (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 2009). Ainda pela via parácrina, em ovelhas, verificou-se que o IFNT estimula a expressão de vários genes (CST3, CST6, CTSL, GRP, HSD11B1, IGFBP1, LGALS15, SLC2A1, SLC2A5, SLC5A11, SLC7A2) no epitélio luminal endometrial e (ou) no epitélio glandular endometrial que possuem atividades biológicas potencialmente importantes para o alongamento e implantação do embrião (LONERGAN; FORDE; SPENCER, T. E., 2016).

Figura 11 - Mecanismo de ação clássico do IFNT e efeito antiluteolítico.



Fonte: (ANTONIAZZI, Alfredo Quités et al., 2011).

O IFNT também age pela via autócrina através de IFNAR1 (BROOKS; SPENCER, Thomas E., 2015; IMAKAWA, Kazuhiko et al., 2002), aumentando a proliferação das células do trofoblasto e aumentando a expressão de ISGs (BROOKS; SPENCER, Thomas E., 2015; WANG, X. L. et al., 2013). O primeiro indício de ação endócrina do IFNT foi descoberto por SCHALUE-FRANCIS et al., (1991) que detectaram atividade antiviral de IFN na veia uterina no dia 15 de gestação de ovelhas prenhes, mas não detectaram atividade antiviral na artéria ovariana ou veia jugular, indicando que o IFNT pode ser rapidamente removido da circulação sistêmica. Semelhantemente OLIVEIRA, J. F. et al., (2008) encontrou atividade antiviral

significativa no sangue da veia uterina de ovelhas prenhes no dia 15 de gestação. Atividade antiviral foi observada na veia uterina, mas não na artéria uterina, do dia 15 de gestação quando comparada com ovelhas cíclicas (BOTT, Rebecca C. et al., 2009). Apesar do embrião de 14–15 dias produzir 200 µg de IFNT por dia, foi determinado que a quantidade de IFNT no sangue da veia uterina era de apenas 5–10 ng/mL (ROMERO, Jared J. et al., 2015).

A expressão de ISG15 pode ser induzida em culturas de células luteais pequenas, grandes e mistas com apenas 100 pg / mL de IFNT em ovinos (ANTONIAZZI, et al., 2013) e bovinos (HANSEN; SINEDINO; SPENCER, 2017). Como a maioria das sensibilidades históricas do ensaio para o IFNT é de apenas 1 ng/mL, os ensaios falhariam em detectar o IFNT pois circula abaixo dessa concentração. Assim, a dificuldade em detectar o IFNT no soro periférico pode ser causada por níveis circulantes muito baixos de IFNT que estão abaixo dos limites de detecção usando as tecnologias atuais (HANSEN, Thomas R.; SINEDINO; SPENCER, Thomas E., 2017). Evidências indiretas e correlativas em ovinos e bovinos apoiam o conceito de que o IFNT é liberado pelo embrião, percorre o endométrio, entra no sangue das veias uterinas e é entregue em quantidades suficientes para induzir ISGs nos tecidos periféricos (HANSEN, Thomas R.; SINEDINO; SPENCER, Thomas E., 2017). A ação direta do IFNT em tecidos extrauterinos eleva a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) que, no corpo lúteo, estão envolvidos com a resistência luteal à ação luteolítica da PGF (ANTONIAZZI, A. Q. et al., 2013).

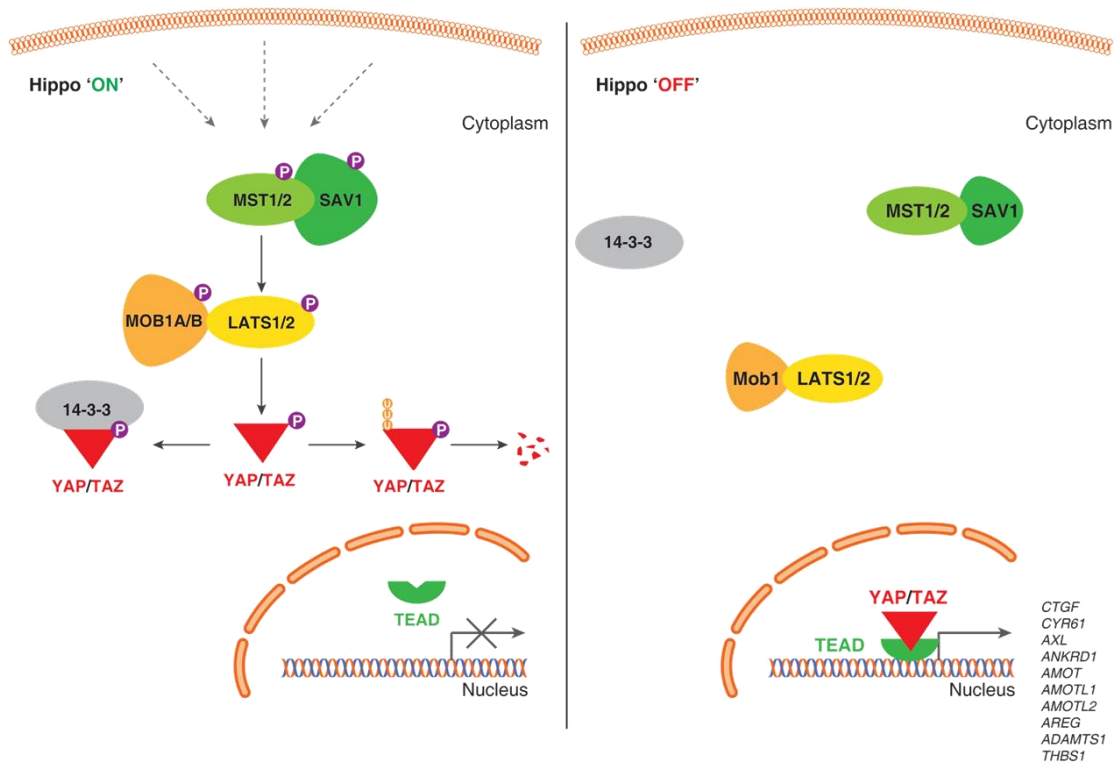
## 2.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO HIPPO

A via de sinalização Hippo e seus componentes foi demonstrada pela primeira vez em 1995, utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo para estudo de genes de supressão tumoral (JUSTICE et al., 1995). A função da via Hippo é regular o número de células controlando o equilíbrio entre a proliferação e a apoptose e, portanto, o tamanho dos órgãos. Estudos em modelos animais, demonstraram que a interrupção da sinalização da via leva ao crescimento celular excessivo e tumorigênese (DONG et al., 2007). A via Hippo vem sendo estudada em modelos roedores e humanos e estudos mostraram que o mau funcionamento da via está intimamente ligado a insuficiência ovariana primária e a síndrome do ovário policístico em mulheres, respectivamente (CHENG, Y. et al., 2015; LI, T. et al., 2012).

A via representa uma cascata de proteínas quinases que regulam a atividade de dois efetores proteicos, Yes-associated protein (YAP) e Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) que apresentam funções semelhantes. YAP e TAZ atuam como reguladores transcricionais de genes alvo da via Hippo, tornando-se responsáveis diretos pelas funções da via (Figura 3) (ZHAO, B. et al., 2010). Quando a via Hippo encontra-se inativada, ocorre um acúmulo dos efetores YAP e TAZ no núcleo, onde permanecem ligados em forma de complexos, associados a diversos fatores de transcrição, entre eles os fatores da família TEAD (transcriptional enhancer factor TEF-1, também conhecido como TEA domain family member; TEAD1, TEAD2, TEAD3 e TEAD4) para regular e expressão de diferentes genes (MAUVIEL; NALLET-STAU; VARELAS, 2012; ZHAO, B. et al., 2010).

Diferentes estímulos, de acordo com o tipo celular e contexto fisiopatológico, são responsáveis pela ativação da via Hippo. Essa ativação é caracterizada por uma cascata de fosforilações, que resulta na fosforilação de YAP e/ou TAZ, e exportação desses efetores para o citoplasma, onde serão sequestrados por complexos proteicos e/ou degradados. Assim, uma vez ativa, a expressão dos genes alvo da via Hippo é alterada. Entre os genes alvos conhecidos do complexo YAP/TAZ-TEAD, podemos citar CTGF (connective tissue growth factor), Cyr61 (cysteine-rich angiogenic inducer 61) e NOV (nephroblastoma overexpressed) (HEATH et al., 2008; LAI et al., 2011; MALIK; LISZEWSKA; JAWORSKI, 2015).

Figura 3 - Representação esquemática da via de sinalização Hippo-YAP/TAZ. Quando a via de sinalização Hippo está ativa/ligada (esquerda), vários sinais *upstream* regulam a fosforilação das quinases MST1/MST2, LATS1/LATS2 e fosforila as proteínas YAP/TAZ. A fosforilação de YAP/TAZ recruta proteínas 14-3-3 que estimulam a retenção citoplasmática ou degradação proteolítica. Quando a via Hippo está inativa/desligada (direita), YAP/TAZ não são fosforilados, permanecem no núcleo e formam um complexo com o fator de transcrição TEAD, regulando genes alvo necessários para a proliferação, migração e sobrevivência celular.



Fonte: (BOOPATHY; HONG, 2019).

### 2.2.1 A via Hippo na fisiopatologia da reprodução

A via de sinalização Hippo é considerada uma via de sinalização altamente conservada, com funções bem definidas na determinação de tamanho de órgãos, na diferenciação celular, proliferação e apoptose de células de diferentes tecidos, principalmente durante a embriogênese (MENG; MOROISHI; GUAN, K. L., 2016; YU; GUAN, K. L., 2013). No contexto da fisiopatologia da reprodução, a via Hippo está ligada a fisiologia ovariana, em processos patológicos como o cisto folicular e o câncer ovariano. Estudos com camundongos transgênicos, mostraram a importância da via Hippo na função ovariana, onde TAZ parece estar envolvido com a fertilidade, quando a deleção dessa proteína ocasionou uma diminuição nas

ninhadas de camundongos knockout (HOSSAIN et al., 2007). A deleção de genes alvos importantes de YAP/TAZ-TEAD, como o CTGF, altera o desenvolvimento folicular, ovulação e luteólise (NAGASHIMA et al., 2011). Além disso, quando houve uma indução exagerada de YAP, a ação do LH em células da granulosa de camundongos foi afetada negativamente, YAP é considerado um gene marcador de suscetibilidade em mulheres que apresentam a síndrome do ovário policístico (LI, T. et al., 2012). A expressão exagerada de YAP também tem sido verificada em células da granulosa provenientes de tumores ovarianos em mulheres (FU, D. et al., 2014).

Estudos sugerem que os efetores da via Hippo, YAP e TAZ possam exercer um papel importante na regulação da expressão de genes de grande importância para a cascata pré-ovulatória de LH, além da relação com o crescimento folicular e ovulação (CHENG, J.-C. et al., 2016). Alguns autores demonstraram que a YAP e/ou TAZ estimulam a expressão de AREG e EREG em diferentes tipos de câncer (GUERRANT et al., 2016), também mostram que YAP pode ser um mediador para a ação de Ang-II no tecido vascular (LIN, M. et al., 2018), além disso a deleção da expressão de YAP atenua a expressão de PTGS2 e a produção de PGE2 (CHENG, J.-C. et al., 2016).

### **2.2.2 A via Hippo no endométrio**

Os componentes da via de sinalização Hippo estão presentes no útero. Estudos demonstraram a expressão desses componentes no útero, além disso, a expressão desses membros varia durante o ciclo menstrual, sugerindo o envolvimento da via de sinalização Hippo na regulação da fisiologia uterina (STRAKOVA et al., 2010). Fatores endometriais autócrinos e parácrinos mudam ao longo do ciclo menstrual e agem na regulação da fisiologia endometrial. Estudos confirmaram a expressão de membros da via Hippo no endométrio e que o padrão de expressão mudou ao longo do ciclo menstrual, sugerindo que a via Hippo está envolvida na fisiologia endometrial em mulheres. Além disso, em comparação com a fase proliferativa, as quinases MST e LATS são reguladas positivamente durante a fase secretora do ciclo menstrual, enquanto ocorre downregulation de TAZ durante a descidualização das células do estroma endometrial (SINGH; CHAUDHRY; ASSELIN, 2011; ZHU et al., 2017). Estudos de Song et al. (2016) destacaram que a desregulação por inativação genética dos componentes da via de sinalização Hippo/YAP ou amplificação downstream do efetor YAP resulta em aumento da proliferação de células estromais endometriais e diminuição da apoptose celular.

Estudos recentes em bovinos e camundongos também demonstraram a importância da via de sinalização Hippo e seu principal efetor YAP no útero e estabelecimento da gestação inicial, mostrando que o IFNT induz a ativação de YAP (ZHANG, T. et al., 2021). Os resultados deste estudo, revelaram que a ativação de YAP induziu um ambiente imunossupressor local, induzindo a proliferação celular, permitindo a implantação do conceito no epitélio uterino. Resultados histopatológicos mostraram que o número de glândulas e o intervalo entre as células endometriais aumentaram em vacas durante a gestação inicial, além disso esses animais apresentaram maior expressão gênica e proteica de YAP no endométrio que os animais não gestantes, também foi verificado que os níveis de YAP fosforilado foram significativamente reduzidos (ZHANG, T. et al., 2021).

O fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) é uma proteína matriz celular secretada que regula vários aspectos das funções celulares, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração, adesão e estimulação da produção de matriz extracelular (BALL et al., 2003). No ovário, CTGF tem sido associado com o recrutamento de células da teca e mitogênese durante o desenvolvimento folicular e manutenção do corpo lúteo após a ovulação (HARLOW et al., 2002). No útero, células epiteliais luminais e glandulares são a principal fonte de CTGF durante o ciclo estral e pré-implantação (MOUSSAD et al., 2002).

Coletivamente, esses resultados indicam que CTGF está envolvido na promoção da proliferação, diferenciação, angiogênese e remodelação da matriz extracelular durante placentação e descidualização (BALL et al., 2003). Diferentes estudos mostram a detecção de proteína CTGF no fluido uterino em concentrações diferentes de acordo com a fase do ciclo estral (BALL et al., 2003). No entanto, o mecanismo pelo qual a expressão de genes alvo é regulada no endométrio precisa ser melhor compreendida e avaliada.

O estradiol-17 $\beta$  pode funcionar como um regulador essencial da proliferação de células epiteliais endometriais (CEE) e apoptose pela modulação das concentrações da proteína YAP1 no útero de ovelhas. Resultados indicam a existência de mecanismos moleculares do estradiol-17 $\beta$  e YAP1 na proliferação de CEE e apoptose em ovelhas (AN et al., 2020). A proteína YAP1 foi localizada no epitélio luminal endometrial (LE), epitélio glandular (GE), microvasos e miométrio do corno uterino em ovelhas no Dia 2 do ciclo estral. Esses resultados indicam que o estrógeno tem importante função na proliferação e apoptose de EEC em ovinos por meio da modulação da abundância de YAP1 nessas células (AN et al., 2020). As funções dos tecidos do corno uterino são essenciais para o desenvolvimento e implantação do embrião e YAP1 parece ser uma proteína importante na regulação da implantação do embrião (SASAKI, 2017).

### 2.2.3 A via Hippo no ovário

As células da granulosa são as principais células ovarianas que sofrem alterações morfológicas e fisiológicas ao longo da proliferação folicular, diferenciação, ovulação, luteinização e atresia (PLEWES et al., 2019). No interior do folículo ovariano as células da granulosa proliferam e produzem esteroides e fatores de crescimento, o que facilita o crescimento do folículo e a maturação do oócito (PLEWES et al., 2019). Nos mamíferos, o hormônio folículo estimulante (FSH) liberado da glândula hipófise anterior, liga-se aos receptores nas células da granulosa e estimula a expressão de CYP19A1, uma enzima responsável pela biossíntese de estradiol, que promove oogênese e o desenvolvimento folicular (FITZPATRICK; RICHARDS, Joanne S., 1993). Durante o ciclo estral, a proliferação e apoptose das células da granulosa são rigidamente controladas e sincronizadas (REGAN et al., 2018; ROBKER; RICHARDS, J. S., 1998). O fator de crescimento transformador alfa (Tgf- $\alpha$ ), um potente mitógeno, estimula a proliferação celular da granulosa, induzindo reguladores críticos do crescimento e migração celular (WANG, C. et al., 2012). No entanto, os mecanismos moleculares que governam a proliferação e apoptose da granulosa permanecem incertos (PLEWES et al., 2019).

Os co-ativadores da transcrição da via de sinalização Hippo YAP1 / TAZ desempenham um papel importante na proliferação de células da granulosa e na síntese de estradiol, dois processos necessários para manter o desenvolvimento normal dos folículos (PLEWES et al., 2019). Estudos recentes indicam que a via de sinalização Hippo pode desempenhar um papel importante na regulação da fisiologia e patologia dos ovários de mamíferos. Os principais componentes da cascata de sinalização Hippo foram expressos no ovário de ratas apresentando níveis reduzidos de mRNA e proteína para MST e LATS e níveis aumentados de YAP1 em células da granulosa em proliferação. Curiosamente, o YAP1 era predominantemente citoplasmático, enquanto o TAZ era nuclear em células somáticas, indicando que o YAP1 e o TAZ podem ser regulados diferencialmente e ter funções diferentes no ovário (HSUEH, A. J. W. et al., 2015; KAWASHIMA; KAWAMURA, 2018; SUN; PEPLING; DIAZ, F. J., 2015; XIANG et al., 2015).

O papel da sinalização Hippo / YAP1 no ovário bovino é amplamente desconhecido. Compreender a influência de FSH e fatores de crescimento ovariano, como o fator de crescimento transformador alfa (TGF $\alpha$ ), na sinalização da via Hippo nas células da granulosa



pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que governam o crescimento folicular (PLEWES et al., 2019).

Um estudo examinou a expressão e localização dos componentes de sinalização da via Hippo no ovário de bovinos e as possíveis funções de YAP1 e TAZ em células da granulosa. Os resultados indicam que esses co-ativadores da transcrição desempenham papéis importantes na proliferação da granulosa e na síntese de estradiol, demonstrando que a proteína efetora da via de sinalização Hippo YAP e o co-ativador de transcrição TAZ, estão presentes no ovário e a sua localização depende da densidade. YAP e TAZ estão criticamente envolvidos na proliferação de células da granulosa. Além disso, o YAP nas células da granulosa inibe a expressão da aromatase induzida por FSH e a biossíntese de estradiol. Os dados sugerem que o YAP desempenha um papel importante no desenvolvimento dos folículos ovarianos e na síntese de estradiol, necessários para manter a função ovariana normal (PLEWES et al., 2019).

Através da utilização de imunohistoquímica verificou-se que YAP está amplamente localizado nas células da granulosa e da teca dos folículos em desenvolvimento mais o corpo lúteo. O YAP está localizado principalmente no núcleo das células da granulosa e teca, no entanto, no corpo lúteo, YAP é principalmente encontrado na área citoplasmática. Muito pouco YAP foi detectado nas células do estroma (PLEWES et al., 2019). A imunohistoquímica revelou que tanto o YAP quanto TAZ são expressos nas células da granulosa e teca, bem como no corpo lúteo. Além disso, verificou-se que YAP é abundante em células da granulosa obtidas de folículos que variam de 2 a 10 mm. No entanto, TAZ parece ser altamente abundante em células da granulosa obtidas a partir de folículos que variam em tamanho de 2 a 5 mm. Da mesma forma, tanto YAP quanto a TAZ são expressos nas células luteais grandes e pequenas (PLEWES et al., 2019). A coloração com YAP1 também foi observada nas células endoteliais microvasculares do corpo lúteo. A presença de TAZ foi verificada no núcleo e citoplasma em todo o corpo lúteo, com intensa coloração na população de células luteais grandes (PLEWES et al., 2019).

### 2.3 BALANÇO ENERGÉTICO NEGATIVO EM RUMINANTES

O BEN durante o período de transição próximo ao parto é considerado a principal causa do desenvolvimento da hipercetonemia em ovinos (LACETERA et al., 2001; SAUN, VAN, 2000) e em vacas leiteiras (DRACKLEY, 1999; HERDT, 2000). Durante o BEN, devido a

redução da glicemia, ocorrem mudanças na regulação endócrina que causam extensiva mobilização de tecido corporal, principalmente tecido adiposo, a fim de atender as necessidades nutricionais para manutenção e produção de leite (DRACKLEY, 1999). Resultado da lipólise do tecido adiposo, os NEFA circulantes entram no fígado e tem três destinos: 1) podem ser completamente oxidados para energia através do ciclo de Krebs; 2) convertidos em BHB ou 3) podem ser re-sintetizados como triglicerídeos (TG), podendo serem liberados através de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) ou armazenados no fígado (INGVARTSEN; MOYES, 2013). Durante o BEN ocorre um aumento as concentrações circulantes de NEFA e um aumento as concentrações de corpos cetônicos, reflexo da incompleta oxidação de ácidos graxos no fígado (DRACKLEY, 1999). A hipercetonemia não ocorre por causa do balanço energético negativo e sim por falhas dos mecanismos adaptativos ao balanço energético negativo (HERDT, 2000). Assim, a severidade do BEN reduz os níveis de glicose e eleva os níveis de NEFA e corpos cetônicos (acetoacetato, acetona e BHB) (DAVID BAIRD, 1982; DRACKLEY, 1999). O aumento nos níveis de NEFA e BHB na circulação levam a ocorrência de cetose clínica ou subclínica (DRACKLEY, 1999). O teste “padrão ouro” para diagnóstico de cetose é o BHB sanguíneo, esse corpo cetônico é mais estável no sangue que a acetona ou o acetoacetato (OETZEL, 2007).

Os corpos cetônicos servem como fonte alternativa de energia para muitos tecidos, mas não contribuem ou contribuem apenas em pequena escala para o suprimento de energia ao feto. A glicose continua sendo o metabólito mais importante para o crescimento fetal e placentário. A capacidade da ovelha para fornecer uma quantidade suficiente de glicose ao feto a partir de fontes dietéticas é limitada, pois cerca de 70 a 75% do carboidrato da dieta é convertido no rúmen em produtos não-glicogênicos. A fração restante fornece de 40 a 60% da glicose circulante através do propionato. Durante o BEN e demanda aumentada de glicose, até 23% da glicose pode ser sintetizada a partir do glicerol liberado do tecido adiposo (SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, 2004).

Em bovinos, a hipercetonemia ocorre com maior frequência nos primeiros meses de lactação e estima-se que a prevalência de cetose clínica seja de 3,4% e que a prevalência de cetose subclínica seja de em média 24,1% nas primeiras três semanas de lactação (BRUNNER et al., 2019). Em ovinos, a toxemia da gestação (cetose clínica) ocorre com maior frequência nas últimas três a seis semanas de gestação (SAUN, VAN, 2000; SCHLUMBOHM, Christina; HARMEYER, 2008), enquanto que a cetose subclínica ocorre com maior frequência das primeiras duas semanas após o parto até seis semanas após o parto (FEIJÓ et al., 2015), com prevalência de 32,2% e 18,0%, respectivamente (PANOUSIS et al., 2012).

### 2.3.1 Impacto do BEN no desempenho reprodutivo

O sucesso do desempenho reprodutivo é consequência de uma cadeia de eventos, que consiste na retomada à ciclicidade após o parto, desenvolvimento e ovulação de um oócito viável, concepção, desenvolvimento embrionário, implantação, manutenção da prenhez e parto (GARNSWORTHY et al., 2008). Uma perturbação em alguma dessas etapas resulta no fracasso da concepção e sobrevivência embrionária e, conseqüentemente, da prenhez (LEROY, J. L.M.R.; OPSOMER; et al., 2008; LEROY, J. L.M.R.; VANHOLDER; et al., 2008). As falhas na comunicação entre o conceito e a mãe frequentemente resultam no término da gestação (SPENCER, T. E. et al., 2004).

Apesar da alta taxa de sucesso da fertilização em ruminantes, baixas taxas de nascimento indicam claramente a ocorrência de morte embrionária e perdas fetais durante a gestação (DISKIN; MURPHY; SREENAN, 2006). A maioria das mortes embrionárias ocorre durante o estágio de peri-implantação e afeta diretamente a fertilidade, estendendo o intervalo entre partos e reduzindo o número de produtos em muitas espécies, incluindo ruminantes (DISKIN; MORRIS, D. G., 2008). A maioria das perdas na gestação (20% a 30%) ocorre durante o estágio embrionário da gestação em ovelhas (DIXON et al., 2007; KAULFUSS et al., 1997).

A severidade e duração do BEN e a perda de condição corporal durante os primeiros meses de lactação estão associados a ausência de ciclicidade ao fim do período de espera voluntária (RIVERA et al., 2010). O efeito da cetose subclínica foi associado a menores taxas de prenhez em vacas leiteiras (CAIXETA et al., 2017; OSPINA et al., 2010; SANTOS, J. E. et al., 2010; WALSH, R. B. et al., 2007) e menores taxas de concepção na primeira inseminação artificial (RIBEIRO et al., 2013; WALSH, R. B. et al., 2007).

A nutrição tem um importante papel na manutenção e estabelecimento da prenhez em ruminantes. A subnutrição reduz o número de folículos que emergem e, portanto, afeta o número de folículos capazes de ovular e também afeta o número de folículos com maior diâmetro (ABECIA, J. A. et al., 2006). A qualidade oocitária é drasticamente reduzida após a exposição de NEFA durante a maturação final do oócito, afetando significativamente a qualidade do embrião e o metabolismo energético (HOECK, V. VAN et al., 2013; HOECK, Veerle VAN et al., 2011). Os embriões que foram expostos a NEFA tem um número reduzido de células blastocitárias, aumento na taxa de células apoptóticas e padrões alternados de expressão gênica (DESMET et al., 2016; HOECK, Veerle VAN et al., 2011). Um estudo

realizado com um pequeno número de animais sugeriu um efeito da nutrição materna na secreção de IFNT do embrião, onde embriões coletados no dia 15 de gestação de ovelhas em subnutrição tiveram atividade antiviral reduzida (ABECIA, J. A. A.; FORCADA, F.; LOZANO, 1999).

**3 ARTIGO - HIPPO SIGNALING PATHWAY ARE DIFFERENTLY CONTROLLED IN THE ENDOMETRIA AND CORPORA LUTEA DURING EARLY PREGNANCY IN EWES ON NEB.**

Artigo submetido

**Hippo signaling pathway is differently controlled in the endometria and corpora lutea during early pregnancy in ewes on negative energy balance**

Karine de Vargas Aires, Alfredo Quites Antoniazzi

1 Hippo signaling pathway is differently controlled in the endometria and corpora lutea during  
2 early pregnancy in ewes on negative energy balance.

3

4 Karine de Vargas Aires<sup>1¶</sup>, Alfredo Quites Antoniazzi<sup>1\*</sup>

5

6 <sup>1</sup>Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory – BioRep, Federal University of Santa  
7 Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

8

9 \*Corresponding author

10 E-mail: alfredo.antoniazzi@ufsm.br (AQA)

11 Address: Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory, BioRep, Federal University of  
12 Santa Maria, Av. Roraima 1000, ZIP code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

13 Phone: +55 55 32208752

14

15 ¶These authors contributed equally to this work.

16

17 Short title: Hippo pathway on maternal recognition of pregnancy

18

19

20

21

22

23

## 24 Abstract

25 Hippo signaling pathway is highly conserved within species, especially during embryogenesis  
26 and is part of embryonic Interferon tau (IFNT) control. Our study used an induced-NEB  
27 model during early pregnancy in ewes to evaluate effects on Hippo signaling pathway. For  
28 this, 21 ewes were allocated into four groups: Non-pregnant control (NP); pregnant control  
29 (P); NEB during the first week of pregnancy (FW); and NEB during the second week of  
30 pregnancy (SW). The NP ewes had a greater mRNA for *BIRC5* and *CYR61* on the CL ( $P <$   
31  $0.05$ ). *CYR61* was different between FW and SW on the CL ( $P < 0.05$ ). The SW had a greater  
32 concentration of progesterone ( $P < 0.05$ ). Our data suggest NEB does not alter the early  
33 embryo signaling. Subsequently, metabolic stress has a major influence on the circulating  
34 concentration of progesterone. Also, Hippo signaling pathway appears to be inactive in the  
35 endometrium during early pregnancy, because Day 17 endometria is highly proliferative.  
36 Also, in luteal Hippo signaling pathway is inactive during estrous cycle, probably due to  
37 apoptosis. However, on pregnant corpus luteum Hippo signaling pathway is active, it suggests  
38 P4 synthesis may be independent of the Hippo signaling pathway.

39

40 Keywords: Embryo, uterus, endometrium, corpus luteum, IFNT.

41

## 42 Introduction

43 Hippo signaling pathway is highly conserved within species, presenting well defined  
44 functions in regulating organ size, cell differentiation, proliferation, and apoptosis in different  
45 tissues, especially during embryogenesis (Yu and Guan 2013; Meng *et al.* 2016). The main  
46 effector of the pathway, Yes-Associated protein 1 (YAP 1), which is expressed in granulosa  
47 cells and plays a critical role in follicular development, as wells as in the uterus (Strakova *et*  
48 *al.* 2010; Lv *et al.* 2019; Zhang *et al.* 2021). The transcription co-activators play important

49 roles in granulosa proliferation and estradiol synthesis, demonstrating that the YAP protein  
50 and the transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) are present in the ovary  
51 and their location depends on density (Plewes *et al.* 2019). YAP is widely located in the  
52 granulosa and theca cells of the developing follicles, and the corpus luteum (CL).  
53 Immunohistochemistry studies found YAP located mainly in the nucleus of granulosa and  
54 theca cells, however, in the CL, it is mainly found in the cytoplasmic area (Plewes *et al.*  
55 2019). When present in the nucleus, the YAP 1 protein serves as a co-activator of many  
56 transcription factors, including those of the TEAD family transcription factors (TEA domain  
57 family member 1-4) controlling the expression of several cell proliferation genes (Pan 2010).  
58 Recent findings have shown that the Hippo signaling pathway is regulated by cellular  
59 metabolites and metabolic pathways, including glucose, free fatty acids, AMPK, and mTOR  
60 (Ardestani *et al.* 2018). Interestingly, some studies have described Hippo signaling pathway  
61 to be involved in Interferon tau (IFNT) expression in the conceptus (6) and the conceptus-  
62 endometrial interaction during early pregnancy (Kusama *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2021).

63         Maternal recognition of pregnancy is defined as the interaction between the maternal  
64 environment and the conceptus, which signal to the mother its presence (Thatcher, W. W.,  
65 Meyer, M. D., & Danet-Desnoyers 1995). In ruminants is necessary the secretion of IFNT by  
66 the trophoctoderm during the peri-implantation period of pregnancy (Godkin *et al.* 1984).  
67 Failures in conceptus-maternal communication often result in pregnancy loss (Spencer *et al.*  
68 2004). Most gestational losses (20% to 30%) occur during early embryonic stage in ewes  
69 (Kaulfuss *et al.* 1997; Dixon *et al.* 2007). Initially the embryo signals in a paracrine manner in  
70 the uterus (Spencer and Bazer 1996) and eventually in extra uterine tissues, such as the CL  
71 (Oliveira *et al.* 2008). Therefore, Hippo signaling action on the uterus and ovary remains  
72 object of many studies.



73           A frequent metabolic disorder in sheep is the hyperketonemia as a consequence of  
74 negative energy balance (NEB). In sheep NEB often occurs prior to parturition (Van Saun  
75 2000; Lacetera *et al.* 2001), leading to clinical ketosis, also known as pregnancy toxemia in  
76 the last three to six weeks of pregnancy (Van Saun 2000; Schlumbohm and Harmeyer 2008);  
77 whereas subclinical ketosis frequently occurs in the first two to six weeks after lambing (Feijó  
78 *et al.* 2015) and the prevalence about 18% (Panousis *et al.* 2012). Changes in endocrine  
79 regulation during NEB lead to extensive mobilization of body tissue, especially adipose  
80 tissue, to supply the maintenance nutritional requirements and pregnancy or milk production  
81 (Drackley 1999). Consequently, hyperketonemia occurs due to the failure of the adaptive  
82 mechanisms to NEB (Herdt 2000). NEB decreases the concentration of oxaloacetate and its  
83 precursors, triggering hyperketonemia. Consequently, the oxidation of large amounts of  
84 Acetyl-CoA from non-esterified fatty acids (NEFA) metabolism via the tricarboxylic cycle  
85 becomes limited redirecting this compound to ketogenesis (Bergman 1971; Caldeira 2005).  
86 The standard for diagnosing NEB and ketosis is to assess the concentration of  $\beta$ -  
87 hydroxybutyric acid (BHB) because it is more stable in the blood than other ketone bodies  
88 such as acetone or acetoacetate (Työppönen and Kauppinen 1980). The NEB decreases  
89 fertility in ruminants and also the effect of subclinical ketosis was associated with lower  
90 pregnancy rates in dairy cows (Walsh *et al.* 2007; Ospina *et al.* 2010; Santos *et al.* 2010;  
91 Caixeta *et al.* 2017) and lower rates in the first artificial insemination (Walsh *et al.* 2007;  
92 Ribeiro *et al.* 2013).

93           Therefore, the IFNT signaling during maternal recognition of pregnancy and  
94 conceptus-maternal interactions have involvement of Hippo pathway and the presence of  
95 NEB influences reproductive performance. Thus, our hypothesis is that induced NEB alters  
96 maternal-embryonic communication and the Hippo signaling pathway participates in this  
97 process. For this reason, the aim of our study was to evaluate the effects of induced NEB in

98 the first or second week of embryonic development, on Hippo signaling pathway on Day 17  
99 pregnant ewes. Endometrial and luteal responses to pregnancy and induced NEB were  
100 assessed.

101

## 102 Material and methods

### 103 Animals

104 All experimental procedures using animals were approved by the Institutional  
105 Committee for Ethics in Animal Experiments of Federal University of Santa Maria (protocol  
106 #5133030519). All ewes were acclimatized to experimental period at the early breeding  
107 season, 21 Texel-Corriedale crossbreed ewes were kept for 30 days in open paddocks,  
108 receiving a maintenance (FAO 2011). Total diet of 1.5 Kg of tifton85 hay and 0.25 Kg of  
109 crushed corn per day, offering 2.2 Mcal of metabolizable energy per ewe. The ewes received  
110 water and mineral supplement *ad libitum*.

111

### 112 Experimental design

113 All ewes were synchronized using intravaginal devices for 14 days, containing 62 mg  
114 medroxyprogesterone acetate. To induce ovulation and luteolysis, ewes received 400 IU  
115 equine chorionic gonadotropin (eCG) (Folligon®, MSD Animal Health, Kenilworth, N.J.,  
116 USA) and 0,132mg cloprostenol sodium (Cioprostinn®, Boehringer Ingelheim Animal Health  
117 do Brasil Ltda, Paulínia, S.P., Brazil) in a single IM administration at intravaginal device  
118 removal. Ovulation (Day 0) was estimated to be 56 hours after intravaginal device removal  
119 (Martinez-Ros *et al.* 2019). After removal of intravaginal device, ewes were observed every  
120 hour for evidence of standing estrus. Four hours later, 18 ewes were mated with a fertile rams.  
121 After breeding, ewes were allocated into four experimental groups: Open control group,  
122 nonbred and non-pregnant (NP; n = 3); pregnant control group (P; n = 6); NEB induced

123 during first week of embryonic development group (FW; n = 6) and NEB induced during  
124 second week of embryonic development group (SW; n = 6). The control groups (NP and P)  
125 received the same acclimatation diet throughout the experimental period (16 days). The FW  
126 group fasted from Days 0 to 7 and SW group fasted from Days 9 to 16. In the remaining days  
127 from groups FW (Days 8 to 16) and SW (Days 0 to 8) received the same diet as the controls.  
128 All the animals had unrestricted access to water and mineral supplement. Body condition  
129 score (BCS) (scale of 1 – 5, 1 = lean and 5 = obese) were determined on Days 0, 7 and 16.

130

### 131 Induction of NEB and hyperketonemia

132 Negative energy balance was induced according to (Bouchat Cl. *et al.* 1981; Feijó *et*  
133 *al.* 2016). Briefly, ewes from FW and SW groups fasted for 7 days, and were examined four  
134 times a day during the fasting period by the same veterinarian to evaluate their health status.  
135 In addition, blood BHB levels were monitored daily to identify possible risks of clinical  
136 ketosis. All ewes had no clinical signs of ketosis. Negative energy balance (NEB) decreases  
137 the concentration of oxaloacetate and its precursors, triggering hyperketonemia.  
138 Consequently, the oxidation of large amounts of Acetyl-CoA from NEFA metabolism via the  
139 tricarboxylic cycle becomes limited redirecting this compound to ketogenesis (Bergman 1971;  
140 Caldeira 2005). BHB is the most analyzed ketone body because of its stability in serum  
141 (Duffield 2000; Caldeira 2005; Oetzel 2007). Restrictive diets do not cause an increase in  
142 ketonemia in non-pregnant and non-lactating females. Only fasting can induce an increase in  
143 ketone bodies in blood concentration in cattle (Baird *et al.* 1979) and sheep (Herriman and  
144 Heitzman 1978; Cameron and Cienfuegos-Riva 1994).

145

### 146 Blood sampling

147 Blood samples were obtained on Days 0, 1, 4, 7, 10, 13 and 16 from all groups to  
148 determine  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and glycemic levels. Additional samples were obtained  
149 from fasting groups on Days 2, 3, 5 and 6 for FW; and on Days 9, 11, 12, 14 and 15 for SW.  
150 These analyses on BHB and glucose led us to confirm the hyperketonemia model. A 10 hour  
151 fast was done prior to each blood collection. Animals were physically restrained, and 2 mL of  
152 blood was collected from the jugular vein through vacutainer tubes with or without EDTA.  
153 Blood samples were centrifuged at 2000 x g, and serum stored at -20 °C for further analysis.

154

#### 155 Tissue sample collection

156 All ewes were euthanized on Day 17 of the estrous cycle (NP, n = 3) or pregnancy (P, n  
157 = 6; FW, n = 6 and SW, n = 6). Endometrial and luteal samples were collected for RNA,  
158 protein and histology studies. Endometrium samples were collected ipsi or contralateral horn  
159 to the corpus luteum. The samples for RNA and protein were snap-frozen in liquid nitrogen,  
160 and for histology stored in PFA 4% for 24 hours and following alcohol 70%. Pregnancy was  
161 confirmed by the presence of one or more normal developed embryo in the uterine lumen.

162

#### 163 Blood metabolites assay

164 Blood concentration of  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) and glycemia were performed using a  
165 FreeStyle Precision Ketone and Glucose Blood Monitor (Abbott, Abbott Diabetes Care Ltd.,  
166 Oxon, UK) (Panousis *et al.* 2012).

167

#### 168 Progesterone concentration

169 Concentration of progesterone was assessed on Day 16 blood. The concentration was  
170 determined by the chemiluminescence kit (ADVIA Centaur, Siemens) following the  
171 manufacturer's recommendations. The sensitivity of the assay was 0.15 ng/ml.

172

173 RNA extraction, reverse transcription and real time PCR

174 Total RNA was extracted from, endometrium and corpus luteum samples using  
175 TRIzol® according to manufacturer instructions. Briefly, the extraction used 750 µl TRIzol®  
176 reagent (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and 200 µl chloroform, followed by  
177 purification of the aqueous phase with 400µl isopropyl alcohol. Quantification and estimation  
178 of RNA purity were performed using a NanoDrop™ spectrophotometer (Thermo Scientific,  
179 Waltham, MA, USA; Absorbance 260 / 280 nm ratio). RNA was treated with 0.1 U DNase  
180 Amplification Grade (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) for 15 minutes at 27 °C to  
181 degrade DNA molecules. DNase was inactivated with 1 µl EDTA for 10 minutes at 65 °C.  
182 Reverse transcription was performed by adding 1 U iScript cDNA synthesis Kit (BioRad,  
183 Hercules, CA, USA) for 5 minutes at 25 °C followed by 30 minutes at 42 °C and 5 minutes at  
184 85 °C. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was conducted in a thermocycler  
185 (BioRad, Hercules, CA, USA) using 2 µl of cDNA and 8µl of MIX containing forward and  
186 reverse bovine specific primers Table 1, nucleases free water, and GoTaq® Master Mix  
187 (Promega Corporation, Madison, USA). Amplification was performed with an initial  
188 denaturation at 95 °C for 5 minutes followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15  
189 seconds and annealing/extension at 60 °C for 30 seconds. To optimize the RT-qPCR assays,  
190 serial dilutions of cDNA templates were used to generate a standard curve. Reactions  
191 presenting a coefficient of determination ( $R^2$ ) above 0.98 and efficiency between 85 to 110 %  
192 were considered optimized. Samples were run in duplicate, and the results of all genes were  
193 expressed relative to the *GAPDH* reference gene, according to Pfaffl (2001).

194

195 Immunohistochemistry

196 For immunohistochemical (IHC) analyses, bovine corpora lutea were fixed in  
197 formaldehyde 10% solution for 24 hours, rinsed and dehydrated in alcohol. Tissues were then  
198 embedded in paraffin, sectioned (5  $\mu\text{m}$ -thick) and stained with hematoxylin and eosin (H&E).  
199 Immunohistochemistry was done on tissue sections using VectaStain Elite avidin–biotin  
200 complex method kits (Vector Laboratories). Sections were probed with a primary antibody  
201 against YAP (1:300, #14074, Cell Signaling) or phospho-YAP (1:300, #13008, Cell  
202 Signaling). Staining was done using the 3,3'-diaminobenzidine peroxidase substrate kit  
203 (Vector Laboratories). Negative controls used no primary antibody. Photomicrographs were  
204 taken using a Carl Zeiss Axio Imager M1 microscope (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto,  
205 Canada) at  $\times 1.000$  magnification and using the Zen 2012 blue edition software (Carl Zeiss,  
206 Oberkochen, Germany).

207

#### 208 Statistical analysis

209 Initially, all continuous data were tested for normal distribution (Shapiro-Wilk test),  
210 and when necessary they were transformed into logarithms. The analysis of variance was  
211 performed with software JMP (SAS Institute) with the treatment as main effect and replicates  
212 as a random effect. Differences between the means were tested with the Tukey multiple  
213 comparison test. The homogeneity of variance was tested with O'Brien test. Results are  
214 presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and  $P < 0.05$  was considered  
215 significant.

216

#### 217 Results

##### 218 Descriptive analyses

219           There were no differences among groups regarding age, body condition score on Days  
220 0, 7, and 16, and the number of CL on Day 17. There was no difference regarding to the  
221 presence of embryo in the P, FW, and SW groups, on the Day 17.

222

223 NEB and Pregnancy model: Glycemic and BHB levels, and *ISG15* expression

224           Two days after fasting beginning all the ewes declined glycemic and increased BHB  
225 levels. On Day 0, control group had a lower glycemic level than the FW group ( $P < 0.001$ )  
226 and the SW group ( $P < 0.05$ ). On Day 10, the SW group had a lower glycemic level than the  
227 control group ( $P < 0.05$ ) and the FW group ( $P < 0.01$ ). Blood BHB for FW group on Day 4  
228 had a greater blood BHB level than the control groups ( $P < 0.001$ ) and the SW group ( $P <$   
229  $0.001$ ); on Day 7, the FW group had a higher blood BHB level than the control groups ( $P <$   
230  $0.001$ ) and the SW group ( $P < 0.001$ ). During fasting period, ewes from FW and SW groups  
231 presented a strong negative correlation for glycemic levels in the first two days of fasting  
232 (Day 0 to Day 2) ( $-0.72$ ;  $P < 0.001$ ) and a moderate positive correlation for blood BHB levels  
233 on the seven days of fasting (Day 0 to Day 7) ( $0.60$ ;  $P < 0.001$ ) (data not shown).

234           The levels of mRNA expression for *ISG15* were evaluated in endometria and CL. The  
235 NP group had lower *ISG15* expression than all the pregnant groups (P, FW and SW), in the  
236 ipsilateral horn to CL ( $P < 0.05$ ; Fig 1A). In the contralateral horn to CL, the NP group, also  
237 presented lower relative *ISG15* expression when compared to the P group, ( $P < 0.05$ ; Fig 1B).  
238 The NP group had a lower relative expression for *ISG15* than P, FW, and SW groups ( $P <$   
239  $0.05$ ). All the pregnant groups (P, FW, and SW) had no difference for *ISG15* mRNA  
240 expression ( $P > 0.05$ ) (Fig 1C).

241

242 Hippo signaling pathway in endometria and corpora lutea

243 Hippo signaling pathway effector *YAPI*, was expressed in all experimental groups, but  
244 there was no difference ( $P > 0.05$ ), in both ipsi- and contralateral horns to the CL (Fig 2A and  
245 2B). Similar results were found for *CTGF* and *BIRC5*, which did not have difference among  
246 groups ( $P > 0.05$ ) in both horns (Fig 2E, 2F, 2I, and 2J). For *CYR61*, there was no difference  
247 among groups in the ipsilateral horn ( $P > 0.05$ ; Fig 2G), and contralateral horn to the CL ( $P >$   
248  $0.05$ ; Fig 2H). The levels of relative expression for *TEAD4* were greater in the P group when  
249 compared to the NP group, presenting a difference in the ipsi- ( $P < 0.05$ ; Fig 2C), and  
250 contralateral horn to the CL ( $P < 0.05$ ; Fig 2D).

251 In the CL, the main effector of the Hippo signaling pathway, *YAPI*, was present in all  
252 experimental groups. However, mRNA *YAPI* there was no difference in all groups ( $P > 0.05$ ;  
253 Fig 3A). The levels of mRNA for *TEAD4* were greater in the NP group when compared to  
254 the P group, showing a difference between groups after contrast ( $P < 0.05$ ). When considered  
255 only pregnant ewe there was no difference between groups P, FW, and SW ( $P > 0.05$ ; Fig  
256 3B). Levels of mRNA for *CTGF* were not different among experimental groups ( $P > 0.05$ ; Fig  
257 3C). The NP group had a greater mRNA for *BIRC5* and *CYR61* than the P group ( $P < 0.05$ ).  
258 Among the P, FW, and SW groups, there was no difference mRNA for *BIRC5* ( $P > 0.05$ ; Fig  
259 3E). Levels of mRNA for *CYR61* decreased in the FW group ( $P < 0.05$ ) and increased in the  
260 SW group ( $P < 0.05$ ; Fig 3D).

261

262 Luteal mRNA relative expression of 3BHSD gene

263 The pregnant groups (P, FW, and SW) presented a greater relative expression of  
264 *3βHSD* than the NP group ( $P < 0.05$ ) (Fig 4). However, there was no difference in the levels  
265 of relative expression among the pregnant groups ( $P > 0.05$ ).

266

267 Progesterone concentrations



268           There was no difference in progesterone concentrations (ng/mL) among the NP, P, and  
269 FW groups ( $P > 0.05$ ) (Fig 5). The ewes from the SW group had greater concentration of  
270 progesterone when compared to the other experimental groups ( $P < 0.05$ ).

271

272 Localization of Total YAP1, Phospho-YAP (Ser127) in luteal cells

273           Our IHC analyses revealed that total YAP signal is present throughout the corpus  
274 luteum (CL) section and its positive signal varies depending on the cells shape/size (Fig 6A).  
275 In most luteal cells, total YAP expression was observed in the nucleus and cytoplasm.  
276 Staining seems stronger in small luteal cells with less vacuolated and smaller cytoplasm,  
277 normally outlying large luteal cells. On the other hand, large luteal cells containing  
278 voluminous and vacuolated cytoplasm presented a variable and mild positive signal for total  
279 YAP (predominantly in the nucleus). It was also analyzed the expression of phospho-YAP at  
280 serine 127 (Ser127; Fig 6B). For both large and small luteal cells, phospho-YAP signal was  
281 weak and when positive, it was detected predominantly in the nucleus of luteal cells.  
282 However, non-luteal cell, such as endothelial cells, presented strong staining to phospho-YAP  
283 predominantly in the nucleus.

284

285 Discussion

286           The present study used an induced-NEB model during early-pregnancy in ewes to  
287 evaluate the effect on maternal recognition of pregnancy paracrine and endocrine mechanisms  
288 and the involvement of Hippo signaling pathway. In order to achieve our aim, we analyzed  
289 the embryo signaling to the endometrium ipsi and contralateral to the corpus luteum, and the  
290 corpus luteum. NEB did not alter Hippo signaling pathway in the endometrium during early  
291 embryonic development. The CL has two different patterns of expression regarding to hippo  
292 signaling pathway, the NP group possibly had already started functional luteolysis, this is

293 supported by low concentration of progesterone and decreased *3βHSD* expression, and the  
294 increase in hippo signaling due to apoptosis structural. Conversely, the Day 17 CL on  
295 pregnant ewes has not started apoptosis, in fact the embryo protects the CL, and for this  
296 reason the hippo pathway has lower expression.

297         The Hippo signaling pathway seems to be involved in the process of downregulation  
298 of the IFNT. The relocation of TEAD and/or degradation of YAP after its phosphorylation  
299 deregulates the transcription of the IFNT gene after implantation of the conceptus in the  
300 endometrium (Kusama *et al.* 2016). Studies have shown the presence of some components of  
301 the Hippo signaling pathway in the endometrium, the expression of these members suggests  
302 the action of the pathway in uterine physiology (Strakova *et al.* 2010). Also, IFNT induces YAP  
303 activation in the endometrium by reducing the expression of miR-16a (Zhang *et al.* 2021).  
304 YAP activation provides a suitable environment for early pregnancy in maternal endometrial  
305 tissue, promotes the proliferation of endometrial cells and induces the progression of  
306 epithelial-mesenchymal transition (EMT) to allow the uterus to receive the embryo. In  
307 addition, miRNA-16a is the major component downstream of IFNT-mediated YAP activation  
308 (Zhang *et al.* 2021). Our results clearly demonstrate the Hippo signaling pathway do not  
309 decrease synthesis of IFNT. This is evidenced by the expression of *ISG15* in the  
310 endometrium. Furthermore, it is also evident the Hippo signaling pathway is inactive in the  
311 endometrium on Day 17, because it is highly proliferative (Zheng *et al.* 1996).

312         The binding of YAP to TEADs is mediated by the N-terminal domain of YAP and the  
313 C-terminal domain of TEAD, and this interaction plays a crucial role in mediating the  
314 biological function of YAP (Vassilev *et al.* 2001). The YAP/TEAD interaction is critical for  
315 regulating genes responsive to the Hippo signaling pathway (Chen *et al.* 2010). YAP works in  
316 conjunction with TEAD transcription factors to increase downstream CCN growth factors and  
317 BIRC apoptosis inhibitors (baculoviral inhibitors of apoptosis repeat-containing). The CCN

318 proteins, in turn, stimulate cell growth, survival, and proliferation (Pan 2007; Holbourn *et al.*  
319 2008). Studies suggest that CCN1-3 (CYR61, CTGF, and NOV) plays essential roles in the  
320 regulation of various reproductive functions (Winterhager and Gellhaus 2014). Therefore,  
321 YAP is a potent stimulator of cell growth and proliferation, processes that consume energy.  
322 The regulation of the Hippo signaling pathway by AMPK suggests that the metabolic state  
323 may function as a checkpoint for YAP growth-promoting activity. In conditions of nutrient  
324 deprivation or low energy, YAP activity needs to be restricted to avoid energy depletion  
325 caused by anabolic processes (Yu *et al.* 2015).

326         TEAD4 is essential for the establishment of pregnancy in the post-implantation period,  
327 indicating that impairment of the Hippo signaling pathway may be a molecular cause for early  
328 pregnancy loss (Saha *et al.* 2020). Our results, demonstrate that the Hippo signaling pathway  
329 is inactive in endometrial cells on Day 17 of pregnancy. We found a greater expression of  
330 *TEAD4* in the endometrium of pregnant ewes compared to non-pregnant ewes. The intense  
331 proliferation of endometrial cells during early pregnancy (Zheng *et al.* 1996) corroborates our  
332 results, showing the greater expression of *TEAD4* and consequently the inactivation of the  
333 Hippo signaling pathway. YAP may be using other mechanisms to regulate gene transcription  
334 in non-pregnant animals, due to the interaction with other transcription factors in addition to  
335 TEADs. It is not yet clear how the Hippo pathway act in the CL. There was a trend towards a  
336 greater relative expression of *YAP / TEAD4* mRNA in the CL on Day 17 during the estrous  
337 cycle when compared to pregnancy, possibly due to apoptotic mechanisms of CL (Juengel *et*  
338 *al.* 1993). The results indicate that, unlike what occurs in the endometrium, the Hippo  
339 pathway is active in the luteal cells of pregnant ewes. Expression of *3βHSD* and concentration  
340 of progesterone suggest that P4 production is independent of the Hippo signaling pathway in  
341 the CL of pregnant ewes on Day 17. However, in NP ewes the Hippo pathway is inactive,  
342 probably due to apoptotic mechanisms resulting from structural luteolysis.

343 Besides being a target gene for the Hippo signaling pathway, CTGF has other  
344 functions, such as growth, migration, adhesion, and production of the extracellular matrix of  
345 uterine cells during the estrous cycle and early pregnancy as well as early development of the  
346 embryo (Surveyor *et al.* 1998). Findings in human luteinized granulosa cells suggest that the  
347 regulation of CTGF is multifactorial and modulated in an endocrine and paracrine manner  
348 (Liu *et al.* 2019). CTGF is a downstream mediator in the P4 signaling cascade and necessary  
349 for normal follicle development and ovulation (Nagashima *et al.* 2011). Moreover, CTGF  
350 promotes the migration and proliferation of endothelial cells (Meidan *et al.* 1999; Wandji *et*  
351 *al.* 2000). Our data showed no difference in endometrium *CTGF* expression in all groups.  
352 High concentrations of P4 and IFNT increase the expression of endometrial *CTGF* in cattle  
353 and sheep (Satterfield *et al.* 2009; Forde *et al.* 2010). This may justify the inactivation of the  
354 Hippo signaling pathway during this period. Our study showed that there is a similarity in the  
355 expression of *CTGF* in the CL during the estrous cycle and pregnancy. In the regression CL,  
356 *CTGF* transcripts are present, perhaps associated with the migration of macrophages to the  
357 CL during luteolysis (Meidan *et al.* 1999).

358 Endometrial growth and remodeling of the vasculature is a direct or indirect  
359 consequence of changes in the circulating concentrations of ovarian steroids estrogen and  
360 progesterone. Increasing concentrations of estrogen are associated with rapid vascularization  
361 occurring during the proliferative stage of the cycle (Girling and Rogers 2009; Arai *et al.*  
362 2013). The CYR61 acts in the cell adhesion process in endothelial cells and fibroblasts  
363 contributes to the embryogenesis process, including implantation, placentation, and fetal-  
364 maternal crosstalk (Kipkeew *et al.* 2016; Klein 2016; Yang *et al.* 2018). The development and  
365 death of CL are accompanied by angiogenic and angio regressive processes, CYR61 is  
366 predominantly involved in the angiogenesis processes in CL, however, the mediators of these  
367 processes have not been fully known (Zhang *et al.* 2011).

368 CYR61 is estrogen-dependent and overexpressed in breast tumors (Xie *et al.* 2001).  
369 Which justifies the greater expression of *CYR61* in CL of ewes during the estrous cycle. CL-  
370 derived endothelial cells, as well as luteal steroidogenic cells, are sources of CYR61, and their  
371 positive regulation is correlated with the angiogenic change in the CL (Winterhager and  
372 Gellhaus 2014). Therefore, in the present study, we can suggest that embryonic implantation  
373 from Day 15-16 onwards may negatively regulate the expression of *CYR61* in the CL of  
374 pregnant ewes. Otherwise, YAP/TEAD signals the expression of *CYR61* mRNA that may be  
375 acting positively in the regulation of structural CL apoptosis during the estrous cycle.  
376 Coincidentally, the Hippo signaling pathway is inactive and *BIRC5* is overexpressed in CL  
377 because it is an apoptosis inhibitor and induced by the action of YAP/TEAD acting  
378 simultaneously.

379 BIRC5 acts as an inhibitor of apoptosis and has several functions in cellular processes,  
380 such as differentiation and proliferation of stem cells and progenitor cells, and its deficiency  
381 results in embryonic lethality in the early stage of embryogenesis plays a crucial role in  
382 differentiation and cell proliferation (Haq *et al.* 2016). Curiously, in our study, we also found  
383 no difference in the expression of *BIRC5* in the endometrium between the groups evaluated,  
384 which can be explained by the estrogen positively regulates *BIRC5* in the endometrium  
385 through its receptor, so BIRC5 plays a role in uterine dynamics during the estrous cycle,  
386 physiologically can be regulated periodically by estrogen and P4 in the endometrium  
387 throughout the estrous cycle (Cho *et al.* 2020). Interestingly, our study demonstrated a greater  
388 expression for *BIRC5* in the CL during the estrous cycle. The most convincing evidence for  
389 the involvement of apoptosis of luteal endothelial cells comes from observations of CL in  
390 regression in sheep where blood vessels are blocked with cellular debris, probably from  
391 endothelial cells (Sawyer *et al.* 1990; Fraser and Wulff 2003). BIRC5 appears to be  
392 influenced by steroid hormones and deregulated by the increase in progesterone during the

393 luteal phase due to the observation of the cyclic expression of *BIRC5* in normal endometrial  
394 cells (Filipchiuk *et al.* 2020). Our results demonstrate that this cyclicity can also be observed  
395 in luteal cells according to the physiological stage, as observed in CL on Day 17. Also,  
396 concentration of progesterone is correlated with the *BIRC5* expression in the peripheral blood  
397 of women with endometriosis (Filipchiuk *et al.* 2020).

398 Progesterone profiles allows an assessment of CL functionality and indicates the  
399 occurrence of events such as ovulation, embryonic death after maternal recognition of  
400 pregnancy, or premature luteolysis (deNicolo *et al.* 2009). Embryos recovered from cows with  
401 high progesterone circulation are more developed and produce higher amounts of IFNT than  
402 embryos from cows with low circulating progesterone concentrations (Mann and Lamming  
403 2001). Low progesterone concentration in early pregnancy has been correlated with negative  
404 effects on embryo development and elongation (Carvalho *et al.* 2017). Studies have shown  
405 that appropriate numbers of granulosa cells in the developing follicle are critical to providing  
406 the minimum population of large luteal cells needed to maintain progesterone production  
407 (White *et al.* 1987). Environmental factors that affect the proliferation or fate of granulosa  
408 cells can reduce the number of luteal cells with adverse effects on progesterone production by  
409 the subsequent CL (Abedel-Majed *et al.* 2019). NEB also modulated the concentration of  
410 progesterone. In the present study, the experimental model was effective in causing  
411 hyperketonemia, where ewes fasting had a decrease in glucose and an increase in BHB levels,  
412 but it was not enough to cause significant changes in the endometrium. The effects of NEB  
413 can result in the inadequate function of the CL, leading to suboptimal progesterone  
414 concentrations. The latter, but probably also low concentrations of IGF, may be responsible  
415 for a suboptimal microenvironment in the uterus, unable to sustain early embryonic life  
416 (Leroy *et al.* 2008). In contrast, our study shows that pregnant ewes in NEB in the second  
417 week of gestation have a greater serum progesterone concentration than pregnant control

418 ewes. In addition to serving as energetic fuels for extrahepatic tissues such as the brain, heart,  
419 or skeletal muscle, ketone bodies play essential roles as signaling mediators, conductors of  
420 post-translational protein modification (PTM), and modulators of inflammation and oxidative  
421 stress (Puchalska and Crawford 2019). During NEB and especially in the transition period,  
422 the changes that occur in metabolism are reflective of metabolic changes in the liver (Grum *et al.*  
423 *al.* 1996). Ovine studies have demonstrated that increased food intake causes an increase in  
424 hepatic blood flow and a decrease in circulating progesterone concentrations (Parr *et al.*  
425 1993). The increased metabolism of the hormone progesterone may also be related to the  
426 decrease in fertility in overfed females (Sartori and Guardieiro 2010). In this case, due to the  
427 fasting in the SW group, we can consider a reduction in hepatic metabolism as the cause for  
428 the greater concentration of progesterone. Our results in the CL suggest that progesterone  
429 concentration is independent of Hippo signaling.

430         Hyperketonemia is characteristic of NEB in ruminants, especially ewes at the end of  
431 pregnancy (pregnancy toxemia) or early lactation (Van Saun 2000; Lacetera *et al.* 2001). Our  
432 experimental design could be used to study NEB or hyperketonemia and its effects on  
433 ruminants' early pregnancy. It is important to understand the physiological processes during  
434 early pregnancy, such as maternal recognition of pregnancy and its signaling in endometria  
435 and corpora lutea (Antoniazzi *et al.* 2013; Hansen *et al.* 2017). Understanding the  
436 participation of the Hippo signaling pathway in the CL (Plewes *et al.* 2019) and during IFNT  
437 production by the embryo (Kusama *et al.* 2016) allows understanding mechanisms that may  
438 be involved in the maintenance of pregnancy and production of progesterone, contributing to  
439 the reduction of early embryonic losses.

440         Our results demonstrate that NEB induced in the first or second week of embryonic  
441 development does not alter the Hippo signaling pathway in the endometrium and CL during  
442 pregnancy. Our data suggest NEB does not alter the early embryo signaling. Subsequently,

443 metabolic stress has a major influence on the circulating concentration of progesterone. Also,  
444 Hippo signaling pathway appears to be inactive in the endometrium during early pregnancy,  
445 because Day 17 endometria is highly proliferative. Also, in luteal Hippo signaling pathway is  
446 inactive during estrous cycle, probably due to apoptosis. However, on pregnant CL Hippo  
447 signaling pathway is active, it suggests P4 synthesis may be independent of the Hippo  
448 signaling pathway.

449

450 Declaration of interest

451 The authors declare no conflicts of interest.

452

453 Funding

454 This study was supported by CAPES Brazil, FAPERGS, FAPESP, Finep and National  
455 Council for Scientific and Technological Development (CNPq). K.V.A. was financially  
456 supported by CAPES.

457

458 Acknowledgment

459 The group acknowledges the Montreal University.

460

461 References

462 Abedel-Majed M. A., Romereim S. M., Davis J. S., and Cupp A. S. (2019). Perturbations in

463 Lineage Specification of Granulosa and Theca Cells May Alter Corpus Luteum

464 Formation and Function. *Frontiers in Endocrinology*. doi:10.3389/fendo.2019.00832

465 Antoniazzi A. Q., Webb B. T., Romero J. J., Ashley R. L., Smirnova N. P., Henkes L. E., Bott

466 R. C., Oliveira J. F., Niswender G. D., Bazer F. W., and Hansen T. R. (2013). Endocrine

467 delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2 alpha-



- 468 induced luteolysis in ewes. *Biol. Reprod.* doi:10.1095/biolreprod.112.105684
- 469 Arai M., Yoshioka S., Tasaki Y., and Okuda K. (2013). Remodeling of bovine endometrium  
470 throughout the estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* **142**, 1–9.  
471 doi:10.1016/j.anireprosci.2013.08.003
- 472 Ardestani A., Lupse B., and Maedler K. (2018). Hippo Signaling: Key Emerging Pathway in  
473 Cellular and Whole-Body Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism.*  
474 doi:10.1016/j.tem.2018.04.006
- 475 Baird G. D., Heitzman R. J., Reid I. M., Symonds H. W., and Lomax M. A. (1979). Effects of  
476 food deprivation on ketonaemia, ketogenesis and hepatic intermediary metabolism in the  
477 non-lactating dairy cow. *Biochem. J.* doi:10.1042/bj1780035
- 478 Bergman E. N. (1971). Hyperketonemia-Ketogenesis and Ketone Body Metabolism. *J. Dairy*  
479 *Sci.* doi:10.3168/jds.S0022-0302(71)85950-7
- 480 Bouchat Cl. J., Doize F., and Paquay R. (1981). Influence of diet and prolonged fasting on  
481 blood lipids, ketone bodies, glucose and insulin in adult sheep. *Reprod. Nutr. Dev.*  
482 doi:10.1051/rnd:19810106
- 483 Caixeta L. S., Ospina P. A., Capel M. B., and Nydam D. V. (2017). Association between  
484 subclinical hypocalcemia in the first 3 days of lactation and reproductive performance of  
485 dairy cows. *Theriogenology.* doi:10.1016/j.theriogenology.2017.01.039
- 486 Caldeira R. M. (2005). Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado  
487 nutricional em ovelhas. *Rev. Port. Ciências Veterinárias.*
- 488 Cameron N. D., and Cienfuegos-Riva E. (1994). Genetic and phenotypic relationships  
489 between physiological traits and performance test traits in sheep. *Genet. Sel. Evol.*  
490 doi:10.1051/gse:19940204
- 491 Carvalho P. D., Consentini C. C., Weaver S. R., Barleta R. V., Hernandez L. L., and Fricke P.  
492 M. (2017). Temporarily decreasing progesterone after timed artificial insemination

- 493 decreased expression of interferon-tau stimulated gene 15 (ISG15) in blood leukocytes,  
494 serum pregnancy-specific protein B concentrations, and embryo size in lactating Holstein  
495 cows. *J. Dairy Sci.* **100**, 3233–3242. doi:10.3168/jds.2016-11996
- 496 Chen L., Chan S. W., Zhang X. Q., Walsh M., Lim C. J., Hong W., and Song H. (2010).  
497 Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the Hippo pathway. *Genes Dev.* **24**,  
498 290–300. doi:10.1101/gad.1865310
- 499 Cho M., Lee O. H., Chang E. M., Lee S., Moon S., Lee J., Park H., Park K. H., Park C., Hong  
500 K., and Choi Y. (2020). BIRC5 expression is regulated in uterine epithelium during the  
501 estrous cycle. *Genes (Basel)*. **11**,. doi:10.3390/genes11030282
- 502 deNicolo G., Parkinson T. J., Kenyon P. R., Morel P. C. H., and Morris S. T. (2009). Plasma  
503 progesterone concentrations during early pregnancy in spring- and autumn-bred ewes.  
504 *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2008.03.017
- 505 Dixon A. B., Knights M., Winkler J. L., Marsh D. J., Pate J. L., Wilson M. E., Dailey R. A.,  
506 Seidel G., and Inskeep E. K. (2007). Patterns of late embryonic and fetal mortality and  
507 association with several factors in sheep. *J. Anim. Sci.* doi:10.2527/jas.2006-129
- 508 Drackley J. K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final  
509 Frontier? *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.s0022-0302(99)75474-3
- 510 Duffield T. (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food*  
511 *Anim. Pract.* doi:10.1016/S0749-0720(15)30103-1
- 512 FAO (2011). Nutrition of ruminants. *Pers. Commun.*
- 513 Feijó J. D. O., Oliveira A. M., Pereira R. A., Martins C. F., Del Pino F. A. B., Ferreira M. B.,  
514 Rabassa V. R., and Corrêa M. N. (2016). PROTOCOLO DE INDUÇÃO DE CETOSE  
515 SUBCLÍNICA E SEU EFEITO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM  
516 OVELHAS GESTANTES. *Sci. Anim. Heal.* doi:10.15210/sah.v4i1.5283
- 517 Feijó J. O., Schneider A., Schmitt E., Brauner C. C., Martins C. F., Barbosa-Ferreira M., Del

- 518 Pino F. A. B., Faria S. P., Rabassa V. R., and Corrêa M. N. (2015). Prepartum  
519 administration of recombinant bovine somatotropin (rBST) on adaptation to subclinical  
520 ketosis of the ewes and performance of the lambs. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*  
521 doi:10.1590/1678-6849
- 522 Filipchiuk C., Laganà A. S., Beteli R., Ponce T. G., Christofolini D. M., Trevisan C. M.,  
523 Fonseca F. L. A., Barbosa C. P., and Bianco B. (2020). BIRC5/survivin expression as a  
524 non-invasive biomarker of endometriosis. *Diagnostics* **10**, 1–10.  
525 doi:10.3390/diagnostics10080533
- 526 Forde N., Spencer T. E., Bazer F. W., Song G., Roche J. F., and Lonergan P. (2010). Effect of  
527 pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for  
528 transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. *Physiol. Genomics* **41**, 53–  
529 62. doi:10.1152/physiolgenomics.00162.2009
- 530 Fraser H. M., and Wulff C. (2003). Angiogenesis in the corpus luteum. *Reproductive Biology*  
531 *and Endocrinology*. doi:10.1186/1477-7827-1-88
- 532 Girling J. E., and Rogers P. A. W. (2009). Regulation of endometrial vascular remodelling:  
533 Role of the vascular endothelial growth factor family and the angiopoietin-TIE signalling  
534 system. *Reproduction* **138**, 883–893. doi:10.1530/REP-09-0147
- 535 Godkin J. D., Bazer F. W., and Roberts R. M. (1984). Ovine trophoblast protein 1, an early  
536 secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein  
537 synthesis. *Endocrinology* **114**, 120–130. doi:10.1210/endo-114-1-120
- 538 Grum D. E., Drackley J. K., Younker R. S., LaCount D. W., and Veenhuizen J. J. (1996).  
539 Nutrition during the Dry Period and Hepatic Lipid Metabolism of Periparturient Dairy  
540 Cows. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76553-0
- 541 Hansen T. R., Sinedino L. D. P., and Spencer T. E. (2017). Paracrine and endocrine actions of  
542 interferon tau (IFNT). *Reproduction* **154**, F45–F59. doi:10.1530/rep-17-0315

- 543 Haq I. U., Han Y., Ali T., Wang Y., Gao H., Lin L., Wu Y., Wu S., and Zeng S. (2016).  
544 Expression of interferon-stimulated gene ISG15 and ubiquitination enzymes is  
545 upregulated in peripheral blood monocyte during early pregnancy in dairy cattle. *Reprod.*  
546 *Biol.* **16**, 255–260. doi:10.1016/j.repbio.2016.10.001
- 547 Herdt T. H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the  
548 etiology of ketosis and fatty liver. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*  
549 doi:10.1016/S0749-0720(15)30102-X
- 550 Herriman I. D., and Heitzman R. J. (1978). The effects of fasting on the concentrations of  
551 intermediate metabolites in the blood and hepatic tissues of pregnant and non-pregnant  
552 ewes. *J. Agric. Sci.* doi:10.1017/S0021859600056112
- 553 Holbourn K. P., Acharya K. R., and Perbal B. (2008). The CCN family of proteins: structure-  
554 function relationships. *Trends in Biochemical Sciences.* doi:10.1016/j.tibs.2008.07.006
- 555 Juengel J. L., Allen Garverick H., Johnson A. L., Youngquist R. S., and Smith M. F. (1993).  
556 Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology.*  
557 doi:10.1210/endo.132.1.8419126
- 558 Kaulfuss K. H., May J., Süß R., and Moog U. (1997). In vivo diagnosis of embryo mortality  
559 in sheep by real-time ultrasound. *Small Rumin. Res.* doi:10.1016/S0921-4488(96)00939-  
560 X
- 561 Kipkeew F., Kirsch M., Klein D., Wuelling M., Winterhager E., and Gellhaus A. (2016).  
562 CCN1 (CYR61) and CCN3 (NOV) signaling drives human trophoblast cells into  
563 senescence and stimulates migration properties. *Cell Adhesion and Migration.*  
564 doi:10.1080/19336918.2016.1139265
- 565 Klein C. (2016). Novel equine conceptus-endometrial interactions on Day 16 of pregnancy  
566 based on RNA sequencing. *Reprod. Fertil. Dev.* doi:10.1071/RD14489
- 567 Kusama K., Bai R., Sakurai T., Bai H., Ideta A., Aoyagi Y., and Imakawa K. (2016). A

- 568 transcriptional cofactor YAP regulates IFNT expression via transcription factor TEAD in  
569 bovine conceptuses. *Domest. Anim. Endocrinol.* **57**, 21–30.  
570 doi:10.1016/j.domaniend.2016.05.002
- 571 Lacetera N., Bernabucci U., Ronchi B., and Nardone A. (2001). Effects of subclinical  
572 pregnancy toxemia on immune responses in sheep. *Am. J. Vet. Res.*  
573 doi:10.2460/ajvr.2001.62.1020
- 574 Leroy J. L. M. R., Opsomer G., Van Soom A., Goovaerts I. G. F., and Bols P. E. J. (2008).  
575 Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part  
576 I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the  
577 reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in*  
578 *Domestic Animals*. doi:10.1111/j.1439-0531.2007.00960.x
- 579 Liu S., Chang H.-M., Yi Y., Yao Y.-Q., and Leung P. C. K. (2019). SMAD-dependent  
580 signaling mediates morphogenetic protein 6-induced stimulation of connective tissue  
581 growth factor in luteinized human granulosa cells†. *Biol. Reprod.* **101**, 445–456.  
582 doi:10.1093/biolre/ioz108
- 583 Lv X., He C., Huang C., Wang H., Hua G., Wang Z., Zhou J., Chen X., Ma B., Timm B. K.,  
584 Maclin V., Dong J., Rueda B. R., Davis J. S., and Wang C. (2019). Timely expression  
585 and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development.  
586 *FASEB J.* **33**, 10049–10064. doi:10.1096/fj.201900179RR
- 587 Mann G. E., and Lamming G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine  
588 environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in  
589 cows. *Reproduction*. doi:10.1530/rep.0.1210175
- 590 Martinez-Ros P., Rios-Abellan A., and Gonzalez-Bulnes A. (2019). Influence of  
591 progesterone-treatment length and eCG administration on appearance of estrus behavior,  
592 ovulatory success and fertility in sheep. *Animals*. doi:10.3390/ani9010009

- 593 Meidan R., Milvae R. A., Weiss S., Levy N., and Friedman A. (1999). Intraovarian regulation  
594 of luteolysis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*.  
595 doi:10.1530/biosciproc.4.017
- 596 Meng Z., Moroishi T., and Guan K. L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation.  
597 *Genes Dev.* **30**, 1–17. doi:10.1101/gad.274027.115
- 598 Nagashima T., Kim J., Li Q., Lydon J. P., de Mayo F. J., Lyons K. M., and Matzuk M. M.  
599 (2011). Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and  
600 ovulation. *Mol. Endocrinol.* doi:10.1210/me.2011-1045
- 601 Oetzel G. R. (2007). Herd-level ketosis: diagnosis and risk factors. *Preconference Semin. 7C*  
602 *Dairy Herd Probl. Investig. Strateg. Transit. Cow Troubl.* 67–91.
- 603 Oliveira J. F., Henkes L. E., Ashley R. L., Purcell S. H., Smirnova N. P., Veeramachaneni D.  
604 N. R., Anthony R. V., and Hansen T. R. (2008). Expression of interferon (IFN)-  
605 stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the  
606 consequence of endocrine IFN- $\tau$  release from the uterine vein. *Endocrinology* **149**,  
607 1252–1259. doi:10.1210/en.2007-0863
- 608 Ospina P. A., Nydam D. V., Stokol T., and Overton T. R. (2010). Associations of elevated  
609 nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations with early lactation  
610 reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the  
611 northeastern United States. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.2009-2852
- 612 Pan D. (2007). Hippo signaling in organ size control. *Genes and Development*.  
613 doi:10.1101/gad.1536007
- 614 Pan D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*.  
615 doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011
- 616 Panousis N., Brozos C., Karagiannis I., Giadinis N. D., Lafi S., and Kritsepi-Konstantinou M.  
617 (2012). Evaluation of Precision Xceed® meter for on-site monitoring of blood  $\beta$ -

- 618 hydroxybutyric acid and glucose concentrations in dairy sheep. *Res. Vet. Sci.*  
619 doi:10.1016/j.rvsc.2011.06.019
- 620 Parr R. A., Davis I. F., Miles M. A., and Squires T. J. (1993). Liver blood flow and metabolic  
621 clearance rate of progesterone in sheep. *Res. Vet. Sci.* doi:10.1016/0034-5288(93)90100-  
622 T
- 623 Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-  
624 PCR. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/29.9.e45
- 625 Plewes M. R., Hou X., Zhang P., Liang A., Hua G., Wood J. R., Cupp A. S., Lv X., Wang C.,  
626 and Davis J. S. (2019). Yes-associated protein 1 is required for proliferation and function  
627 of bovine granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* **101**, 1001–1017.  
628 doi:10.1093/biolre/ioz139
- 629 Puchalska P., and Crawford P. A. (2019). Multi-dimensional roles of ketone bodies. *Physiol.*  
630 *Behav.* **176**, 139–148. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
- 631 Ribeiro E. S., Lima F. S., Greco L. F., Bisinotto R. S., Monteiro A. P. A., Favoreto M., Ayres  
632 H., Marsola R. S., Martinez N., Thatcher W. W., and Santos J. E. P. (2013). Prevalence  
633 of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows  
634 supplemented with concentrates. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.2012-6335
- 635 Saha B., Ganguly A., Home P., Bhattacharya B., Ray S., Ghosh A., Karim Rumi M. A.,  
636 Marsh C., French V. A., Gunewardena S., and Paul S. (2020). TEAD4 ensures  
637 postimplantation development by promoting trophoblast self-renewal: An implication in  
638 early human pregnancy loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 17864–17875.  
639 doi:10.1073/pnas.2002449117
- 640 Santos J. E., Bisinotto R. S., Ribeiro E. S., Lima F. S., Greco L. F., Staples C. R., and  
641 Thatcher W. W. (2010). Applying nutrition and physiology to improve reproduction in  
642 dairy cattle. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* doi:10.7313/upo9781907284991.030

- 643 Sartori R., and Guardieiro M. M. (2010). Fatores nutricionais associados à reprodução da  
644 fêmea bovina. *Rev. Bras. Zootec.* doi:10.1590/S1516-35982010001300047
- 645 Satterfield M. C., Song G., Kochan K. J., Riggs P. K., Simmons R. M., Elsik C. G., Adelson  
646 D. L., Bazer F. W., Zhou H., and Spencer T. E. (2009). Discovery of candidate genes and  
647 pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and conceptus  
648 elongation. *Physiol. Genomics* **39**, 85–99. doi:10.1152/physiolgenomics.00001.2009
- 649 Van Saun R. J. (2000). Pregnancy toxemia in a flock of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*  
650 doi:10.2460/javma.2000.217.1536
- 651 Sawyer H. R., Niswender K. D., Braden T. D., and Niswender G. D. (1990). Nuclear changes  
652 in ovine luteal cells in response to PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . *Domest. Anim. Endocrinol.*  
653 doi:10.1016/0739-7240(90)90029-Y
- 654 Schlumbohm C., and Harmeyer J. (2008). Twin-pregnancy increases susceptibility of ewes to  
655 hypoglycaemic stress and pregnancy toxemia. *Res. Vet. Sci.*  
656 doi:10.1016/j.rvsc.2007.05.001
- 657 Spencer T. E., and Bazer F. W. (1996). Ovine interferon tau suppresses transcription of the  
658 estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology*  
659 **137**, 1144–1147. doi:10.1210/endo.137.3.8603586
- 660 Spencer T. E., Burghardt R. C., Johnson G. A., and Bazer F. W. (2004). Conceptus signals for  
661 establishment and maintenance of pregnancy. In ‘Animal Reproduction Science’,  
662 doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.014
- 663 Strakova Z., Kruss S., Morris K., and Reed J. (2010). Members of the Hippo Pathway Are  
664 Regulated in the Uterus During the Menstrual Cycle. *Biol. Reprod.* **83**, 363–363.  
665 doi:10.1093/biolreprod/83.s1.363
- 666 Surveyor G. A., Wilson A. K., and Brigstock D. R. (1998). Localization of connective tissue  
667 growth factor during the period of embryo implantation in the mouse. *Biol. Reprod.* **59**,



- 668 1207–1213. doi:10.1095/biolreprod59.5.1207
- 669 Thatcher, W. W., Meyer, M. D., & Danet-Desnoyers G. (1995). Maternal recognition of  
670 pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* **49**, 15–28.
- 671 Työppönen J., and Kauppinen K. (1980). The stability and automatic determination of ketone  
672 bodies in blood samples taken in field conditions. *Acta Vet. Scand.* **21**, 55–61.  
673 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7386330>
- 674 Vassilev A., Kaneko K. J., Shu H., Zhao Y., and DePamphilis M. L. (2001). TEAD/TEF  
675 transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated  
676 protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.888601
- 677 Walsh R. B., Walton J. S., Kelton D. F., LeBlanc S. J., Leslie K. E., and Duffield T. F.  
678 (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance  
679 of postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.2006-560
- 680 Wandji S. A., Gadsby J. E., Barber J. A., and Hammond J. M. (2000). Messenger ribonucleic  
681 acids for mac25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated  
682 during folliculogenesis and early luteogenesis. *Endocrinology* **141**, 2648–2657.  
683 doi:10.1210/endo.141.7.7576
- 684 White L. M., Keisler D. H., Dailey R. A., and Inskeep E. K. (1987). Characterization of ovine  
685 follicles destined to form subfunctional corpora lutea. *J. Anim. Sci.*  
686 doi:10.2527/jas1987.6561595x
- 687 Winterhager E., and Gellhaus A. (2014). The role of the CCN family of proteins in female  
688 reproduction. *Cellular and Molecular Life Sciences.* doi:10.1007/s00018-014-1556-9
- 689 Xie D., Miller C. W., O’Kelly J., Nakachi K., Sakashita A., Said J. W., Gornbein J., and  
690 Koeffler H. P. (2001). Breast cancer: Cyr61 is overexpressed, estrogen-inducible, and  
691 associated with more advanced disease. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M009755200
- 692 Yang R., Chen Y., and Chen D. (2018). Biological unctons and role of CCN1/Cyr61 in

- 693 embryogenesis and tumorigenesis in the female reproductive system (Review). *Mol.*  
694 *Med. Rep.* **17**, 3–10. doi:10.3892/mmr.2017.7880
- 695 Yu F. X., and Guan K. L. (2013). The Hippo pathway: Regulators and regulations. *Genes and*  
696 *Development* **27**, 355–371. doi:10.1101/gad.210773.112
- 697 Yu F. X., Zhao B., and Guan K. L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue  
698 Homeostasis, and Cancer. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2015.10.044
- 699 Zhang T., Guo S., Zhou H., Wu Z., Liu J., Qiu C., and Deng G. (2021). Endometrial  
700 extracellular matrix rigidity and IFN $\tau$  ensure the establishment of early pregnancy  
701 through activation of YAP. *Cell Prolif.* doi:10.1111/cpr.12976
- 702 Zhang B., Tsang P. C. W., Pate J. L., and Moses M. A. (2011). A role for cysteine-rich 61 in  
703 the angiogenic switch during the estrous cycle in cows: Regulation by prostaglandin F  
704  $2\alpha$ . *Biol. Reprod.* **85**, 261–268. doi:10.1095/biolreprod.110.086645
- 705 Zheng J., Johnson M. L., Redmer D. A., and Reynolds L. P. (1996). Estrogen and  
706 progesterone receptors, cell proliferation, and c-fos expression in the ovine uterus during  
707 early pregnancy. *Endocrinology*. doi:10.1210/endo.137.1.8536633
- 708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717

718 Table 1. Primers for quantitative real-time PCR analysis.

<b>Target</b>	<b>Accession number</b>	<b>Primer sequence</b>
<i>GAPDH</i>	NM_001034034.2	F: TGACCCCTTCATTGACCTTC R: CGTTCTCTGCCTTGACTGTG
<i>CTGF</i>	NM_174030.2	F: AGCTGAGCGAGTTGTGTACC R: TCCGAAAATGTAGGGGGGCAC
<i>YAP1</i>	XM_024975708.1	F: TCCTTTGAGATCCCTGACGATG R: TGACGTTTCATCTGGGAGAGC
<i>CYR61</i>	NM_001034340.2	F: GGCTCCCCGTTTTGGAATG R: TCATTGGTAACGCGTGTGGA
<i>BIRC5</i>	NM_001001855.3	F: CTGAGAACGAGCCCGACTTG R: ATGTTCTTCTATAGGGTCGTCATCT
<i>TEAD4</i>	XM_010805630.3	F: ATGTCGTCCGCCCAGATCAT R: AGGTTTCACATCATGGGACGTT
<i>3βHSD</i>	NC_040252.1	R: TCTCTGCAGTACTGGCTTGC F: GTCACTAGGTGGCGGTTGAA
<i>ISG15</i>	NM_001009735.1	F: GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT R: ACCTCCGTGCTGTCAAGGT

719 Abbreviations: F: Forward; R: Reverse.

720

721

722

723

724

725 Figure 1: Relative mRNA expression of Interferon-stimulated gene (*ISG15*) on ovine luteal  
726 and endometrium from ipsi- and contralateral horn to corpus luteum and corpus luteum.  
727 Endometrial ipsilateral (A: *ISG15*), contralateral horn (B: *ISG15*), and corpus luteum (C:  
728 *ISG15*) in all groups (NP; P; FW; SW). Bars represent the group mean  $\pm$  SEM. Asterisk  
729 represents contrast between groups ( $P < 0,05$ ). Different letters indicate statistical significance  
730 among groups ( $P < 0.05$ ).

731

732 Figure 2: Relative mRNA expression of genes associated with Hippo pathway on ovine  
733 endometrium. mRNA expression of endometrium from ipsilateral horn (A: *YAP1*; C: *TEAD4*;  
734 E: *CTGF*; G: *CYR61*; I: *BIRC5*), and contralateral horn (B: *YAP1*; D: *TEAD4*; F: *CTGF*; H:  
735 *CYR61*; J: *BIRC5*) in all groups (NP; P; FW; SW). Bars represent the group mean  $\pm$  SEM.  
736 Asterisk represents contrast between groups ( $P < 0,05$ ). Different letters indicate significance  
737 among groups ( $P < 0.05$ ).

738

739 Figure 3: Relative mRNA expression of genes associated with Hippo pathway. mRNA  
740 expression (A: *YAP1*; B: *TEAD4*; C: *CTGF*; D: *CYR61* and E: *BIRC5*) on ovine luteal cells.  
741 Bars represent the group mean  $\pm$  SEM. Asterisk represents contrast between groups ( $P <$   
742  $0,05$ ). Different letters indicate significance among  
743 groups ( $P < 0.05$ ).

744

745 Figure 4: Relative mRNA expression for *3 $\beta$ HSD* in the ewes luteal cells. *3 $\beta$ HSD* mRNA  
746 relative expression in the ewes luteal cells in each group (NP; P; FW; SW). Bars represent the  
747 group mean  $\pm$  SEM. Different letters indicate significance among groups ( $P < 0.05$ ).

748

749 Figure 5: Progesterone concentration (ng/mL) on blood serum on Day 16. Bars represented  
750 the group mean  $\pm$  SEM. Different letters indicate statistical significance among groups ( $P <$   
751 0,05).

752

753 Figure 6: Localization of Total YAP and Phospho-YAP (Ser127) and TAZ in luteal bovine  
754 cells. (A) CL negative control with no primary antibody. H&E 40X. (B) Total YAP signal is  
755 present throughout the corpus luteum, mainly in the nucleus and cytoplasm. 20 and 40X. (C)  
756 Phospho-YAP signal was weak. Sometimes detected predominantly in the nucleus of luteal  
757 cells.

758

Figure 1: Relative mRNA expression of Interferon-stimulated gene (*ISG15*) on ovine luteal and endometrium from ipsi- and contralateral horn to corpus luteum and corpus luteum.

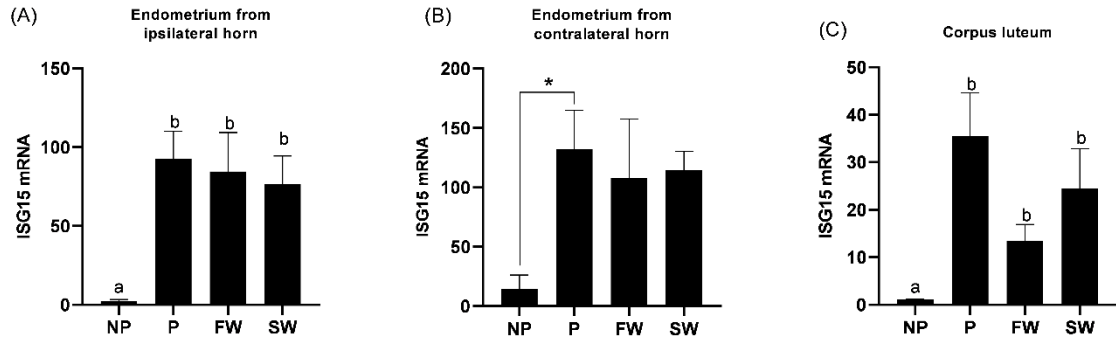


Figure 2: Relative mRNA expression of genes associated with Hippo pathway on ovine endometrium

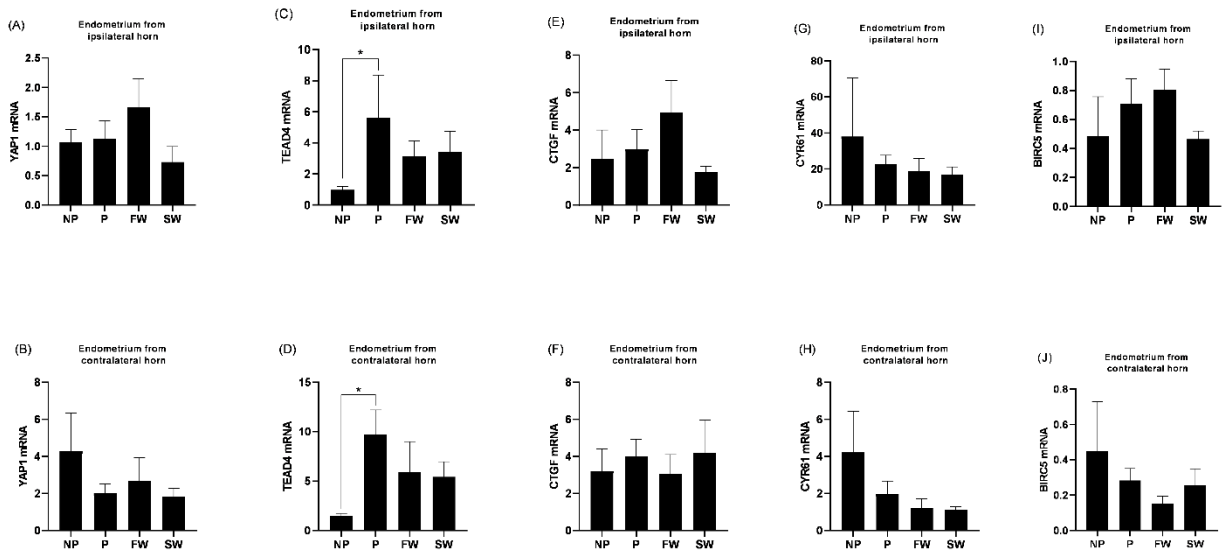


Figure 3: Relative mRNA expression of genes associated with Hippo pathway on corpus luteum.

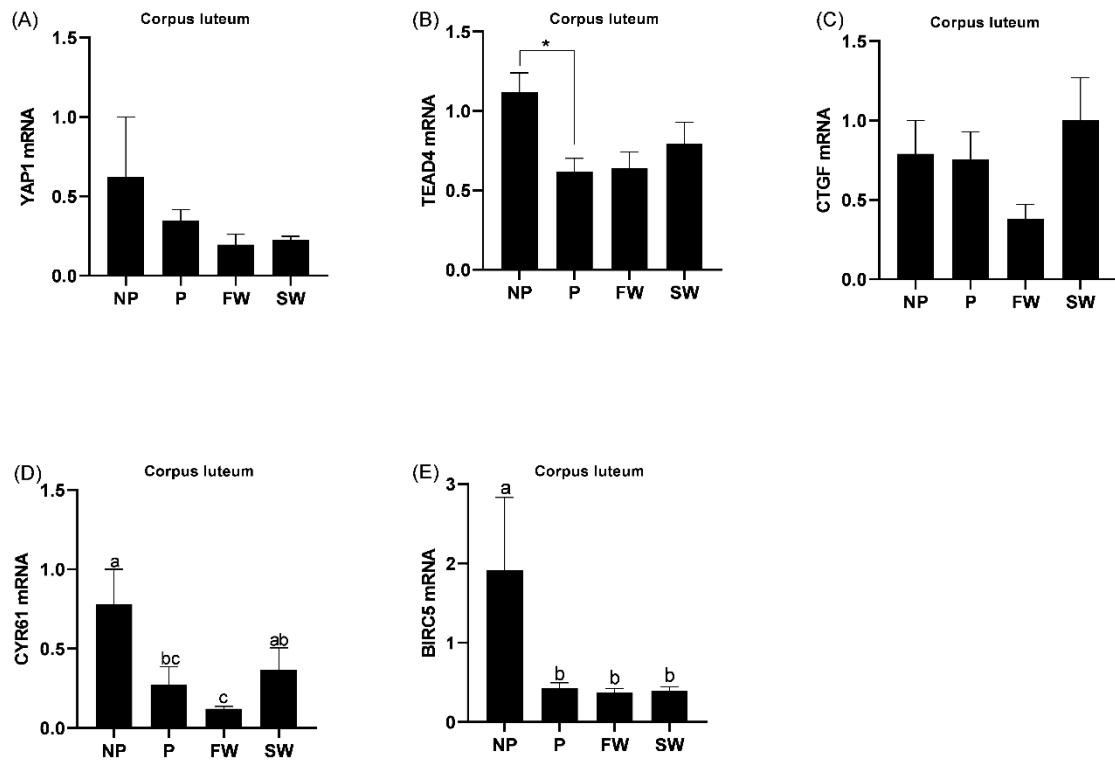


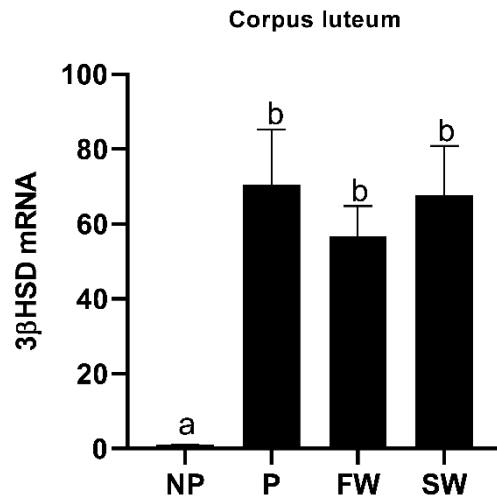
Figure 4 - Relative mRNA expression for *3βHSD* in the ewes luteal cells.

Figure 5 - Progesterone concentration (ng/mL) on blood serum on Day 16.

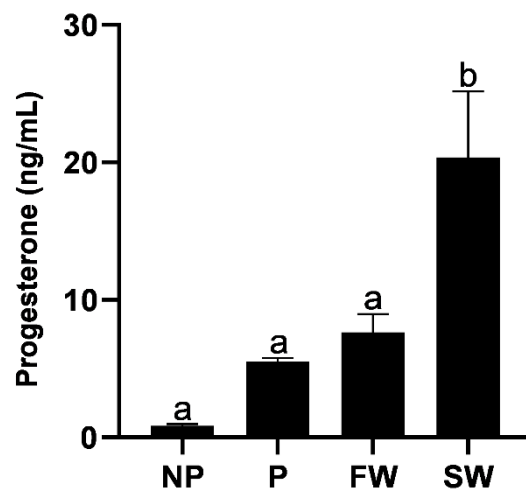
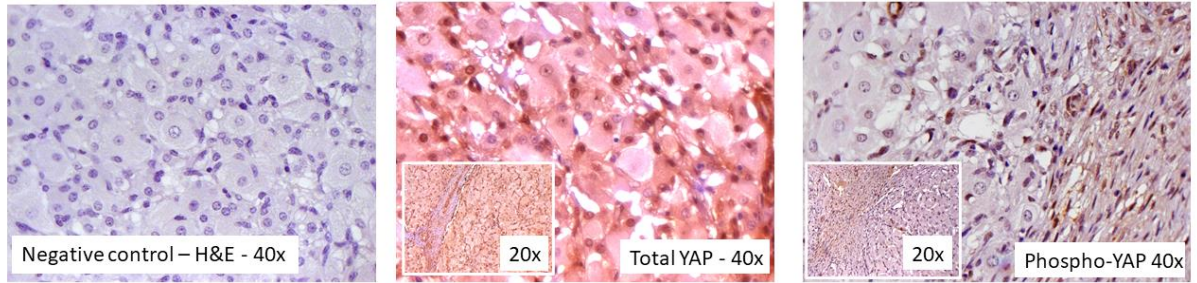




Figure 6 - Localization of Total YAP and Phospho-YAP (Ser127) and TAZ in luteal cells.



#### 4 CONCLUSÃO

Nosso projeto experimental pode ser usado para estudar BEN ou hipercetonemia e seus efeitos no início da gestação de ruminantes. É importante compreender os processos fisiológicos durante o início da gravidez, como o reconhecimento materno da gestação e sua sinalização no endométrio e corpo lúteo. Compreender a participação da via de sinalização Hippo no endométrio e corpo lúteo, bem como, durante a produção de IFNT pelo embrião permite compreender os mecanismos que podem estar envolvidos na manutenção da gestação e na produção de progesterona, contribuindo para a redução das perdas embrionárias precoces. Nossos resultados demonstram que o BEN induzido na primeira ou segunda semana de desenvolvimento embrionário não altera a via de sinalização Hippo no endométrio e CL durante a gestação. O estresse metabólico tem uma grande influência na concentração circulante de progesterona. Além disso, a via de sinalização Hippo parece estar inativa no endométrio durante o início da gestação, devido à alta proliferação endometrial durante o Dia 17. No entanto, no corpo lúteo a via de sinalização Hippo é inativa durante o ciclo estral, provavelmente devido à apoptose, enquanto que em ovelhas gestantes, a via de sinalização Hippo está ativa no CL, o que sugere que a síntese de P4 pode ser independente da via de sinalização Hippo.

## REFERÊNCIAS

- ABECIA, J. A. et al. The effect of undernutrition on the establishment of pregnancy in the ewe. **Reproduction Nutrition Development**, 7 jul. 2006. v. 46, n. 4, p. 367–378. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/rnd:2006018>>.
- ABECIA, J. A. A.; FORCADA, F.; LOZANO, J. M. M. A preliminary report on the effect of dietary energy on prostaglandin f2 $\alpha$  production in vitro, interferon-tau synthesis by the conceptus, endometrial progesterone concentration on days 9 and 15 of pregnancy and associated rates of embryo wastage in ewes. **Theriogenology**, nov. 1999. v. 52, n. 7, p. 1203–1213. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X99002125>>.
- AN, S. Y. et al. Estradiol-17 $\beta$  regulates proliferation and apoptosis of sheep endometrial epithelial cells by regulating the relative abundance of YAP1. **Animal Reproduction Science**, 2020.
- ANTONIAZZI, A. Q. et al. Endocrine Delivery of Interferon Tau Protects the Corpus Luteum from Prostaglandin F2 Alpha-Induced Luteolysis in Ewes. **Biology of Reproduction**, jun. 2013. v. 88, n. 6, p. 144–144.
- ANTONIAZZI, Alfredo Quites et al. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, 2011. v. 41, n. 1, p. 176–185.
- AUSTIN, Kathy J. et al. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, 1996. v. 54, n. 3, p. 600–606.
- \_\_\_\_\_ et al. Interferon-stimulated gene-15 (Isg15) expression is up-regulated in the mouse uterus in response to the implanting conceptus. **Endocrinology**, 2003.
- BALL, D. K. et al. **Establishment of a recombinant expression system for connective tissue growth factor (CTGF) that models CTGF processing in utero. Reproduction.** Journals of Reproduction and Fertility Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12578541/>>. Acesso em: 21 jan. 2021.
- BEBINGTON, C.; DOHERTY, F. J.; FLEMING, S. D. Ubiquitin cross-reactive protein gene expression is increased in decidualized endometrial stromal cells at the initiation of pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, 1999.
- BERGMAN, E. N. Hyperketonemia-Ketogenesis and Ketone Body Metabolism. **Journal of Dairy Science**, 1971.
- BINELLI, M. et al. Bovine interferon- $\tau$  stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. [S.l.]: [s.n.], 2001.
- BOOPATHY, G. T. K.; HONG, W. Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 2019. v. 7, n. April, p. 1–12.
- BOTT, Rebecca C. et al. Uterine Vein Infusion of Interferon Tau (IFNT) Extends Luteal Life Span in Ewes1. **Biology of Reproduction**, 2009. v. 82, n. 4, p. 725–735.
- BROOKS, K.; SPENCER, Thomas E. Biological roles of interferon tau (IFNT) and type I IFN receptors in elongation of the ovine conceptus. **Biology of Reproduction**, 2015.
- BRUNNER, N. et al. Prevalence of subclinical ketosis and production diseases in dairy cows

in Central and South America, Africa, Asia, Australia, New Zealand, and Eastern Europe. **Translational Animal Science**, 2019.

CAIXETA, L. S. et al. Association between subclinical hypocalcemia in the first 3 days of lactation and reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, 2017.

CALDEIRA, R. M. Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 2005.

CHENG, J.-C. et al. Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression and PGE2 production in human granulosa cells through a S1P1/3-mediated YAP signaling. **Cellular Signalling**, 2016. v. 28, n. 6, p. 643–651. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656816300602>>.

CHENG, Y. et al. Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. **FASEB Journal**, 1 jun. 2015. v. 29, n. 6, p. 2423–2430.

DAVID BAIRD, G. Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. **Journal of Dairy Science**, 1982.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, 2001. v. 121, n. 1, p. 41–49.

DESMET, K. L. J. et al. Exposure of bovine oocytes and embryos to elevated non-esterified fatty acid concentrations: Integration of epigenetic and transcriptomic signatures in resultant blastocysts. **BMC Genomics**, 2016.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, 2008.

\_\_\_\_\_; MURPHY, J. J.; SREENAN, J. M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal Reproduction Science**, 2006.

DIXON, A. B. et al. Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. **Journal of Animal Science**, 2007.

DONG, J. et al. Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in Drosophila and Mammals. **Cell**, 2007.

DRACKLEY, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? **Journal of Dairy Science**, 1999.

EALY, Alan D.; YANG, Q. E. **Control of interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. American Journal of Reproductive Immunology.**

FEIJÓ, J. O. et al. Prepartum administration of recombinant bovine somatotropin (rBST) on adaptation to subclinical ketosis of the ewes and performance of the lambs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2015.

FITZPATRICK, S. L.; RICHARDS, Joanne S. Regulation of the rat aromatase gene in ovarian granulosa cells and R2C Leydig cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 1993.

FU, D. et al. YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. **Endocrine-Related Cancer**, abr. 2014. v. 21, n. 2, p. 297–310. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24389730/>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

GARNSWORTHY, P. C. et al. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function. **Journal of Dairy Science**, 2008.

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**, 2007.

GODKIN, J. D. et al. Proteins released by cultured Day 15-16 conceptuses prolong luteal maintenance when introduced into the uterine lumen of cyclic ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1984. v. 71, n. 1, p. 57–64.

\_\_\_\_\_; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. **Endocrinology**, 1984. v. 114, n. 1, p. 120–130.

GUAN, F.-X. Y. And K.-L. The Hippo pathway: regulators and regulations. **GENES & DEVELOPMENT**, 2013. v. 27, n. 2012, p. 355–371.

GUERRANT, W. et al. Yap mediates tumorigenesis in neurofibromatosis type 2 by promoting cell survival and proliferation through a COX-2-EGFR signaling axis. **Cancer Research**, 2016.

GUILLOMOT, M. **Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. Journal of reproduction and fertility. Supplement.**

HANSEN, T. R. et al. **Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. Journal of reproduction and fertility. Supplement.**

HANSEN, Thomas R.; SINEDINO, L. D. P. P.; SPENCER, Thomas E. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). **Reproduction**, 2017. v. 154, n. 5, p. F45–F59.

HARLOW, C. R. et al. FSH and TGF- $\beta$  superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in Vitro and in Vivo. **Endocrinology**, 2002.

HEATH, E. et al. Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the Nov (Ccn3) gene. **BMC Developmental Biology**, 2008.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, 2000.

HOECK, V. VAN et al. Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: Mechanistic insights. **Reproduction**, 2013.

HOECK, Veerle VAN et al. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. **PLoS ONE**, 2011.

HOSSAIN, Z. et al. Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of Wwtr1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2007.

HSUEH, A. J. W. et al. Intraovarian control of early folliculogenesis. O desenvolvimento do folículo pré-antral e antral é contido pela inibição da via de sinalização Hippo. Assim, CNPs secretados por folículos em crescimento são capazes de estimular o crescimento dos folículos pré-antrais e antrais. Quando acontece o rompimento da via, por ovulação Vp bloqueia a proteína, não o mRNA. Como que VP age na yap?? O que são fatores de transcrição Peptídeos natriuréticos c Hormônios antimullerianos Ver via no fígado. Veterporfin rompe a interação do

yap: **Endocrine Reviews**, 2015. v. 36, n. 1, p. 1–24.

IMAKAWA, Kazuhiko et al. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. **Nature**, 1987.

\_\_\_\_\_ et al. Temporal expression of type I interferon receptor in the peri-implantation ovine extra-embryonic membranes: Demonstration that human IFN $\alpha$  can bind to this receptor. **Endocrine Journal**, 2002.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. [S.l.]: Animal, 2013. V. 7, p. 112–122. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23031687/>>. Acesso em: 17 jan. 2021.

JOHNSON, Greg A. et al. Expression of the Interferon Tau Inducible Ubiquitin Cross-Reactive Protein in the Ovine Uterus1. **Biology of Reproduction**, 1 jul. 1999. v. 61, n. 1, p. 312–318. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod61.1.312>>.

\_\_\_\_\_ et al. Effects of the Estrous Cycle, Pregnancy, and Interferon Tau on 2',5'-Oligoadenylate Synthetase Expression in the Ovine Uterus1. **Biology of Reproduction**, 1 maio. 2001. v. 64, n. 5, p. 1392–1399. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod64.5.1392>>.

JUSTICE, R. W. et al. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes and Development**, 1995.

KAULFUSS, K. H. et al. In vivo diagnosis of embryo mortality in sheep by real-time ultrasound. **Small Ruminant Research**, 1997.

KAWASHIMA, I.; KAWAMURA, K. Regulation of follicle growth through hormonal factors and mechanical cues mediated by Hippo signaling pathway. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, 2018. v. 64, n. 1, p. 3–11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1411990>>.

KERBLER, T. L. et al. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, 1997.

KUSAMA, K. et al. A transcriptional cofactor YAP regulates IFNT expression via transcription factor TEAD in bovine conceptuses. **Domestic Animal Endocrinology**, 2016. v. 57, p. 21–30. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2016.05.002>>.

LACETERA, N. et al. Effects of subclinical pregnancy toxemia on immune responses in sheep. **American Journal of Veterinary Research**, 2001.

LAI, D. et al. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. **Cancer Research**, 2011.

LEROY, J. L.M.R.; VANHOLDER, T.; et al. Nutrient Prioritization in Dairy Cows Early Postpartum: Mismatch Between Metabolism and Fertility? **Reproduction in Domestic Animals**, 2008.

\_\_\_\_\_; OPSOMER, G.; et al. **Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-**

**yielding dairy cows. Reproduction in Domestic Animals.**

LI, T. et al. Identification of YAP1 as a novel susceptibility gene for polycystic ovary syndrome. **Journal of Medical Genetics**, 2012.

LIN, M. et al. Yes-associated protein mediates angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell phenotypic modulation and hypertensive vascular remodelling. **Cell Proliferation**, 2018.

LOEB, K. R.; HAAS, A. L. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. **Journal of Biological Chemistry**, 1992.

LONERGAN, P.; FORDE, N.; SPENCER, T. E. Progesterone and conceptus-derived factors important for conceptus survival and growth. **Animal Reproduction**, 2016. v. 13, n. 3, p. 143–152.

LV, X. et al. Timely expression and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development. **The FASEB Journal**, 2019. v. 33, n. 9, p. 10049–10064.

MALIK, A. R.; LISZEWSKA, E.; JAWORSKI, J. **Matricellular proteins of the Cyr61/CTGF/NOV (CCN) family and the nervous system. Frontiers in Cellular Neuroscience.**

MARTAL, J. et al. Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. **Journal of reproduction and fertility**, 1979.

MAUVIEL, A.; NALLET-STAUB, F.; VARELAS, X. Integrating developmental signals: A Hippo in the (path)way. **Oncogene**, 2012. v. 31, n. 14, p. 1743–1756. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.363>>.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis : A Neuroendocrine-Mediated Event. 2009. p. 263–323.

MENG, Z.; MOROISHI, T.; GUAN, K. L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. **Genes and Development**, 2016. v. 30, n. 1, p. 1–17.

MOOR, R. M.; ROWSON, L. E. Local uterine mechanisms affecting luteal function in the sheep. **Journal of reproduction and fertility**, 1966.

MOUSSAD, E. E. D. A. et al. Temporal and spatial expression of connective tissue growth factor (CCN2; CTGF) and transforming growth factor  $\beta$  type 1 (TGF- $\beta$ 1) at the utero-placental interface during early pregnancy in the pig. **Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology**, 2002.

NAGASHIMA, T. et al. Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation. **Molecular Endocrinology**, 2011.

OETZEL, G. R. Herd-level ketosis: diagnosis and risk factors. **Preconference Seminar 7C :Dairy Herd Problem Investigation Strategies: Transition Cow Troubleshooting**, 2007. p. 67–91.

OLIVEIRA, João 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**, 2008. v. 149, n. 3, p. 1252–1259.

OSPINA, P. A. et al. Associations of elevated nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, 2010.

- OTT, Troy L. et al. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, 1998.
- PANOUSIS, N. et al. Evaluation of Precision Xceed® meter for on-site monitoring of blood  $\beta$ -hydroxybutyric acid and glucose concentrations in dairy sheep. **Research in Veterinary Science**, 2012.
- PLEWES, M. R. et al. Yes-associated protein 1 is required for proliferation and function of bovine granulosa cells in vitro. **Biology of Reproduction**, 2019. v. 101, n. 5, p. 1001–1017.
- REGAN, S. L. P. et al. **Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle-A changing view. Frontiers in Endocrinology.**
- RIBEIRO, E. S. et al. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. **Journal of Dairy Science**, 2013.
- RIVERA, F. et al. Effect of bovine somatotropin (500mg) administered at ten-day intervals on ovulatory responses, expression of estrus, and fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2010.
- ROBERTS, R. M. et al. Interferon Production by the Preimplantation Sheep Embryo. **Journal of Interferon Research**, 1989.
- \_\_\_\_\_ et al. **Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. Reproduction (Cambridge, England) Supplement.**
- ROBERTS, R. Michael; CROSS, James C.; LEAMAN, D. W. Interferons as hormones of pregnancy. **Endocrine Reviews**, 1992.
- ROBKER, R. L.; RICHARDS, J. S. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: A coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27(kip1). **Molecular Endocrinology**, 1998.
- ROMERO, Jared J. et al. Temporal release, paracrine and endocrine actions of ovine conceptus-Derived interferon-Tau during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, 2015.
- ROSENFELD, Cheryl S. et al. Expression of interferon receptor subunits, IFNAR1 and IFNAR2, in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, 2002.
- ROWSON, L. E.; MOOR, R. M. The influence of embryonic tissue homogenate infused into the uterus, on the life-span of the corpus luteum in the sheep. **Journal of reproduction and fertility**, 1967.
- SANTOS, J. E. et al. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, 2010.
- SASAKI, H. **Roles and regulations of Hippo signaling during preimplantation mouse development. Development Growth and Differentiation.**
- SAUN, R. J. VAN. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 2000.
- SCHALUE-FRANCIS, T. K. et al. Effect of injected bovine interferon- $\alpha$ (I)1 on oestrous cycle length and pregnancy success in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1991.



SCHLUMBOHM, C.; HARMEYER, J. Hyperketonemia impairs glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. **Journal of Dairy Science**, 2004.

SCHLUMBOHM, Christina; HARMEYER, J. Twin-pregnancy increases susceptibility of ewes to hypoglycaemic stress and pregnancy toxaemia. **Research in Veterinary Science**, 2008.

SINGH, M.; CHAUDHRY, P.; ASSELIN, E. **Bridging endometrial receptivity and implantation: Network of hormones, cytokines, and growth factors. Journal of Endocrinology.** J Endocrinol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21372150/>>. Acesso em: 16 jan. 2021.

SONG, Y. et al. Activated Hippo/Yes-associated protein pathway promotes cell proliferation and anti-apoptosis in endometrial stromal cells of endometriosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 1 abr. 2016. v. 101, n. 4, p. 1552–1561. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26977530/>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

SPENCER, T. E. et al. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. [S.l.]: [s.n.], 2004.

SPENCER, Thomas E. et al. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, 2007. v. 19, n. 1, p. 65. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD06102>>.

\_\_\_\_\_; BAZER, Fuller W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, mar. 1996. v. 137, n. 3, p. 1144–7.

STRAKOVA, Z. et al. Members of the Hippo Pathway Are Regulated in the Uterus During the Menstrual Cycle. **Biology of Reproduction**, 1 nov. 2010. v. 83, n. Suppl\_1, p. 363–363. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/2955746/Members>>. Acesso em: 16 jan. 2021.

SUN, T.; PEPLING, M. E.; DIAZ, F. J. Lats1 deletion causes increased germ cell apoptosis and follicular cysts in mouse ovaries. **Biology of Reproduction**, 2015.

TYÖPPÖNEN, J.; KAUPPINEN, K. The stability and automatic determination of ketone bodies in blood samples taken in field conditions. **Acta veterinaria Scandinavica**, 1980. v. 21, n. 1, p. 55–61. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7386330>>.

WALSH, R. B. et al. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2007.

WANG, C. et al. Transforming Growth Factor Alpha (TGF $\alpha$ ) Regulates Granulosa Cell Tumor (GCT) Cell Proliferation and Migration through Activation of Multiple Pathways. **PLoS ONE**, 2012.

WANG, X. L. et al. A potential autocrine role for interferon Tau in ovine trophectoderm. **Reproduction in Domestic Animals**, 2013. v. 48, n. 5, p. 819–825.

WILTBank, M. C. et al. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, jul. 2016. v. 86, n. 1, p. 239–253. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16300760>>.

XIANG, C. et al. Hippo signaling pathway reveals a spatio-temporal correlation with the size

of primordial follicle pool in mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 2015.

YU, F. X.; GUAN, K. L. **The Hippo pathway: Regulators and regulations. Genes and Development.**

\_\_\_\_\_; ZHAO, B.; GUAN, K. L. **Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. Cell.**

ZHANG, T. et al. Endometrial extracellular matrix rigidity and IFN $\tau$  ensure the establishment of early pregnancy through activation of YAP. **Cell Proliferation**, 4 jan. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.12976>>. Acesso em: 22 jan. 2021.

ZHAO, B. et al. **The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: An updated version. Genes and Development.**

ZHU, H. Y. et al. **Advanced Role of Hippo Signaling in Endometrial Fibrosis: Implications for Intrauterine Adhesion. Chinese Medical Journal. Medknow Publications.** Disponível em: <[pmc/articles/PMC5695061/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34111111/)>. Acesso em: 17 jan. 2021.