

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

Manuela Wolker Manta

**EXPRESSÃO DE *ISG15* EM LEUCÓCITOS DE OVELHAS
SUPLEMENTADAS COM PROGESTERONA NO ANESTRO
ESTACIONAL**

Santa Maria, RS

2020

Manuela Wolker Manta

**EXPRESSÃO DE *ISG15* EM LEUCÓCITOS DE OVELHAS SUPLEMENTADAS
COM PROGESTERONA NO ANESTRO ESTACIONAL**

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 **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Alfredo Quites Antoniazzi

Santa Maria, RS


2020

Manuela Wolker Manta

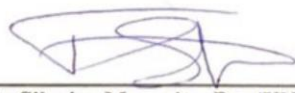
**EXPRESSÃO DE ISG15 EM LEUCÓCITOS DE OVELHAS
SUPLEMENTADAS COM PROGESTERONA NO ANESTRO ESTACIONAL**

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 **Mestre em Medicina Veterinária**.

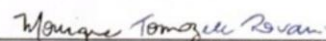
Aprovado em 20 de fevereiro de 2020:



Alfredo Quitas Antoniazzi, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Fernando Silveira Mesquita, Dr. (UNIPAMPA)



Monique Tomazzele Rovani, Dra. (UFRGS) - Videoconferência

Santa Maria, RS

2020.

Manta, Manuela

Expressão de ISG15 em leucócitos de ovelhas suplementadas com progesterona no anestro estacional / Manuela Manta.- 2020.

49 p.; 30 cm

Orientador: Alfredo Quites Antoniazzi Quites Antoniazzi

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Progesterona 2. Anestro Estacional 3. Interferon Tau 4. Ovelhas 5. ISG15 I. Quites Antoniazzi, Alfredo Quites Antoniazzi II. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pela vida e proteção diária.

Minha família, pelo exemplo de superação e garra. Meus pais, José Francisco e Sônia Regina, por serem tudo, alicerce e força nesta vida. Irmãos Sofia, Juana e Lucian pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos. Minha sobrinha Marina, por ter dado um novo sentido e estímulo à minha trajetória.

Meu companheiro João Francisco, pelo amor e compreensão durante este caminho. Pelas tantas trocas de conhecimento e vivências que me fazem crescer a cada dia, como profissional e pessoa.

Ao meu orientador, Professor Alfredo, por passar tranquilidade e confiança nos momentos de angústia e dúvidas. Ao Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal por todo o apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq, FAPERGS e FINEP por financiarem nossos estudos.

RESUMO

EXPRESSÃO DE *ISG15* EM LEUCÓCITOS DE OVELHAS SUPLEMENTADAS COM PROGESTERONA NO ANESTRO ESTACIONAL

AUTOR: Manuela Wolker Manta

ORIENTADOR: Alfredo Quites Antoniazzi

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão gênica de *ISG15* em leucócitos e progesterona sérica, nos dias 10 e 16 da gestação inicial de ovelhas suplementadas com progesterona. As ovelhas foram alocadas aleatoriamente em dois grupos: Grupo Controle (GC) e Grupo P4 (P4G) durante o período de anestro estacional e na estação reprodutiva. Os grupos foram submetidos a um protocolo de manipulação do ciclo estral. Nos dois períodos, o P4G recebeu uma dose de progesterona injetável no dia 3 após o acasalamento (25 mg), enquanto o GC recebeu o mesmo volume de veículo. A expressão do *ISG15* nos leucócitos no D10 não diferiu entre os grupos, P4G e GC ($p > 0,05$) no anestro e na estação reprodutiva. Por outro lado, no anestro a expressão de *ISG15* no dia 16 é maior no GC, quando comparada ao P4G ($p < 0,05$). Os resultados da expressão gênica de *ISG15* não mostraram diferenças entre os grupos nos dias 10 e 16 na estação reprodutiva. Durante o anestro, o P4G no dia 10 apresentou menores concentrações de progesterona sérica quando comparadas ao GC. No dia 16, a concentração sérica de progesterona diminuiu no P4G em relação ao GC. Durante a estação reprodutiva, a progesterona sérica no dia 10 não diferiu entre os grupos, P4G e GC ($p > 0,05$). Ao contrário, P4G apresentou maiores concentrações de progesterona circulante quando comparadas ao GC no dia 16. Os resultados indicam que a suplementação de progesterona no início da gestação em ovelhas no anestro estacional não é eficaz em melhorar a sinalização endócrina do reconhecimento materno da gestação além de diminuir a P4 sérica, no entanto, aumenta a P4 sérica durante a estação reprodutiva sem alterar a expressão relativa de *ISG15* nos leucócitos.

Palavras-chave: progesterona, ovelhas, gestação, *ISG15*, leucócitos.

ABSTRACT

***ISG15* GENE EXPRESSION IN LEUKOCYTES OF PROGESTERONE-SUPPLEMENTED EWES DURING NON-BREEDING SEASON**

AUTHOR: Manuela Wolker Manta

ADVISOR: Alfredo Quitas Antoniazzi

The aim of this study was to evaluate the effect of supplementation with exogenous progesterone on the expression of *ISG15* in leukocytes and concentration of serum progesterone, on days 10 and 16 of early pregnancy in ewes. The ewes were randomly allocated into two groups: Control Group (GC) and Group P4 (P4G), during seasonal anestrus period and breeding season. The groups were submitted to estrous cycle manipulation protocol. In both periods, P4G received a dose of injectable progesterone on day 3 after mating (25 mg), while the CG received the same vehicle volume. During the non-breeding season, the expression of *ISG15* in leukocytes at day 10 did not differ between the groups, P4G and GC ($p > 0.05$). On the other hand, the expression of *ISG15* on day 16 is higher in the CG, when compared to the P4G ($p < 0.05$). During breeding season, the results of *ISG15* gene expression did not show differences between groups on days 10 and 16. During non-breeding season, on day 10, the P4G showed lower concentrations of serum progesterone when compared to the CG. On day 16, serum progesterone concentration also decreased in P4G compared to CG. During the breeding season, serum progesterone at D10 did not differ between the groups, P4G and GC ($p > 0.05$). On the contrary, P4G showed higher concentrations of circulating progesterone when compared to GC on day 16. The results indicate that progesterone supplementation at the beginning of pregnancy in sheep in the seasonal anestrus is not effective in increasing endocrine signaling in maternal recognition of pregnancy or raising serum progesterone, however, it increases serum progesterone during the reproductive season without changing the relative expression of *ISG15* in leukocytes.

Keywords: progesterone, ewes, pregnancy, *ISG15*, leukocytes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figure 1.** Expression of *ISG15* in leukocytes during non-breeding season. **1A.** Expression of *ISG15* in leukocytes on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the non-breeding season. **1B.** Expression of *ISG15* in leukocytes on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the non-breeding season, only in pregnant ewes. Values represent the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$).....25
- Figure 2.** Expression of *ISG15* in leukocytes during breeding season. **2A.** Expression of *ISG15* in leukocytes on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the breeding season. **2B.** Expression of *ISG15* in leukocytes on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the breeding season only in pregnant ewes. Values represent the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$).....26
- Figure 3.** Concentration of serum progesterone during non-breeding season. **3A.** Concentration of progesterone on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the non-breeding season. **3B.** Concentration of progesterone on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the non-breeding season, only in pregnant ewes. Values represent the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$).....27
- Figure 4.** Concentration of serum progesterone during breeding season. **4A.** Concentration of progesterone on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the breeding season. **4B.** Concentration of progesterone on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the breeding season only in pregnant ewes. Values represent the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$)28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO.....	13
2.1.1 O Interferon tau.....	14
2.1.2 Genes Estimulados pelo Interferon (ISGs) e ISG15.....	15
2.1.3 A Progesterona no Reconhecimento Materno da Gestação.....	16
2.1.4 Suplementação com progesterona exógena.....	17
2.2 ANESTRO ESTACIONAL NOS OVINOS.....	18
3 CAPÍTULO 1.....	20
1 Introduction.....	23
2 Material and methods.....	24
2.1 Animals and Experimental design.....	24
2.2 Progesterone supplementation.....	24
2.3 Pregnancy diagnosis by ultrasound scanning.....	25
2.4 Blood sample and PBL isolation.....	25
2.6 RNA extraction.....	25
2.7 cDNA synthesis and Quantitative Polymerase Chain Reaction.....	26
2.8 Progesterone assay.....	27
2.9 Statistics analysis.....	27
3 Results.....	27
3.1 Pregnancy status during the non-breeding and breeding seasons.....	27
3.2 Concentration of serum progesterone during the non-breeding season.....	27
3.3 Concentration of serum progesterone during the breeding season.....	28
3.4 Relative expression levels of ISG15 mRNA during the non-breeding season.....	29
3.5 Relative expression levels of ISG15 mRNA during the breeding season.....	30
4 Discussion.....	31
5 Conclusions.....	33
6 References.....	35
7 CONCLUSÃO.....	40

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
----------------------------------	----

1 INTRODUÇÃO

Nos ruminantes, a interação entre estes fatores uterinos, ovarianos e embrionários caracterizam o período de reconhecimento materno da gestação, momento em que o embrião sinaliza sua presença no útero materno. A sinalização embrionária requer a liberação do Interferon tau (IFNT), proteína produzida pelas células do trofoblasto embrionário durante a gestação inicial (GODKIN et al., 1984). O IFNT atua via parácrina bloqueando os pulsos luteolíticos de Prostaglandina F₂ α (PGF) (BAZER et al., 1997), via endócrina nos tecidos extrauterinos (OLIVEIRA et al., 2008), além da via autócrina, estimulando a elongação embrionária (BROOKS & SPENCER, 2015).

A elongação é o período embrionário em que ocorre a maior produção de IFNT (ANTONIAZZI et al., 2011), envolvendo aumentos exponenciais no comprimento e no peso do trofoblasto (WALES & CUNEO, 1989). Para o estímulo da elongação embrionária é essencial a ação da progesterona (P4), hormônio produzido pelo corpo lúteo (LONERGAN, 2011). A P4 é o hormônio responsável pela manutenção da gestação nos ruminantes, sendo essencial para a sobrevivência do blastocisto já que induz a expressão de genes relacionados com o alongamento e a implantação embrionária (SATTFIELD et al., 2006). Dentre os vários fatores que interferem na comunicação materno-fetal, o principal hormônio que controla o processo é a P4 (MANN et al., 2003).

A mortalidade embrionária em estágio inicial de desenvolvimento, principalmente por falhas na sinalização durante o reconhecimento materno da gestação, é reconhecida como uma das maiores causas de perdas reprodutivas em ruminantes (MORRIS & DISKIN, 2008). O primeiro período crítico para as perdas embrionárias é a primeira semana após a fecundação, sendo que o período posterior do reconhecimento materno da gestação envolve cerca de 30% das perdas totais (WILTBANK et al., 2016). Uma causa da mortalidade embrionária precoce é a baixa concentração de P4 circulante durante o período do reconhecimento materno (RICKARD et al., 2017).

Perdas embrionárias causam diminuição da fertilidade (DIXON et al., 2007). O mecanismo envolvido com redução da fertilidade é de natureza multifatorial e inclui comprometimento da função folículo-ovário e produção de esteróides, interrupção da competência oocitária e desenvolvimento embrionário, atenuação da secreção de gonadotrofinas e comprometimento funcional da unidade útero-embrionária (ROTH, 2008). A atenuação da secreção das gonadotrofinas é uma das características do período de anestro estacional nas ovelhas (ROSA & BRYANT, 2003).

A mortalidade embrionária aliada a estacionalidade reprodutiva dos ovinos representam entraves à produção nesta espécie. Porém, os efeitos da sazonalidade reprodutiva podem ser minimizados ou revertidos através do uso estratégico de biotecnologias reprodutivas (BALDASSARRE & KARATZAS, 2004). Estas biotécnicas voltadas à necessidade de se prolongar a época de reprodução são fundamentais para aumentar a exploração do potencial produtivo dos ovinos.

Sabendo que o aumento da P4 sérica logo após a ovulação é benéfico para a manutenção da gestação e desenvolvimento do embrião, a hipótese deste trabalho é que a utilização da P4 logo após a cobertura melhora a sinalização embrionária através da expressão do *ISG15* em leucócitos. Para isto, os objetivos deste estudo foram demonstrar os efeitos da utilização da progesterona no 3º dia após a cobertura na expressão do *ISG15* em leucócitos e nos níveis de progesterona sérica durante a gestação inicial (dias 10 e 16) em duas estações distintas: o anestro estacional e na estação reprodutiva ovina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

O reconhecimento materno da gestação reflete as várias maneiras pelas quais a mãe responde à presença de um concepto dentro do seu trato reprodutivo (ROBERTS et al., 2003), ou ainda, como o período em que o concepto sinaliza sua presença no útero materno (ANTONIAZZI et al., 2011). Em ruminantes este processo requer o alongamento do embrião, fase essa em que ocorre a produção de IFNT (BAZER & THATCHER, 2017). Portanto, o embrião dentro do útero necessita produzir esta substância que prolonga direta ou indiretamente o tempo de vida do corpo lúteo, impedindo o retorno à ciclicidade do ovário e assim, mantendo a gestação (IMAKAWA et al., 1987). Assim, o IFNT é o fator crucial do reconhecimento materno da gestação nos ruminantes (ANTHONY et al., 1988).

Em ovinos, os embriões em estágio de mórula entram no útero ao redor dos dias 4 e 5 pós-concepção, evoluindo para blastocistos até o dia 6 (SPENCER et al., 2004a). Após a eclosão da zona pelúcida no dia 8, os blastocistos começam a alongar-se no dia 10 quando passam a secretar o IFNT, com pico de produção entre os dias 14 e 16, cessando a síntese por volta do dia 25 de gestação (SPENCER et al., 2004a). *In vitro*, a expressão do RNAm para IFNT inicia a partir do 4º dia de desenvolvimento embrionário (YAO et al., 2009). Estudo recente, demonstrou que embriões bovinos no dia 4, no estágio de 16 células, já expressam IFNT quando co-cultivados com células epiteliais do oviduto, sugerindo que o contato do embrião com o epitélio do oviduto estimula a síntese de IFNT (TALUKDER et al., 2018).

O IFNT é uma citocina, um interferon do tipo I, expresso pelas células mononucleares do trofoblasto embrionário que age de forma parácrina no epitélio luminal endometrial. O IFNT ao se ligar aos seus receptores nas células endometriais, forma o fator de transcrição que será translocado para o núcleo (BINELLI et al., 2001), causando a inibição dos receptores de estrógenos (ESR1) e ocitocina (OTR), evitando assim a liberação dos pulsos luteolíticos de PGF2 α (BAZER et al., 1992). Embora tenha ação sobre o OTR e ESR1, o IFNT não atua na expressão dos receptores de progesterona (PR) no endométrio (SPENCER & BAZER, 1995). Assim, a ação parácrina e antiluteolítica do IFNT é para impedir o aumento na expressão dos ESR1 epiteliais e OTR, mantendo assim a secreção de progesterona pelo corpo lúteo (CL) (FLEMING et al., 2001).

Em ovinos, a fonte de pulsos luteolíticos de PGF é o epitélio luminal e o epitélio glandular do endométrio, pois expressam os OTR e são os únicos tipos de células uterinas que expressam ciclooxigenase 2 (COX-2), uma enzima envolvida na síntese de prostaglandinas (CHARPIGNY et al., 1997). Com a inibição dos pulsos luteolíticos de PGF, o CL é mantido e sua produção de P4 estabilizada.

A estimulação da progesterona durante 8 a 10 dias suprime a expressão do gene PR no epitélio endometrial, sendo que a perda do PR no útero é concomitante com diminuições na glicoproteína de mucina 1 (MUC-1), um inibidor da implantação do blastocisto para permitir a continuidade da elongação (SPENCER & BAZER, 2002). Esta continuidade na elongação é necessária para a produção do IFNT e expressão de genes induzidos pela progesterona e estimulados por IFNT que dão suporte ao desenvolvimento do concepto (BAZER et al., 2012a). O nível de expressão do IFNT diminui acentuadamente à medida que o trofoblasto estabelece contato com as células epiteliais do endométrio materno, durante a implantação embrionária (HANSEN et al., 1988).

2.1.1 O Interferon tau

O IFNT é uma proteína composta por 172 aminoácidos presente somente em ruminantes, expressa no período da pré-implantação embrionária (ROBERTS et al., 2003). Esta proteína liga-se aos receptores de Interferon tipo I (IFNAR1 e IFNAR2) e induz sua resposta por meio da sinalização via JAK/STAT (BINELLI et al., 2001). Em ovinos, o efeito do IFNT é pleiomórfico, na medida em que exerce diversas funções no reconhecimento materno (SONG et al., 2008). Inicialmente, o IFNT parecia exercer uma ação somente parácrina no útero, preparando-o para a gestação e implantação embrionária (SHIRASUNA et al., 2015) até serem demonstradas as suas ações endócrinas (OLIVEIRA et al., 2008) e autócrinas (WANG et al., 2013).

Na via autócrina, foram detectados IFNT e transcritos de IFNAR1 no trofotoderma de ovelhas com 15 e 20 dias de gestação, estimulando a proliferação das células trofoblásticas (WANG et al., 2013). Sendo assim, os efeitos do IFNT via seus receptores no trofotoderma não são necessários para alongamento do embrião, mas podem influenciar a expressão do gene IFNT (BROOKS & SPENCER, 2015).

A ação parácrina do IFNT impede os pulsos luteolíticos da PGF, garantindo assim a continuidade da produção de progesterona pelo CL no ovário (SPENCER et al., 2007). Esta ação também foi confirmada pela presença de receptores de IFN tipo I no endométrio (ROSENFELD et al., 2002), com a função de induzir a expressão dos Genes Estimulados por Interferon (ISGs), que estão envolvidos na regulação da receptividade uterina ao conceito, além da sua elongação e implantação (HANSEN et al., 1999; BAZER et al., 2008; BAZER et al., 2010). A ação parácrina é evidenciada através da detecção de RNAm de ISGs no endométrio, mesmo antes da inibição dos ESR1 e OTR (ROMERO et al., 2015).

Já a ação endócrina do IFNT é descrita através da indução na expressão dos ISGs no útero, corpo lúteo, fígado e em células sanguíneas (OLIVEIRA et al., 2008). O IFNT é liberado do útero para a veia uterina para induzir ISGs no CL e atrasar a luteólise (BOTT et al., 2010), proporcionando uma resistência luteal à ação luteolítica da PGF (HENKES et al., 2009; ANTONIAZZI et al., 2013).

2.1.2 Genes Estimulados pelo Interferon (ISGs) e ISG15

Uma vez expressos, os IFN do tipo I são secretados e se ligam a seus receptores nas membranas de células desencadeando a ativação da via de sinalização JAK-STAT (SUBRAMANIAM et al., 2001). Nela, as proteínas Janus Quinase I (JAK1) e Tirosina Quinase 2 (TYK2) associadas aos receptores IFNR, fosforilam os fatores de transdução de sinal e de transcrição STAT1 e STAT2 que então migram para o núcleo e associam-se ao IRF9 formando um complexo chamado ISGF3 (Interferon Stimulated Gene Factor 3). Esse heterotrímero se liga a sequências consenso chamadas de ISRE (Interferon Stimulated Response Element) levando à transcrição de uma série de genes denominados ISGs (Interferon Stimulated Genes) (LEVY et al., 1986).

Durante a gestação inicial de ruminantes, os ISGs são expressos em resposta à secreção de IFNT pelo embrião (JOHNSON et al., 1999). Além de estarem envolvidos na regulação da receptividade uterina ao conceito, na sua elongação e implantação embrionária (HANSEN et al., 1999; SPENCER et al., 2008; BOTT et al., 2009; BOTT et al., 2010; HANSEN et al., 2010), os ISGs também tem um papel importante na degradação das proteínas uterinas citosólicas (receptores, enzimas e fatores de transcrição de genes reguladores) que são prejudiciais para a sobrevivência embrionária e fetal (JOHNSON et al., 1999). Durante o início da gestação, a primeira resposta à liberação de IFNT pelo conceito é a indução de ISGs, como por exemplo o ISG15 no endométrio (ROMERO et al., 2015). O ISG15 possui dois principais papéis: o de

proteína similar a ubiquitina (HAAS et al., 1987) que é capaz de se ligar a proteínas alvo regulando a sua função e o de proteína com efeito de citocina, uma vez que ela é secretada e capaz de ativar células do sistema imune (RECHT et al., 1991).

No dia 11 de gestação em ovelhas, os níveis de *ISG15* são baixos, elevando a expressão no dia 13 com aumento significativo até o dia 15 (JOYCE et al., 2005). Nos tecidos extrauterinos, como fígado e CL, o *ISG15* é expresso nos dias 14 e 15 de gestação (BOTT et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008; ANTONIAZZI et al., 2013). Foi demonstrada a presença de *ISG15* nos leucócitos do leite em vacas, evidenciando que a estimulação da expressão de ISGs pode ser observada simultaneamente nos diferentes tecidos, especificamente os leucócitos de sangue periférico (PBLs) (KOSE et al., 2014), sendo que os neutrófilos podem secretar o *ISG15* através dos seus grânulos (BOGUNOVIC et al., 2012). Sabe-se que a expressão de *ISG15* em PBLs é diretamente proporcional à expressão de IFNT no lúmen uterino (MATSUYAMA et al., 2012).

A P4 é permissiva à expressão dos ISGs, já que também estimula as células estromais com receptores de progesterona a expressar fator de crescimento de fibroblastos ou fator de crescimento de hepatócitos, que atuam através de seus respectivos receptores nos epitélios uterinos e trofotoderma para regular a expressão dos ISGs (SPENCER et al., 2007). Na maioria dos casos, a P4 induz e o IFNT estimula a expressão dos ISGs (BAZER et al., 2012b). A concentração média de progesterona plasmática e os níveis médios de RNAm de *ISG15* no sangue, são maiores em vacas gestantes do que em vacas não gestantes nos dias 17 a 25 de gestação, sugerindo que estas duas variáveis associadas podem indicar a função luteal e presença de um embrião viável (HAN et al., 2006). Assim, a expressão do *ISG15* pode ser considerada como um bom marcador molecular de resposta do IFNT e indicador de prenhez em vacas (SHIRASUNA et al., 2012).

2.1.3 A Progesterona no Reconhecimento Materno da Gestação

A P4 é um hormônio esteroide, principalmente secretado pelo corpo lúteo e placenta (NISWENDER et al., 1994) que atua no útero para estimular e manter as funções endometriais necessárias para o crescimento, implantação, placentação, desenvolvimento embrionário e fetal (SPENCER et al., 2004b).

A concentração periférica de P4 no início da gestação tem efeito significativo sobre a sobrevivência do embrião (MANN et al., 2003). Baixas concentrações de progesterona nos primeiros dias após a concepção (Dia 3-8) estão associadas a embriões bovinos menores no dia

16, que podem produzir quantidade insuficiente de IFNT, com menor efeito na supressão do mecanismo luteolítico (CARTER et al., 2008). Baixas concentrações de P4 nos primeiros dias de gestação culminam com a baixa sobrevivência embrionária e perda gestacional em ovelhas, com uma diminuição na proporção de três vezes na produção de IFNT (NEPHEW et al., 1991).

Em ovelhas não prenhes, a concentração sérica de progesterona inicia seu declínio em torno do dia 14, estando abaixo de 1,0 ng/ml já no dia 15, demonstrando que a regressão luteal ocorre nestes dias em ovelhas. Em contraste, nas ovelhas prenhes a concentração sérica de P4 encontra-se acima de 1,7ng/ml pós-concepção (BOSCOS et al., 2003). Através da avaliação das concentrações de progesterona no início da gestação em ovelhas, no período de primavera e outono, é possível avaliar se a ovulação ocorreu, se a perda embrionária ocorreu após o reconhecimento materno da gestação e ainda se ocorreu luteólise prematura. A concentração sérica de P4 também indica função do CL, na medida em que as concentrações circulantes são um reflexo da secreção luteal (DENICOLO et al., 2009).

2.1.4 Suplementação com progesterona exógena

Uma alternativa para o aumento imediato na concentração de progesterona sérica é a suplementação com progesterona exógena, podendo esta suplementação ser obtida por injeção de progesterona ou pela inserção de um dispositivo intravaginal (BELTMAN et al., 2009). Sabe-se que uma dose diária de 6 mg de progesterona exógena encurta a duração dos ciclos estrais em ovelhas vazias e acelera o desenvolvimento de blastocistos em ovelhas prenhes, indicando que concentrações crescentes de progesterona no plasma durante a formação do CL aumentam as secreções uterinas e a taxa de desenvolvimento do embrião (POPE et al., 1995). Igualmente, injeções exógenas de P4 36 horas pós-concepção acarretam em um aumento no tamanho de blastocisto no dia 9 e conferem o desenvolvimento precoce do concepto já filamentosos e em alongamento no dia 12 (SONG et al., 2009).

Em vacas, a suplementação com progesterona injetável não compromete o desenvolvimento do corpo lúteo que está se formando (PUGLIESI et al., 2014). A suplementação de P4 durante a elevação pós-ovulatória da P4 endógena melhora o desenvolvimento e a produção de IFNT pelo embrião, também em novilhas de corte e leite (MANN et al., 2006). Quando o aumento da P4 sérica ocorre do dia 3 ao 7 pós estro, há um aumento significativo do tamanho do concepto bovino (CARTER et al., 2008), confirmando a existência de uma correlação positiva entre a concentração de progesterona sérica e a síntese de

IFNT, o que sugere que o aumento das concentrações de progesterona é benéfico para o desenvolvimento embrionário (KERBLER et al., 1997). Por outro lado, a utilização de dispositivo intravaginal com progesterona afim de ressincronização de ovelhas após a primeira inseminação, a progesterona exógena diminui a concentração de progesterona sérica nas ovelhas tratadas, sem alterar as taxas de manutenção da gestação (MIRANDA et al., 2018).

2.2 ANESTRO ESTACIONAL NOS OVINOS

Uma das características reprodutivas mais marcantes da espécie ovina é a sazonalidade ou estacionalidade reprodutiva. A sazonalidade reprodutiva é caracterizada por mudanças comportamentais, endócrinas e ovulatória, dando origem a uma alternância anual entre dois períodos distintos: uma estação reprodutiva, caracterizada por ciclos estrais regulares (média de 17 dias) com manifestação de cio e ovulação, sendo o outro período de inatividade sexual, o anestro estacional ou contra estação reprodutiva (ROSA & BRYANT, 2003). O anestro é caracterizado por uma ausência quase total de ciclos. Nesta fase, observa-se uma baixa frequência de pulsos de LH, sendo os níveis de progesterona, em geral, inferiores a 0,5 ng/ml (UNGERFELD et al., 2003).

Esta característica estacionária é típica de ovinos de raças originárias das regiões de clima frio e temperado, sendo controlada primariamente pelo fotoperíodo e influenciada pela latitude, apresentando-se mais marcante em latitudes mais elevadas (BARTLEWSKI et al., 2011). Assim, a sazonalidade é marcante nas regiões onde a amplitude das variações anuais na duração do dia são maiores, já que a espécie ovina é poliéstrica estacional de dias curtos (CHEMINEAU et al., 1992). Na região sul do Brasil, a estação reprodutiva está mais restrita ao período de outono e inverno, evidenciando que o fotoperíodo é um fator de importância na determinação da estacionalidade reprodutiva nesta espécie.

O fotoperíodo (horas de luz/horas de escuridão) interfere nas atividades sexuais através das informações luminosas percebidas pela retina, traduzidas em sinais nervosos pelo nervo óptico e transmitidas à glândula pineal, responsável pela secreção de melatonina (THIERY et al., 2002). A melatonina é um neurotransmissor que informa ao organismo a duração da noite e o respectivo período do ano, sendo liberada na circulação periférica durante o escuro (LINCOLN, 1992). Na espécie ovina, assim como nos roedores, a melatonina tem ação pró-gonadotrófica, mediada por receptores no hipotálamo que podem alterar a secreção dos pulsos do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que, por sua vez, controla a secreção das

gonadotrofinas (hormônio folículoestimulante/FSH e hormônio luteinizante/LH), pela hipófise (DAIR et al., 2008).

Embora não haja atividade sexual durante o anestro, é possível a utilização de métodos que induzam a ciclicidade nas fêmeas ovinas. Para isso, dispositivos intravaginais impregnados com progesterona são utilizados nos protocolos de indução ao estro e mostram resultados satisfatórios de manifestação do cio e ovulação, com taxas de até 90% de resposta (OZYURTLU et al., 2010). As médias de prenhez de ovelhas acasaladas durante o anestro estacional giram em torno de 41% (DOGAN & NUR, 2006) e 55% (KOHNO et al., 2005).

Esta sazonalidade causa grandes impactos na produtividade econômica em ovinos, já que estacionaliza também a disponibilidade de produtos oriundos da produção, como a carne, o leite e a indústria da lã (DELGADILLO et al., 2014). Embora as ovelhas possuam um ciclo produtivo curto, com uma gestação de cerca de 150 dias, geralmente só é obtido um cordeiro por ovelha ao ano (KAYA et al., 2013). Por este motivo, estratégias reprodutivas aliadas aos hormônios indutores de ciclicidade são utilizadas para aumentar a fertilidade das ovelhas em anestro estacional e obter cordeiros duas vezes em um ano ou três vezes em dois anos (GOULET & CASTONGUAY, 2002).

3 CAPÍTULO 1

Progesterone supplementation on day 03 post mating decreases ISG15 blood expression during maternal recognition of pregnancy in non-breeding season ewes

Manuela Wolker Manta, Alfredo Quites Antoniazzi

Animal Reproduction Science, 2020

1 **Progesterone supplementation on day 03 post mating decreases ISG15 blood**
2 **expression during maternal recognition of pregnancy in non-breeding season ewes**

3
4 **Manuela Wolker MANTA¹, Lady Katerine Serrano Mujica, Carolina dos Santos**
5 **Amaral, Igor Gabriel Zappe, Camila Azzolin, Gabrielle Rebecca Everling Correa,**
6 **Bernardo Garziera Gasperin, Valério Valdetar Marques Portela Júnior, Fabio**
7 **Vasconcellos Comim, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Alfredo Quites ANTONIAZZI^{1*}**

8
9 ¹ Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory, BioRep, Federal University of
10 Santa Maria, Av. Roraima 1000, ZIP code 97105-900 Veterinary Teaching Hospital, Santa
11 Maria, RS, Brazil.

12
13 *Corresponding author

14 Email: alfredo.antoniazzi@ufsm.br

15 Fone: +55 55 999938111

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 Abstract

36 The aim of this study was to evaluate the effect of supplementation with exogenous
37 progesterone on the expression of *ISG15* in leukocytes on days 10 and 16 of the early pregnancy
38 of ewes. The ewes were randomly allocated into two groups: Control Group (GC) and Group
39 P4 (P4G), during the seasonal anestrous period and breeding season. The groups were submitted
40 to estrous cycle manipulation protocol. In both periods, P4G received 25 mg of injectable
41 progesterone on day 3 after mating, while the CG received the same vehicle volume. During
42 the non-breeding season, the expression of *ISG15* in leukocytes on day 10 did not differ between
43 the groups, P4G and GC ($p > 0.05$). On the other hand, the expression of *ISG15* on day 16 is
44 higher in the CG, when compared to the P4G ($p < 0.05$). During breeding season, *ISG15* gene
45 expression did not show differences between groups on days 10 and 16. During non-breeding
46 season, on day 10, the P4G showed lower concentrations of serum progesterone when compared
47 to the CG. On day 16, serum progesterone concentration also decreased in P4G compared to
48 CG. During the breeding season, serum progesterone at D10 did not differ between groups,
49 P4G and GC ($p > 0.05$). On the contrary, P4G showed higher concentrations of circulating
50 progesterone when compared to GC on day 16. The results indicate that progesterone
51 supplementation at the beginning of pregnancy in sheep in the seasonal anestrus is not effective
52 on endocrine signaling of interferon tau during maternal recognition of pregnancy or increasing
53 serum progesterone. However, it increases serum progesterone during the reproductive season
54 without influence on *ISG15* expression in leukocytes.

55 Keywords: progesterone, ewes, pregnancy, *ISG15*, leukocytes

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

1 Introduction

Reproduction in ewes follows a seasonal pattern, consequently, impact the availability of products throughout the year. This seasonal breeding pattern is a major obstacle to increase the intensity of ewe production (Vincent et al., 2000). The non-breeding season is characterized by the absence of sexual behavior and ovulation (Webb et al., 1992) and ewes exposed to rams almost always exhibit reduced pregnancy rates compared to ewes exposed in reproductive season, owing to embryonic losses (Dixon et al., 2007b). In cases of early embryonic loss, low concentrations of serum progesterone during the period of maternal recognition can be considered as one the causes of mortality (Wiltbank et al., 2016).

Maternal recognition of pregnancy (MRP) is the period which the concept signals its presence to the mother within the uterus (Bazer and Thatcher, 2017), production and release of interferon tau (IFNT) occurs (Godkin et al., 1984). The progesterone is fundamental for the maintenance of pregnancy, favoring the embryo elongation at high concentrations, thus indirectly contributing to the production of IFNT (Bazer et al., 2008). In ovine, IFNT is secreted by conceptus trophoctoderm cells and its secretion begins on day 8 of pregnancy, increasing thereafter (Spencer et al., 2004a), occurring the peak of production is around the Day 16 of pregnancy. Furthermore, IFNT induces secretion and synthesis of Interferon-Stimulated Genes (ISGs) such as *ISG15* (Antoniazzi et al., 2013a), on extrauterine tissues, which are involved in luteal resistance to the luteolytic action of PGF in the CL (Hansen et al., 1999b).

ISG15 is a type I interferon (IFN)-inducible gene encoding a protein with pleiotropic functions, involved in the regulation of uterine responsiveness to the concept, in its elongation and implantation (Spencer et al., 2008; Bazer et al., 2009; Hansen et al., 2010b). Increase of *ISG15* in the uterus (Johnson et al., 1999b), corpus luteum (Antoniazzi et al., 2013a), blood cells (Oliveira et al., 2008a) and thymus (Zhang et al., 2018) during early pregnancy in ewes is induced by the IFNT through an endocrine manner (Bott et al., 2010a). In cows and sheep, synthesis of endometrial *ISG15* coincides with the secretion of conceptus-derived IFNT (Austin et al., 1996).

The concentration of progesterone and *ISG15* mRNA in blood were greater in pregnant cows than in open cows on days 17 to 25 of pregnancy, suggesting that these two associated variables may indicate the luteal function and the presence of a viable embryo (Han et al., 2006a). Low concentrations of progesterone in this period of MRP culminated in low

99 embryonic survival and gestational loss in ewes, with a three-fold decrease in IFNT
100 production (Nephew et al., 1991b). An alternative for immediate increase on serum
101 progesterone concentration is exogenous progesterone supplementation, which may be
102 obtained either by progesterone injection or insertion of an intravaginal device (Yan et al.,
103 2016).

104 In this study, we hypothesize progesterone supplementation improves embryo
105 development and endocrine signaling of IFNT in ewes during the non-breeding season. The
106 objective of this study was to evaluate the effect of progesterone supplementation on day 03
107 after mating on the expression of *ISG15* in leukocytes of ewes during non-breeding and
108 breeding seasons.

109 **2 Material and methods**

110

111 2.1 Animals and Experimental design

112

113 All procedures using animals were approved by the Institutional Committee for Ethics
114 in Animal Experiments (CEUA/UFSM, protocol #9383280819).

115 Sixteen non pregnant multiparous Texel ewes were used in non-breeding season
116 (Experiment 1) and nine non pregnant multiparous Texel ewes were used in breeding season
117 (Experiment 2). The ewes maintained on pasture of Tifton (*Cynodon dactylon*), weighing 47.5
118 \pm 0.8 kg with a body condition score 3.0 ± 0.5 (BCS, range 1–5). The animals were induced
119 (non-breeding season) and synchronized (breeding season) to estrous cycle. The protocol
120 started at Day -8, each ewe received a vaginal sponge containing medroxyprogesterone acetate
121 (MAP-60®, 62,5 mg, Tecnopec, São Paulo, Brazil) which remained for 6 days. On day -2, all
122 ewes were treated with 400 IU eCG (Folligon®; MSD Saúde Animal, Brazil) and mated with
123 sexually experienced Texel rams in a ratio 1 ram for 10 ewes. Only on the breeding season
124 ewes 1,25 mg of sodic cloroprostenol (Sincrocio®; Ourofino, Brazil) was injected on day -2.

125 The estrus was identified by a vasectomized ram about 24 after the removal of the
126 intravaginal sponge. Day 0 is considered the day of mating. All ewes were synchronized and
127 bred by the ram in both periods.

128

129 2.2 Progesterone supplementation

130

131 All the ewes from experiments 1 and 2 were allocated into two groups after mating:
132 Control and progesterone supplemented. The progesterone group (P4G) group was
133 supplemented with 25 mg progesterone i.m. (Sincrogest®, Ourofino, Brazil) on day 3 after
134 mating. The control group (GC) received the same volume with vehicle. Individual variation
135 occurred according to the days of estrus manifestation and mating. The groups were classified
136 as: CG ($n=8$ ewes) and P4G ($n=8$ ewes) during non-breeding season; CG ($n=4$ ewes) and P4G
137 ($n=5$ ewes) during breeding season.

138

139 2.3 Pregnancy diagnosis by ultrasound scanning

140

141 In the both experiments the pregnancy diagnosis was confirmed 40 days after mating
142 using transrectal ultrasonography scanning with the IuStar model CTS 800 Vet, with high
143 resolution, 7.5 MHz linear transrectal probe in probe holder. Ewes were recorded as pregnant
144 when a viable conceptus was visualized.

145

146 2.4 Blood sample and PBL isolation

147

148 In both experiments, blood samples from the jugular vein were collected from all ewes
149 on Days 10 and 16 after mating for evaluation the *ISG15* mRNA expression and progesterone
150 concentration. Blood samples were centrifuged (1800 g x 15 min) at room temperature to
151 obtain serum and stored at -20 °C. The samples collected in tubes containing EDTA were
152 processed using Ficoll-Paque PLUS® density gradient media (Sigma-Aldrich, Brazil) for
153 leukocyte isolation. The separation of leukocyte fractions was performed according to Ficoll-
154 Paque PLUS® manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, Brazil). Briefly, blood samples
155 collected in a tube containing EDTA were diluted in saline solution (1:1) and then deposited
156 above the Ficoll gradient in 15 ml conical tubes. Tubes were centrifuged (30 min - 1800 g -
157 20°C) for separation of the leukocyte fractions in peripheral blood mononuclear cell (PBMC)
158 and polymorphonuclear neutrophil (PMN). The PBMC and PMN interfaces were carefully
159 removed by pipetting and deposited individually in 2 ml tubes, and immediately snap freezing
160 for storage at -80°C.

161

162 2.6 RNA extraction

163

164 The PMN samples were submitted to RNA extraction, which was performed according
165 to TRI Reagent BD® manufacturer's protocol (T3809, Sigma-Aldrich, USA). One hundred µl
166 of each sample was added to the amount of 375 µl of Trizol and homogenized. Next, the
167 samples were mixed on a vortex for 3 seconds and incubated for 5 min at room temperature.
168 The next step added 200ul of chloroform, followed by further mixed on a vortex for 15
169 seconds and incubation at room temperature for another 5 min. The samples were centrifuged
170 (12.000 g /15 min/4°C) and supernatant was transferred to a new 2 mL tube to which 500 ul of
171 isopropanol alcohol was added, followed by incubation for 10 min at room temperature.
172 Subsequently, samples were centrifuged (12.000 g /8 min/4°C), and the supernatant was
173 removed carefully. Finally, 1000 ul of 75% ethanol was added to the tube, and it was
174 centrifuged for the last time at 7.500 g for 5 min at 4°C. Supernatant was removed, and the
175 pellet was dried at room temperature for 5 min. Subsequently, 10 ul of nuclease-free water was
176 added and the samples were stored overnight at -80 ° C for further quantification. The total
177 concentration of RNA was determined by measuring the optical density at 260 nm and the
178 purity of the RNA was evaluated based on the proportion 260nm/280 nm (ratio was between
179 1.75 and 2.0) using a NanoDrop-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

180

181 2.7 cDNA synthesis and Quantitative Polymerase Chain Reaction

182

183 The cDNA synthesis was performed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad,
184 Brazil), for post-analysis of gene expression by RT-PCR. The cDNA was amplified by
185 initially using the denaturation procedures for 30 s at 95 °C, followed by 38 cycles of
186 amplification and the annealing temperature was 60 °C. The concentration of cDNA was
187 500 ng and primers were 100 nM. The cDNA obtained was kept at -20 °C until use.

188 The qPCR analyses were performed using SYBR Green chemistry (Life Technologies).

189 The real-time PCR reactions were carried out using a CFX384 Touch™ Real-Time PCR
190 Detection System (Bio-Rad). The primers for *ISG15* (NM_001009735.1), *GAPDH*
191 (NM_001190390.1), *RPL19* (NM_027974613.1). *GAPDH* and *RPL19* were used as
192 housekeeping genes. All samples were processed in duplicate, and the mean value of each
193 duplicate was used for all results. The qPCR with 2 µl nuclease-free water was used as
194 negative control. To exclude contamination by non-specific PCR products such as primer
195 dimers, a melting curve analysis was applied to all final PCR products after the cycling
196 protocol.

197

2.8 Progesterone assay

Blood was centrifuged at 1800 G for 15 min. Serum was stored at -20 °C for further analysis of steroids. The concentration of progesterone was determined in serum by the electrochemiluminescence kit (ADVIA Centaur, Siemens). The assay sensitivity was 0.05 ng/ml progesterone.

2.9 Statistics analysis

The gene expression data were tested for normal distribution and normalized when necessary. Serum progesterone concentrations were subjected to the analysis of variance, using a general linear model. Statistical analyses were performed using PRISM (GraphPad Prism 8). Differences were considered significant when $P < 0.05$ and data are presented as means \pm SEM.

3 Results

3.1 Pregnancy status during the non-breeding and breeding seasons

Ewes were evaluated for pregnancy status 40 days after mating by ultrasonography. In both seasons conception rates were similar between groups. During the non-breeding season, the conception rates were 50% in P4G (4/8 pregnant ewes) and 50% in CG (4/8 pregnant ewes). During the breeding season the conception rates were 100% in P4G (5/5 pregnant ewes) and 75% in CG (3/4 pregnant ewes).

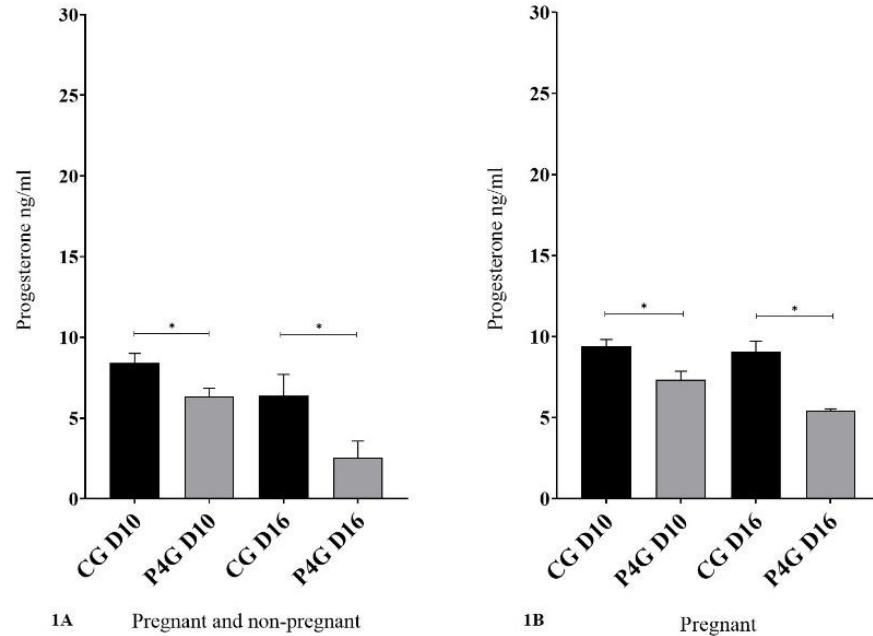
3.2 Concentration of serum progesterone during the non-breeding season

The concentration of serum progesterone on day 10 in group P4G had lower circulating progesterone concentrations when compared to CG ($7,35 \pm 0,52$ and $9,41 \pm 0,41$ ng/ml, respectively). On D16, serum progesterone concentration was lower in the P4G in relation to CG ($5,45 \pm 0,09$ and $9,07 \pm 0,65$ ng/ml, $P < 0.05$) (Figure 1A).

Serum progesterone concentrations for days 10 and 16 in ewes that were bred but were not pregnant in the diagnosis of gestation, did not differ ($P > 0,05$) between treatment groups (CG and P4G). When we evaluated only the pregnant ewes, there was a difference ($P < 0.05$)

231 between groups, decreasing serum concentration of progesterone between Days 10 and 16 in
 232 P4G group compared to CG (Figure 1B).

233 Figure 1. Concentration of serum progesterone during non-breeding season



234

235

236 Legend: 1A. Concentration of progesterone on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the non-
 237 breeding season. 1B. Concentration of progesterone on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the
 238 non-breeding season, only in pregnant ewes. Values represent the mean \pm SEM. Significant differences
 239 ($P < 0.05$).

240

241 3.3 Concentration of serum progesterone during the breeding season

242

243 Serum progesterone on Day 10 did not differ ($P > 0.05$) between treatment in P4G and
 244 CG ($11,18 \pm 2,17$ and $12,45 \pm 3,8$ ng/ml, respectively). However, on Day 16 GP4 ewes
 245 presented an increase in the circulating progesterone concentrations when compared to CG
 246 ($20,93 \pm 3,75$ and $8,53 \pm 2,02$ ng/ml, respectively). Concentrations of progesterone on Days 10
 247 and 16 are showed on Figure 2A. When we evaluated only pregnant ewes, P4G presented
 248 higher serum progesterone in D16 when compared to CG (Figure 2B).

249

250

251

252

253

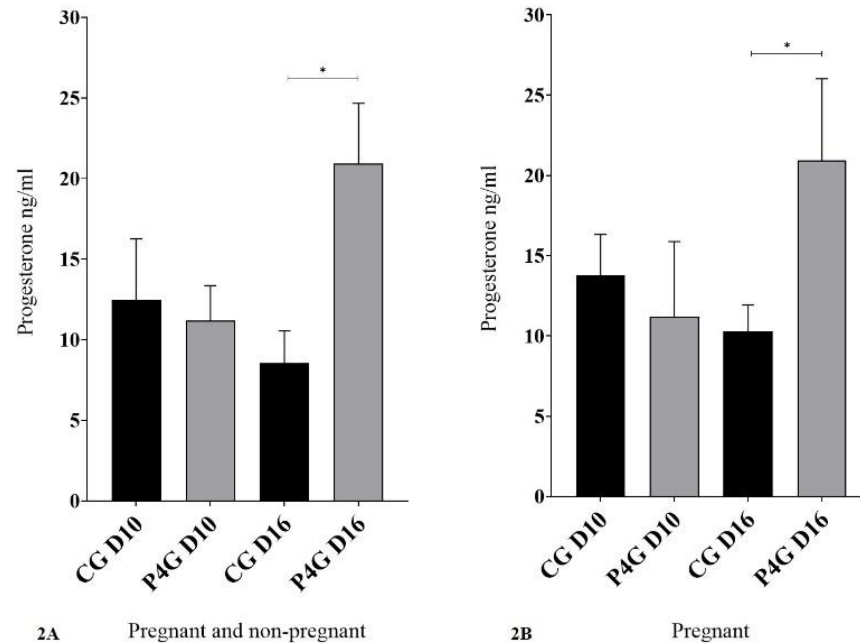
254

255

256

257 Figure 2. Concentration progesterone during breeding season.

258



259

260

261 Figure 2. 2A. Concentration of progesterone on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the breeding

262 season. 2B. Concentration of progesterone on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the breeding

263 season only in pregnant ewes. Values represent the mean \pm SEM. Significant differences ($P < 0.05$).

264

265 3.4 Relative expression levels of *ISG15* mRNA during the non-breeding season

266

267 The expression of *ISG15* mRNA on Day 10 did not differ between groups ($P > 0.05$). In268 contrast, *ISG15* mRNA on Day 16 was greater in CG when compared to P4G ($P < 0.05$). The269 expression of *ISG15* mRNA on Day 16 in both groups is shown on Figure 3A. On Day 16270 there is a difference in *ISG15* mRNA expression in pregnant ewes, presenting a greater271 expression in CG than in P4G ($P < 0.05$), and the difference in expression between ewes of both

272 groups is shown on Figure 3B.

273

274

275

276

277

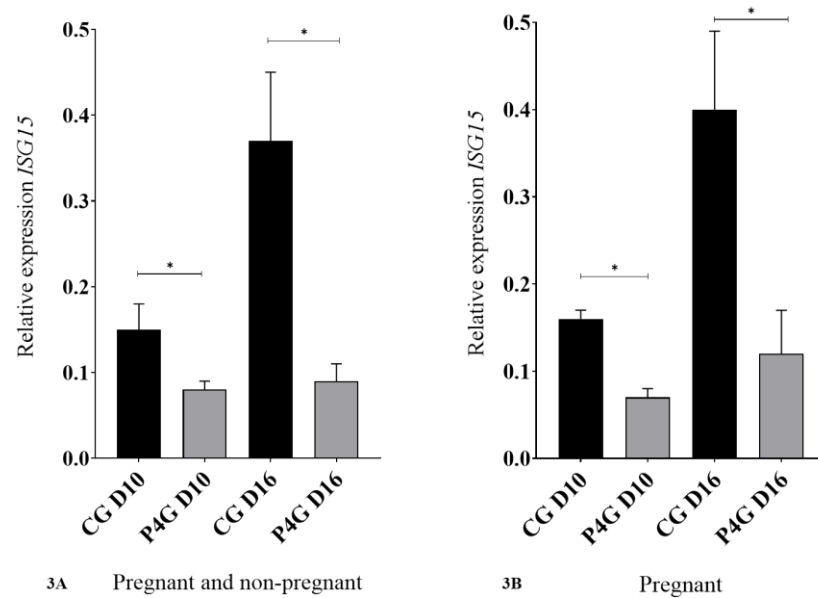
278

279

280

281 Figure 3. Relative expression of *ISG15* in leukocytes during non-breeding season

282



283

284

285 Figure 3. 3A. Expression of *ISG15* in leukocytes on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the non-286 breeding season. 3B. Expression of *ISG15* in leukocytes on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during287 the non-breeding season, only in pregnant ewes. Values represent the mean \pm SEM. Significant differences288 ($P < 0.05$).

289

290 3.5 Relative expression levels of *ISG15* mRNA during the breeding season

291

292 In contrast to non-breeding season results, relative expression of mRNA *ISG15* did not293 differ between treatments in the groups, in both evaluation Days 10 and 16 ($P > 0.05$). The294 relative expression mRNA *ISG15* in D10 and D16 for P4G and CG is shown in Figure 4A.295 When we evaluated just pregnant ewes, relative expression of *ISG15* did not presented

296 difference between groups P4G and CG in D10 and D16 after mating. Results are shown on

297 Figure 4B.

298

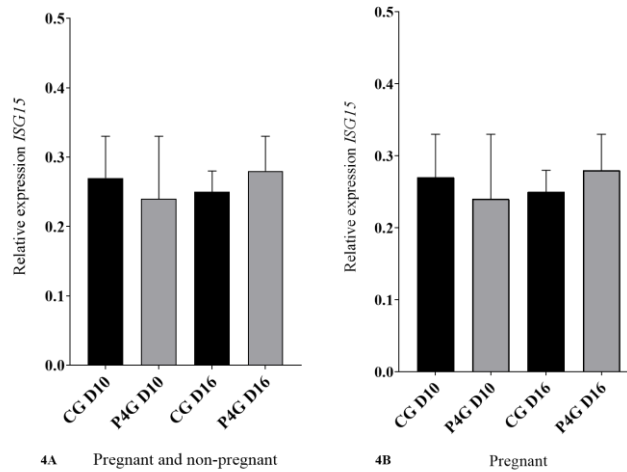
299

300

301

302
303
304
305

Figure 4. Relative expression of *ISG15* in leukocytes during breeding season



306
307

308 Figure 4. 4A. Expression of *ISG15* in leukocytes on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during the
309 breeding season. 4B. Expression of *ISG15* in leukocytes on Days 10 and 16, in the CG and P4G groups during
310 the breeding season only in pregnant ewes. Values represent the mean ± SEM. Significant differences ($P < 0.05$).

311 4 Discussion

312
313

314 In this study, using ewes during non-breeding season, the administration of a single
315 dose of progesterone supplement on Day 3 post mating did not increase *ISG15* expression on
316 Days 10 and 16 in leukocytes, in addition to decreasing serum progesterone over two
317 evaluated days. However, when we use this same administration of exogenous progesterone in
318 cyclic ewes during breeding season, there was an increase in serum progesterone on day 16
319 without altering *ISG15* expression in PMNs. These observations support the fact that only the
320 increase in serum progesterone in early pregnancy may be not enough to improve endocrine
321 signaling of IFNT evaluating the expression of *ISG15* in ovine PMNs.

322
323
324
325
326

Although several studies in cows have reported progesterone supplementation as
beneficial (Carter et al., 2008a; Beltman et al., 2009), other studies have shown no benefit or
even a marked reduction in pregnancy rate (Arndt et al., 2009; Yan et al., 2016). In our study,
the supplementation during non-breeding season may have been performed too early or the
dose used has influenced corpus luteum development, considering the fact that the minimum
dose of progesterone required to stimulate and advance early embryo development in ewes is

327 also the dose which will produce shortened cycles (deNicolo et al., 2009a). The results
328 observed suggest that supplementation on Day 3 is too early because the timing of the increase
329 in concentration of progesterone in the early luteal phase affects the timing of the down-
330 regulation of its receptor in the uterus epithelium, which is critical moment for the
331 establishment of pregnancy (Pope et al., 1995b).

332 In cattle, low blood *ISG15* and progesterone levels are predictive of non-pregnant cows
333 (Han et al., 2006a). Moreover, the upregulation of *ISG15* gene expression in peripheral blood
334 could be used as a marker for the presence of a viable embryo in the uterus as early pregnancy
335 diagnosis (Shirasuna et al., 2012). When we analyzed the decline in serum progesterone and
336 the expression of *ISG15* in leukocytes, it suggests a conceptus that has a lower IFNT signaling.
337 In the two evaluated days (days 10 and 16), non-breeding season P4G group had lower
338 concentration of progesterone than CG, as well as a decrease in *ISG15* expression in the PMN
339 cells. This suggest that this progesterone supplementation causing a progesterone-induced
340 asynchrony between the embryo and the uterine environment, during the non-breeding season,
341 do not stimulate the embryo's ability to produce more IFNT and stimulate *ISG15* in PMN.

342 These data lead us to believe that our procedure of supplementation in the first days of
343 corpus luteum formation in non-breeding season influence the endocrine signaling of maternal
344 recognition of pregnancy. Even though we have not evaluated other parameters of embryonic
345 signaling, *ISG15* gene expression in leucocytes may be used as an effective method for
346 evaluating the survival of the embryo in the uterus (Soumya et al., 2017) and in our study the
347 ewes P4G presented lower relative expression compared to CG during non-breeding season,
348 reflecting a conceptus that was delayed or diminished in IFNT signaling. In contrast, during
349 breeding season the groups did not differ in relative expression of *ISG15* in both days,
350 reflecting that exogenous progesterone during the reproductive season does not alter
351 embryonic signaling through *ISG15* expression.

352 Unlike during the non-breeding season, ewes from P4G presented high concentration
353 of serum progesterone on day 16 compared to CG. In these conditions, it was expected that
354 administration of exogenous progesterone would increase serum and endogenous progesterone
355 as the ewes were cyclical and had prior luteal development. Thus, during administration of
356 exogenous progesterone, the corpus luteum formed becomes more resistant to the exogenous
357 source, causing an opposite effect to that occurring during the non-breeding season. We can
358 speculate that this difference in the endocrine response may have been a consequence of a high
359 sensitivity of the hypothalamus-pituitary axis during non-breeding season.

360 Our results suggest that exogenous progesterone administration exerts influence on
361 endogenous progesterone, with negative action on the corpus luteum during the non-breeding
362 season. Possibly progesterone supplementation during non-breeding season interferes with the
363 secretory pattern of luteal cells, by modifying steroidogenic capacity, with altered ability to
364 respond to luteotropic stimulus. The decreased capacity for steroidogenic cells to synthesize
365 progesterone and decrease in the number and size of luteal cells result in reduced ability of the
366 corpus luteum to secrete progesterone (Farin et al., 1990). The specific mechanism exogenous
367 progesterone influences luteal progesterone in ewes during the anestrous is unclear.

368 Progesterone regulates the blastocyst growth and conceptus elongation indirectly via
369 the endometrium, which is essential for ovine conceptus survival and growth (Satterfield et al.,
370 2006b). Increasing peripheral concentrations of progesterone increased rate of embryonic
371 growth of ovine (Pope et al., 1995b); however, in some cases it can impair embryonic
372 signaling in an endocrine manner, as occurred in our study. Nevertheless, the exact mechanism
373 by which progesterone supplementation impact the corpus luteum development, decreases
374 progesterone production and how does alters expression of *ISG15* in leukocytes during
375 embryonic signaling on non-breeding season is not clear.

376

377 **5 Conclusions**

378

379 The use of progesterone supplementation, on day 3 after mating, during the non-
380 breeding, is not effective in improving embryonic signaling through the gene expression of
381 *ISG15* in ewes' leukocytes, in addition to promoting a decrease in serum progesterone during
382 this period. However, this procedure is able to increase the serum progesterone of ewes during
383 the breeding season, without altering the *ISG15* gene expression in leukocytes. Our data
384 suggest that: there are differences in the hormonal responses of the sheep during the seasonal
385 anestrus and reproductive season in face of progesterone supplementation, and differences in
386 the embryonic quality and endocrine signaling of IFNT in these two seasons.

387

388

389

390 **Conflict of Interest**

391 The authors have nothing to declare.

392

393 **Acknowledgements**

394 We are thankful to Cabanha Santa Maria farm for providing the animals for this study.
395 CNPq, CAPES - Finance Code 001, FINEP and FAPERGS for the financial support for
396 research.

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

6 References

- 424
425
- 426 Antoniazzi, A.Q., Webb, B.T., Romero, J.J., Ashley, R.L., Smirnova, N.P., Henkes, L.E., Bott,
427 R.C., Oliveira, J.F., Niswender, G.D., Bazer, F.W., Hansen, T.R., 2013. Endocrine delivery of
428 interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in
429 ewes. *Biol Reprod* 88, 144.
- 430 Arndt, W.J., Holle, A.J., Bauer, M.L., Kirsch, J.D., Schimek, D.E., Odde, K.G., Vonnahme,
431 K.A., 2009. Effect of post-insemination progesterone supplementation on pregnancy rate in
432 dairy cows. *Can J Vet Res* 73, 271-274.
- 433 Austin, K.J., Ward, S.K., Teixeira, M.G., Dean, V.C., Moore, D.W., Hansen, T.R., 1996.
434 Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during
435 early pregnancy. *Biol Reprod* 54, 600-606.
- 436 Bazer, F.W., 2015. History of Maternal Recognition of Pregnancy. *Adv Anat Embryol Cell*
437 *Biol* 216, 5-25.
- 438 Bazer, F.W., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Spencer, T.E., Wu, G., 2008. Interferons and
439 progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell
440 signaling pathways. *Reprod Biol* 8, 179-211.
- 441 Bazer, F.W., Roberts, R.M., 1983. Biochemical Aspects of Conceptus-Endometrial
442 Interactions. *J Exp Zool* 228, 373-383.
- 443 Bazer, F.W., Spencer, T.E., Johnson, G.A., 2009. Interferons and uterine receptivity. *Semin*
444 *Reprod Med* 27, 90-102.
- 445 Bazer, F.W., Thatcher, W.W., 2017. Chronicling the discovery of interferon tau. *Reproduction*
446 154, F11-F20.
- 447 Bazer, F.W., Ying, W., Wang, X.Q., Dunlap, K.A., Zhou, B.Y., Johnson, G.A., Wu, G.Y., 2015.
448 The many faces of interferon tau. *Amino Acids* 47, 449-460.
- 449 Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M.G., Roche, J.F., Crowe, M.A., 2009. Effect of
450 progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef
451 heifers. *Theriogenology* 71, 1173-1179.
- 452 Berisha, B., Schams, D., 2005. Ovarian function in ruminants. *Domest Anim Endocrinol* 29,
453 305-317.
- 454 Bott, R.C., Ashley, R.L., Henkes, L.E., Antoniazzi, A.Q., Bruemmer, J.E., Niswender, G.D.,
455 Bazer, F.W., Spencer, T.E., Smirnova, N.P., Anthony, R.V., Hansen, T.R., 2010. Uterine vein
456 infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biol Reprod* 82, 725-735.

- 457 Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C., Kenny, D.A.,
458 Roche, J.F., Lonergan, P., 2008. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of
459 pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev*
460 20, 368-375.
- 461 deNicolò, G., Parkinson, T.J., Kenyon, P.R., Morel, P.C., Morris, S.T., 2009. Plasma
462 progesterone concentrations during early pregnancy in spring- and autumn-bred ewes. *Anim*
463 *Reprod Sci* 111, 279-288.
- 464 Dixon, A.B., Knights, M., Winkler, J.L., Marsh, D.J., Pate, J.L., Wilson, M.E., Dailey, R.A.,
465 Seidel, G., Inskeep, E.K., 2007. Patterns of late embryonic and fetal mortality and association
466 with several factors in sheep. *J Anim Sci* 85, 1274-1284.
- 467 Farin, C.E., Nett, T.M., Niswender, G.D., 1990. Effects of luteinizing hormone on luteal cell
468 populations in hypophysectomized ewes. *J Reprod Fertil* 88, 61-70.
- 469 Forde, N., Carter, F., Fair, T., Crowe, M.A., Evans, A.C., Spencer, T.E., Bazer, F.W., McBride,
470 R., Boland, M.P., O'Gaora, P., Lonergan, P., Roche, J.F., 2009. Progesterone-regulated changes
471 in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol*
472 *Reprod* 81, 784-794.
- 473 Forde, N., Lonergan, P., 2012. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: What is
474 required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? *J Reprod Dev* 58, 189-195.
- 475 Garrett, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T., Gries, L.K., Wettemann, R.P., Buchanan, D.S., 1988.
476 Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F₂ alpha release and the interestrus interval
477 in the bovine. *Prostaglandins* 36, 85-96.
- 478 Guillomot, M., Michel, C., Gaye, P., Charlier, N., Trojan, J., Martal, J., 1990. Cellular
479 localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos
480 during early pregnancy. *Biol Cell* 68, 205-211.
- 481 Han, H., Austin, K.J., Rempel, L.A., Hansen, T.R., 2006. Low blood ISG15 mRNA and
482 progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *J Endocrinol* 191, 505-512.
- 483 Hansen, P.J., 2007. Regulation of immune cells in the uterus during pregnancy in ruminants. *J*
484 *Anim Sci* 85, E30-31.
- 485 Hansen, T.R., Austin, K.J., Perry, D.J., Pru, J.K., Teixeira, M.G., Johnson, G.A., 1999.
486 Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil*
487 *Suppl* 54, 329-339.
- 488 Hansen, T.R., Henkes, L.K., Ashley, R.L., Bott, R.C., Antoniazzi, A.Q., Han, H., 2010a.
489 Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. *Soc Reprod Fertil* 67, 325-340.

- 490 Hansen, T.R., Henkes, L.K., Ashley, R.L., Bott, R.C., Antoniazzi, A.Q., Han, H., 2010b.
491 Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. *Soc Reprod Fertil Suppl* 67, 325-340.
- 492 Johnson, G.A., Spencer, T.E., Hansen, T.R., Austin, K.J., Burghardt, R.C., Bazer, F.W., 1999.
493 Expression of the interferon tau inducible ubiquitin cross-reactive protein in the ovine uterus.
494 *Biol Reprod* 61, 312-318.
- 495 Kizaki, K., Shichijo-Kizaki, A., Furusawa, T., Takahashi, T., Hosoe, M., Hashizume, K., 2013.
496 Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 11,
497 6.
- 498 Menassol, J.B., Collet, A., Chesneau, D., Malpaux, B., Scaramuzzi, R.J., 2012. The interaction
499 between photoperiod and nutrition and its effects on seasonal rhythms of reproduction in the
500 ewe. *Biol Reprod* 86, 52.
- 501 Nephew, K.P., McClure, K.E., Ott, T.L., Dubois, D.H., Bazer, F.W., Pope, W.F., 1991.
502 Relationship between variation in conceptus development and differences in estrous cycle
503 duration in ewes. *Biol Reprod* 44, 536-539.
- 504 Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000.
505 Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80, 1-29.
- 506 Oliveira, J.F., Henkes, L.E., Ashley, R.L., Purcell, S.H., Smirnova, N.P., Veeramachaneni,
507 D.N., Anthony, R.V., Hansen, T.R., 2008. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in
508 extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau
509 release from the uterine vein. *Endocrinology* 149, 1252-1259.
- 510 Pope, W.F., Cárdenas, H., Wiley, T.M., McClure, K.E., 1995. Dose-response relationships of
511 exogenous progesterone shortly after ovulation on estrous cycle length, blastocyst development
512 and fertility in sheep. *Animal Reproduction Science* 38, 109-117.
- 513 Pugliesi, G., Oliveria, M.L., Scolari, S.C., Lopes, E., Pinaffi, F.V., Miagawa, B.T., Paiva, Y.N.,
514 Maio, J.R., Nogueira, G.P., Binelli, M., 2014. Corpus luteum development and function after
515 supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. *Reprod*
516 *Domest Anim* 49, 85-91.
- 517 Rickard, J.P., Ryan, G., Hall, E., de Graaf, S.P., Hermes, R., 2017. Using transrectal ultrasound
518 to examine the effect of exogenous progesterone on early embryonic loss in sheep. *PLoS One*
519 12, e0183659.
- 520 Roberts, R.M., Cross, J.C., Leaman, D.W., 1992. Interferons as hormones of pregnancy. *Endocr*
521 *Rev* 13, 432-452.
- 522 Rodriguez Iglesias, R.M., Cicciooli, N.H., Ferreria, J., Pevsner, D.A., Rosas, C.A., Rodriguez,
523 M.M., Pedrueza, J.R., 2013. Short-lived corpora lutea syndrome in anoestrous ewes following

- 524 17beta-oestradiol or MAP treatments applied before an allogenic sexual stimulation with rams
525 and oestrous ewes. *Anim Reprod Sci* 136, 268-279.
- 526 Romero, J.J., Antoniazzi, A.Q., Smirnova, N.P., Webb, B.T., Yu, F., Davis, J.S., Hansen, T.R.,
527 2013. Pregnancy-associated genes contribute to antiluteolytic mechanisms in ovine corpus
528 luteum. *Physiol Genomics* 45, 1095-1108.
- 529 Satterfield, M.C., Bazer, F.W., Spencer, T.E., 2006. Progesterone regulation of preimplantation
530 conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod* 75, 289-296.
- 531 Shirasuna, K., Matsumoto, H., Kobayashi, E., Nitta, A., Haneda, S., Matsui, M., Kawashima,
532 C., Kida, K., Shimizu, T., Miyamoto, A., 2012a. Upregulation of interferon-stimulated genes
533 and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. *J*
534 *Reprod Dev* 58, 84-90.
- 535 Shirasuna, K., Matsumoto, H., Kobayashi, E., Nitta, A., Haneda, S., Matsui, M., Kawashima,
536 C., Kida, K., Shimizu, T., Miyamoto, A., 2012b. Upregulation of Interferon-stimulated Genes
537 and Interleukin-10 in Peripheral Blood Immune Cells During Early Pregnancy in Dairy Cows.
538 *J Reprod Develop* 58, 84-90.
- 539 Soumya, N.P., Das, D.N., Jeyakumar, S., Mondal, S., Mor, A., Mundhe, U.T., 2017.
540 Differential expression of ISG 15 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of nulliparous
541 and multiparous pregnant versus non-pregnant *Bos indicus* cattle. *Reprod Domest Anim* 52,
542 97-106.
- 543 Spencer, T.E., Burghardt, R.C., Johnson, G.A., Bazer, F.W., 2004. Conceptus signals for
544 establishment and maintenance of pregnancy. *Anim Reprod Sci* 82-83, 537-550.
- 545 Spencer, T.E., Sandra, O., Wolf, E., 2008. Genes involved in conceptus-endometrial
546 interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches.
547 *Reproduction* 135, 165-179.
- 548 Vincent, J.N., McQuown, E.C., Notter, D.R., 2000. Duration of the seasonal anestrus in sheep
549 selected for fertility in a fall-lambing system. *J Anim Sci* 78, 1149-1154.
- 550 Webb, R., Baxter, G., McBride, D., Ritchie, M., Springbett, A.J., 1992. Mechanism controlling
551 ovulation rate in ewes in relation to seasonal anoestrus. *J Reprod Fertil* 94, 143-151.
- 552 Wiltbank, M.C., Baez, G.M., Garcia-Guerra, A., Toledo, M.Z., Monteiro, P.L., Melo, L.F.,
553 Ochoa, J.C., Santos, J.E., Sartori, R., 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first
554 trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 86, 239-253.
- 555 Yan, L., Robinson, R., Shi, Z., Mann, G., 2016. Efficacy of progesterone supplementation
556 during early pregnancy in cows: A meta-analysis. *Theriogenology* 85, 1390-1398 e1391.

557 Yankey, S.J., Hicks, B.A., Carnahan, K.G., Assiri, A.M., Sinor, S.J., Kodali, K., Stellflug, J.N.,
558 Stellflug, J.N., Ott, T.L., 2001. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood
559 mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. *J Endocrinol* 170, R7-11.
560 Zhang, L., Xue, J., Wang, Q., Lv, W., Mi, H., Liu, Y., Yang, L., 2018. Changes in expression
561 of ISG15, progesterone receptor and progesterone-induced blocking factor in ovine thymus
562 during early pregnancy. *Theriogenology* 121, 153-159.

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

7 CONCLUSÃO

A utilização da suplementação de progesterona, no dia 3 após a cobertura, durante o anestro estacional, não é eficaz em melhorar a sinalização embrionária através da expressão gênica do *ISG15* nos leucócitos de ovelhas. Além disso, promove a diminuição na progesterona sérica durante este período. Porém, este procedimento é capaz de aumentar a progesterona sérica de ovelhas acasaladas durante a estação reprodutiva, sem alterar a expressão gênica do *ISG15*. Nossos dados sugerem que: existem diferenças nas respostas hormonais das ovelhas durante o anestro estacional e estação reprodutiva frente à suplementação com progesterona, e diferenças na qualidade embrionária e sinalização endócrina do IFNT nestas duas estações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHONY, R. V., et al. Synthesis and Processing of Ovine Trophoblast Protein-1 and Bovine Trophoblast Protein-1, Conceptus Secretory Proteins Involved in the Maternal Recognition of Pregnancy. **Endocrinology**, v.123, n.3, p.1274-1280. 1988. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988P810300008>. Acesso em. doi: DOI 10.1210/endo-123-3-1274.

ANTONIAZZI, A. Q., et al. The role of interferon-tau during maternal recognition of pregnancy in ruminants. **Ciencia Rural**, v.41, n.1, p.176-185. 2011. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000287990900029>. Acesso em. doi: Doi 10.1590/S0103-84782011000100029.

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**, v.88, n.6. 2013. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000320723500007>. Acesso em. doi: ARTN 144 10.1095/biolreprod.112.105684.

BALDASSARRE, H.; C. N. KARATZAS. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v.82-3, p.255-266. 2004. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000223257400021>. Acesso em. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.027.

BARTLEWSKI, P. M., et al. Reproductive cycles in sheep. **Animal Reproduction Science**, v.124, n.3-4, p.259-268. 2011. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000292356500016>. Acesso em. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.02.024.

BAZER, F. W., et al. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. **Reprod Biol**, v.8, n.3, p.179-211. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092983>. Acesso em. doi: 10.1016/s1642-431x(12)60012-6.

BAZER, F. W., et al. Select nutrients, progesterone, and interferon tau affect conceptus metabolism and development. **Ann N Y Acad Sci**, v.1271, p.88-96. 2012a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23050969>. Acesso em. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06741.x.

BAZER, F. W., et al. Roles of Ovine Trophoblast Protein-1 and Estradiol Prolactin in the Establishment of Pregnancy in Sheep and Pigs. **Reproduction Fertility and Development**, v.4, n.3, p.335-340. 1992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JR05600014>. Acesso em. doi: Doi 10.1071/Rd9920335.

BAZER, F. W., et al. Interferon tau: An antiluteolytic hormone for pregnancy recognition in ruminants. **Biology of Reproduction**, v.56, p.M1-M1. 1997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997XG86500007>. Acesso em. doi.

BAZER, F. W., et al. Uterine biology in pigs and sheep. **J Anim Sci Biotechnol**, v.3, n.1, p.23. 2012b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22958877>>. Acesso em. doi: 10.1186/2049-1891-3-23.

BAZER, F. W.; W. W. THATCHER. Chronicling the discovery of interferon tau. **Reproduction**, v.154, n.5, p.F11-F20. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28747540>>. Acesso em. doi: 10.1530/REP-17-0257.

BAZER, F. W., et al. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **Mol Hum Reprod**, v.16, n.3, p.135-52. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880575>>. Acesso em. doi: 10.1093/molehr/gap095.

BELTMAN, M. E., et al. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. **Theriogenology**, v.71, n.7, p.1173-1179. 2009. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264829900017>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.014.

BINELLI, M., et al. Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. **Biology of Reproduction**, v.64, n.2, p.654-665. 2001. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166650400031>. Acesso em. doi: DOI 10.1095/biolreprod64.2.654.

BOGUNOVIC, D., et al. Mycobacterial disease and impaired IFN-gamma immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. **Science**, v.337, n.6102, p.1684-8. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22859821>>. Acesso em. doi: 10.1126/science.1224026.

BOSCOS, C. M., et al. Assessment of progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.3, p.170-174. 2003. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182784300002>. Acesso em. doi: DOI 10.1046/j.1439-0531.2003.00407.x.

BOTT, R., et al. Uterine vein infusion of interferon-tau acts systemically to induce ISG15 in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, p.205-205. 2008. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000259120300592>. Acesso em. doi.

BOTT, R. C., et al. Uterine Vein Infusion of Interferon Tau (IFNT) Extends Luteal Life Span in Ewes. **Biology of Reproduction**, v.82, n.4, p.725-735. 2010. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000275814400010>. Acesso em. doi: 10.1095/biolreprod.109.079467.

BOTT, R. C., et al. Uterine Vein Infusion of Interferon Tau (IFNT) Stimulates Luteal Gene Expression, Prevents Anti-Steroidogenic Actions of Prostaglandin F2alpha (PGF) and Extends Luteal Lifespan in Ewes. **Biology of Reproduction**, p.180-181. 2009. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273605500554>. Acesso em. doi.

BROOKS, K.; T. E. SPENCER. Biological Roles of Interferon Tau (IFNT) and Type I IFN Receptors in Elongation of the Ovine Conceptus. **Biology of Reproduction**, v.92, n.2. 2015. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000350807000004>. Acesso em. doi: ARTN 47

10.1095/biolreprod.114.124156.

CARTER, F., et al. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, n.3, p.368-375. 2008. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253880800004>. Acesso em. doi: Doi 10.1071/Rd07204.

CHARPIGNY, G., et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v.138, n.5, p.2163-2171. 1997. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997WU33000050>. Acesso em. doi: DOI 10.1210/en.138.5.2163.

CHEMINEAU, P., et al. Control of Sheep and Goat Reproduction - Use of Light and Melatonin. **Animal Reproduction Science**, v.30, n.1-3, p.157-184. 1992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992KC70500008>. Acesso em. doi: Doi 10.1016/0378-4320(92)90010-B.

DAIR, E. L., et al. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. **Fertility and Sterility**, v.89, p.1299-1305. 2008. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000256075500002>. Acesso em. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.050.

DELGADILLO, J. A., et al. Out-of-season control of reproduction in subtropical goats without exogenous hormonal treatments. **Small Ruminant Research**, v.121, n.1, p.7-11. 2014. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000342540800003>. Acesso em. doi: 10.1016/j.smallrumres.2014.01.011.

DENICOLO, G., et al. Plasma progesterone concentrations during early pregnancy in spring- and autumn-bred ewes. **Animal Reproduction Science**, v.111, n.2-4, p.279-288. 2009. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000263763700013>. Acesso em. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.03.017.

DIXON, A. B., et al. Patterns of late embryonic and fetal mortality and association with several factors in sheep. **Journal of Animal Science**, v.85, n.5, p.1274-1284. 2007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000245852300021>. Acesso em. doi: 10.2527/jas.2006-129.

DOGAN, I.; Z. NUR. Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. **Veterinarni Medicina**, v.51, n.4, p.133-138. 2006. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237607100002>. Acesso em. doi: 10.17221/5532-Vetmed.

FLEMING, J. A. G. W., et al. Cloning of the ovine estrogen receptor-alpha promoter and functional regulation by ovine interferon-tau. **Endocrinology**, v.142, n.7, p.2879-2887. 2001. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169484800019>. Acesso em. doi: DOI 10.1210/en.142.7.2879.

GODKIN, J. D., et al. Ovine Trophoblast Protein-1, an Early Secreted Blastocyst Protein, Binds Specifically to Uterine Endometrium and Affects Protein-Synthesis. **Endocrinology**, v.114, n.1, p.120-130. 1984. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984RV65700018>. Acesso em. doi: DOI 10.1210/endo-114-1-120.

GOULET, F.; F. W. CASTONGUAY. Influence of lambing-to-rebreeding interval on ewe reproductive performance in the anestrous season. **Canadian Journal of Animal Science**, v.82, n.3, p.453-456. 2002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000179082900024>. Acesso em. doi: Doi 10.4141/A01-098.

HAAS, A. L., et al. Interferon induces a 15-kilodalton protein exhibiting marked homology to ubiquitin. **J Biol Chem**, v.262, n.23, p.11315-23. 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440890>. Acesso em. doi.

HAN, H. C., et al. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. **Journal of Endocrinology**, v.191, n.2, p.505-512. 2006. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242435800018>. Acesso em. doi: 10.1677/joe.1.07015.

HANSEN, T. R., et al. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.329-339. 1999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000083605300026>. Acesso em. doi.

HANSEN, T. R., et al. Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. **Reproduction in Domestic Ruminants VII**, v.67, p.325-340. 2010. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290717800024>. Acesso em. doi.

HANSEN, T. R., et al. Interferon RNA of embryonic origin is expressed transiently during early pregnancy in the ewe. **J Biol Chem**, v.263, n.26, p.12801-4. 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2458335>. Acesso em. doi.

HENKES, L. E., et al. Endocrine Action of Interferon-Tau on the Corpus Luteum in Sheep: Implication for Antiluteolytic and Luteotrophic Mechanisms. **Biology of Reproduction**, p.179-180. 2009. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273605500550>. Acesso em. doi.

IMAKAWA, K., et al. Interferon-Like Sequence of Ovine Trophoblast Protein Secreted by Embryonic Trophectoderm. **Nature**, v.330, n.6146, p.377-379. 1987. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987L039800086>. Acesso em. doi: DOI 10.1038/330377a0.

JOHNSON, G. A., et al. Expression of the interferon tau inducible ubiquitin cross-reactive protein in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.61, n.1, p.312-318. 1999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000081150200041>. Acesso em. doi: DOI 10.1095/biolreprod61.1.312.

JOYCE, M. M., et al. Interferon stimulated gene 15 conjugates to endometrial cytosolic proteins and is expressed at the uterine-placental interface throughout pregnancy in sheep. **Endocrinology**, v.146, n.2, p.675-684. 2005. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000226295300018>. Acesso em. doi: 10.1210/en.2004-1224.

KAYA, S., et al. The effectiveness of supplemental administration of progesterone with GnRH, hCG and PGF(2 alpha), on the fertility of Tuj sheep during the non-breeding season. **Small Ruminant Research**, v.113, n.2-3, p.365-370. 2013. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000321723900009>. Acesso em. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.03.018.

KERBLER, T. L., et al. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v.47, n.3, p.703-14. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728022>. Acesso em. doi: 10.1016/s0093-691x(97)00028-9.

KOHNO, H., et al. Comparison of estrus induction and subsequent fertility with two different intravaginal devices in ewes during the non-breeding season. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, n.6, p.805-812. 2005. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000234288100017>. Acesso em. doi: DOI 10.1262/jrd.17037.

KOSE, M., et al. Expression Profiles of Interferon-Tau Stimulated Genes (ISGs) in Peripheral Blood Leucocytes (PBLs) and Milk Cells in Pregnant Dairy Cows. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v.20, n.2, p.189-194. 2014. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000333080000004>. Acesso em. doi: 10.9775/kvfd.2013.9776.

LEVY, D., et al. Interferon-stimulated transcription: isolation of an inducible gene and identification of its regulatory region. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, n.23, p.8929-33. 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3466167>. Acesso em. doi: 10.1073/pnas.83.23.8929.

LINCOLN, G. A. Administration of Melatonin into the Mediobasal Hypothalamus as a Continuous or Intermittent Signal Affects the Secretion of Follicle-Stimulating-Hormone and Prolactin in the Ram. **Journal of Pineal Research**, v.12, n.3, p.135-144. 1992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JE43300007>. Acesso em. doi: DOI 10.1111/j.1600-079X.1992.tb00040.x.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v.76, n.9, p.1594-1601. 2011. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000297232900004>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.012.

MANN, G. E., et al. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. **Veterinary Journal**, v.171, n.3, p.500-503. 2006. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237560600018>. Acesso em. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.12.005.

MANN, G. E., et al. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v.79, n.1-2, p.71-79. 2003. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186208000006>. Acesso em. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00114-3.

MATSUYAMA, S., et al. Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10, n.1, p.1. 2012. Disponível em: <http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-10-21>. Acesso em. doi: 10.1186/1477-7827-10-21.

MIRANDA, V. O., et al. Estrus resynchronization in ewes with unknown pregnancy status. **Theriogenology**, v.106, p.103-107. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29049921>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.019.

MORRIS, D.; M. DISKIN. Effect of progesterone on embryo survival. **Animal**, v.2, n.8, p.1112-9. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22443722>. Acesso em. doi: 10.1017/S1751731108002474.

NEPHEW, K. P., et al. Relationship between Variation in Conceptus Development and Differences in Estrous-Cycle Duration in Ewes. **Biology of Reproduction**, v.44, n.3, p.536-539. 1991. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991EX84200021>. Acesso em. doi: DOI 10.1095/biolreprod44.3.536.

NISWENDER, G. D., et al. Luteal Function - the Estrous-Cycle and Early-Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.50, n.2, p.239-247. 1994. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994MW52100005>. Acesso em. doi: DOI 10.1095/biolreprod50.2.239.

OLIVEIRA, J. F., et al. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. **Endocrinology**, v.149, n.3, p.1252-1259. 2008. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253421900048>. Acesso em. doi: 10.1210/en.2007-0863.

OZYURTLU, N., et al. Characterization of Oestrous Induction Response, Oestrous Duration, Fecundity and Fertility in Awassi Ewes During the Non-breeding Season Utilizing both CIDR and Intravaginal Sponge Treatments. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.3, p.464-467. 2010. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000277873000014>. Acesso em. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01246.x.

POPE, W. F., et al. Dose-Response Relationships of Exogenous Progesterone Shortly after Ovulation on Estrous-Cycle Length, Blastocyst Development and Fertility in Sheep. **Animal Reproduction Science**, v.38, n.1-2, p.109-117. 1995. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995QP29600008>. Acesso em. doi: Doi 10.1016/0378-4320(94)01348-P.

PUGLIESI, G., et al. Corpus Luteum Development and Function after Supplementation of Long-Acting Progesterone During the Early Luteal Phase in Beef Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.1, p.85-91. 2014. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329677300017>. Acesso em. doi: 10.1111/rda.12231.

RECHT, M., et al. A human 15-kDa IFN-induced protein induces the secretion of IFN-gamma. **Journal of Immunology**, v.147, n.8, p.2617-23. 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1717569>. Acesso em. doi.

RICKARD, J. P., et al. Using transrectal ultrasound to examine the effect of exogenous progesterone on early embryonic loss in sheep. **PLoS One**, v.12, n.8, p.e0183659. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28841708>. Acesso em. doi: 10.1371/journal.pone.0183659.

ROBERTS, R. M., et al. Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. **Reproduction**, p.239-251. 2003. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000186202300019>. Acesso em. doi.

ROMERO, J. J., et al. Temporal Release, Paracrine and Endocrine Actions of Ovine Conceptus-Derived Interferon-Tau During Early Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.93, n.6. 2015. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000368081800010>. Acesso em. doi: ARTN 146
10.1095/biolreprod.115.132860.

ROSA, H. J. D.; M. J. BRYANT. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v.48, n.3, p.155-171. 2003. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183088600001>. Acesso em. doi: 10.1016/S0921-4488(03)00038-5.

ROSENFELD, C. S., et al. Expression of interferon receptor subunits, IFNAR1 and IFNAR2, in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.67, n.3, p.847-853. 2002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177668200021>. Acesso em. doi: 10.1095/biolreprod.102.004267.

ROTH, Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: Mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.238-244. 2008. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000257700600033>. Acesso em. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01168.x.

SATTERFIELD, M. C., et al. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.75, n.2, p.289-96.

2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16707766>>. Acesso em. doi: 10.1095/biolreprod.106.052944.

SHIRASUNA, K., et al. Upregulation of Interferon-stimulated Genes and Interleukin-10 in Peripheral Blood Immune Cells During Early Pregnancy in Dairy Cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, n.1, p.84-90. 2012. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000302106100012>. Acesso em. doi: DOI 10.1262/jrd.11-094K.

SHIRASUNA, K., et al. Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy. **Reproduction**, v.150, n.3, p.217-25. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26078085>>. Acesso em. doi: 10.1530/REP-15-0085.

SONG, G., et al. Progesterone and interferon tau regulate hypoxia-inducible factors in the endometrium of the ovine uterus. **Endocrinology**, v.149, n.4, p.1926-34. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174278>>. Acesso em. doi: 10.1210/en.2007-1530.

SONG, G., et al. Progesterone and interferon tau regulate leukemia inhibitory factor receptor and IL6ST in the ovine uterus during early pregnancy. **Reproduction**, v.137, n.3, p.553-565. 2009. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264244700016>. Acesso em. doi: 10.1530/Rep-08-0437.

SPENCER, T. E.; F. W. BAZER. Temporal and Spatial Alterations in Uterine Estrogen-Receptor and Progesterone-Receptor Gene-Expression during the Estrous-Cycle and Early-Pregnancy in the Ewe. **Biology of Reproduction**, v.53, n.6, p.1527-1543. 1995. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995TF46000035>. Acesso em. doi: DOI 10.1095/biolreprod53.6.1527.

SPENCER, T. E.; F. W. BAZER. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v.7, p.D1879-D1898. 2002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177303000003>. Acesso em. doi: DOI 10.2741/spencer.

SPENCER, T. E., et al. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v.128, n.6, p.657-668. 2004a. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000225832700002>. Acesso em. doi: 10.1530/rep.1.00398.

SPENCER, T. E., et al. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, n.1, p.65-78. 2007. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242736300008>. Acesso em. doi: 10.1071/Rd06102.

SPENCER, T. E., et al. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from domestic animals. **Biology of Reproduction**, v.71, n.1, p.2-10. 2004b. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000222220700003>. Acesso em. doi: 10.1095/biolreprod.103.024133.

SPENCER, T. E., et al. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction**, v.135, n.2, p.165-179. 2008. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252988200006>. Acesso em. doi: 10.1530/Rep-07-0327.

SUBRAMANIAM, P. S., et al. So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. **Cytokine**, v.15, n.4, p.175-87. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11563878>. Acesso em. doi: 10.1006/cyto.2001.0905.

TALUKDER, A. K., et al. Oviduct epithelium induces interferon-tau in bovine Day-4 embryos, which generates an anti-inflammatory response in immune cells. **Scientific Reports**, v.8. 2018. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000432441400038>. Acesso em. doi: ARTN 7850
10.1038/s41598-018-26224-8.

THIERY, J. C., et al. Neuroendocrine interactions and seasonality. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, n.1-2, p.87-100. 2002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177638200010>. Acesso em. doi: Pii S0739-7240(02)00148-0
Doi 10.1016/S0739-7240(02)00148-0.

UNGERFELD, R., et al. Medroxyprogesterone priming and response to the ram effect in Corriedale ewes during the nonbreeding season. **Theriogenology**, v.60, n.1, p.35-45. 2003. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000182533800005>. Acesso em. doi: 10.1016/S0093-691x(02)01302-X.

WALES, R. G.; C. L. CUNEO. Morphology and Chemical-Analysis of the Sheep Conceptus from the 13th to the 19th Day of Pregnancy. **Reproduction Fertility and Development**, v.1, n.1, p.31-39. 1989. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1989U106100003>. Acesso em. doi: Doi 10.1071/Rd9890031.

WANG, X. L., et al. A Potential Autocrine Role for Interferon Tau in Ovine Trophectoderm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, n.5, p.819-825. 2013. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000324334000020>. Acesso em. doi: 10.1111/rda.12169.

WILTBANK, M. C., et al. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.239-53. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27238438>. Acesso em. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.037.

YAO, N., et al. Expression of Interferon-tau mRNA in Bovine Embryos Derived from Different Procedures. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, n.1, p.132-139. 2009. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262487500023>. Acesso em. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.01009.x.