

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

Alessandra Bridi

**INTERFERON TIPO I PRODUZIDO POR EMBRIÕES *IN VITRO* NA
SINALIZAÇÃO ENDÓCRINA ANTERIOR AO PERÍODO CLÁSSICO
DE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS**

**Santa Maria, RS
2017**

Alessandra Bridi

**INTERFERON TIPO I PRODUZIDO POR EMBRIÕES *IN VITRO* NA
SINALIZAÇÃO ENDÓCRINA ANTERIOR AO PERÍODO CLÁSSICO DE
RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS**

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
Coorientador: Dra. Kalyne Bertolin

Santa Maria, RS
2017

Alessandra Bridi

**INTERFERON TIPO I PRODUZIDO POR EMBRIÕES *IN VITRO* NA
SINALIZAÇÃO ENDÓCRINA ANTERIOR AO PERÍODO CLÁSSICO DE
RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS**

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 26 de Janeiro de 2017:

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

Fernando Silveira Mesquita, Dr. (Unipampa)

Luiz Ernani Henkes, Dr. (UFSC)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora Aparecida por sempre me abençoarem no meu caminho, por me darem a oportunidade de viver, por me proporcionarem momentos bons e ruins que foram necessários para que eu pudesse crescer pessoalmente e profissionalmente.

Aos meus pais, Arcemar e Vanilda, por terem aceitado a missão de me terem como filha, por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida me dando muita atenção, carinho e amor. Amo vocês.

Às minhas tias Arivane e Auriete, e ao meu tio Ronaldo, por todo o apoio, carinho, amizade, confiança e compreensão. Amo vocês.

À minha irmã Vanessa, por toda a paciência e carinho.

À minha amiga e irmã do coração, Taiara Muller da Silva, por todos os momentos bons e ruins que passamos juntas sempre apoiando uma a outra. Às amigas, Elisiane, Caiane, Mariani, Margarida, Cibele, Suelen, Alice e Anieli muito obrigada pela amizade e pelos momentos bons que passamos juntas.

Ao meu orientador professor Alfredo Quites Antoniazzi pelos ensinamentos, amizade, paciência e dedicação.

À minha coorientadora e amiga Kalyne Bertolin, pela amizade, pelo apoio e por tudo o que fizestes por mim neste período principalmente os ensinamentos e a paciência dedicada nos momentos mais difíceis.

Agradeço aos professores Paulo Bayard Dias Gonçalves e Fabio Vasconcellos Comim pela convivência, ensino e amizade.

Aos colegas do BioRep pelo aprendizado, convivência e auxílio para que este trabalho fosse possível, em especial àqueles que nunca mediram esforços para me ajudar, meus sinceros agradecimentos pela amizade, ajuda e apoio.

À equipe do LMMD/USP-FZEA, em especial ao Juliano, Ana Clara e Gabriella pela receptividade, amizade, ensinamentos e ajuda.

À secretária do PPGMV, Maria Moro da Rosa pela amizade, auxílio e apoio.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

INTERFERON TIPO I PRODUZIDO POR EMBRIÕES *IN VITRO* NA SINALIZAÇÃO ENDÓCRINA ANTERIOR AO PERÍODO CLÁSSICO DE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS

AUTORA: Alessandra Bridi

ORIENTADOR: Alfredo Quites Antoniazzi

O período de reconhecimento materno da gestação em bovinos caracteriza-se por ser o processo pelo qual o conceito, através da produção de interferon-tau (IFNT) sinaliza sua presença no útero materno. O IFNT tem como principal função manter o corpo lúteo produzindo progesterona necessária para o estabelecimento e manutenção da gestação. O conceito secreta vesículas extracelulares que carregam proteínas responsáveis pela sinalização entre o embrião e organismo materno no período de pré-implantação. Ainda, vesículas extracelulares secretadas pelo endométrio de bovinos entram no trofotoderma do conceito e estimulam a produção de IFNT. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se o IFNT secretado por embriões produzidos *in vitro* (FIV) é capaz de mimetizar a sinalização endócrina em cultivo de células luteais e identificar se essa comunicação mediada pelo IFNT ocorre na forma de proteína livre ou via exossomo. No experimento 1 foi avaliada a capacidade do cultivo primário de células luteais de responder ao interferon tipo I. A expressão de *ISG15* aumentou de uma maneira dose-dependente atingindo o platô quando as células luteais foram tratadas com 10ng/ml de interferon-alfa. No experimento 2, células luteais tratadas com meio condicionado por embriões ativados partenogeneticamente (paSOF) cultivados até os 12 dias de desenvolvimento, apresentaram um aumento na expressão de RNAm para *ISG15* quando comparados com os grupos que receberam paSOFD7 e paSOFD9. No ensaio antiviral foi detectada uma maior atividade de interferon tipo I no paSOFD9 e 12 do que no grupo paSOFD7. No experimento 3, embriões produzidos por FIV foram cultivados até os dias 7, 9 e 12 de desenvolvimento e posteriormente foi coletado o meio condicionado. A expressão de RNAm para *IFNT2* foi avaliada nestes embriões FIV com 7, 9 e 12 dias. Nos embriões do dia 9, a expressão de RNAm para *IFNT2* foi maior que nos embriões do dia 7, e nenhuma diferença foi observada nos embriões do dia 12. O meio condicionado por embriões FIV com 7, 9 e 12 dias foi utilizado no tratamento do cultivo de células luteais e posteriormente foi avaliada a expressão de RNAm para *ISG15*. As células luteais tratadas com ivfSOF (SOF condicionado por embriões FIV até os dias 7, 9 e 12, antes da ultracentrifugação) e SN (SOF condicionado por embriões FIV até os dias 7, 9 e 12, após a ultracentrifugação, sem vesículas extracelulares) apresentaram um aumento na expressão de *ISG15* quando comparadas com EVs (pellet enriquecido com exossomos obtidos após ultracentrifugação do SOF condicionado por embriões FIV). Vesículas extracelulares foram marcadas com PKH67 e observou-se sua presença dentro das células luteais. Desta forma, percebe-se que o cultivo de células luteais respondeu ao tratamento com interferon tipo I presente no meio condicionado por embriões PA e FIV já no dia 7 de desenvolvimento e esta comunicação ocorre usando interferons na forma de proteína livre.

Palavras-chave: Corpo lúteo. Bovinos. Células luteais. IFNT. ISG15. Exossomos.

ABSTRACT

***IN VITRO* EMBRYOS-DERIVED TYPE I INTERFERON ON ENDOCRINE SIGNALING BEFORE CLASSIC PERIOD OF MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY IN BOVINES**

AUTHOR: Alessandra Bridi
ADVISOR: Alfredo Quites Antoniazzi

Maternal recognition of pregnancy period in bovine is characterized when the concept secretes IFNT and signals its presence inside maternal uterus. IFNT main function is to maintain corpus luteum producing progesterone to establishment and maintain pregnancy. Conceptus derived-extracellular vesicles transport proteins responsible for signaling to the maternal organism in the pre-attachment period. Also, extracellular vesicles secreted by bovine endometrium stimulate conceptus trophectoderm IFNT production. Therefore, the aim this study was to evaluate whether *in vitro* fertilized (IVF) embryo-derived IFNT is capable to stimulate ISG15 expression in luteal cells culture, and also to identify if IFNT signal occurs in free protein form or via exosome. In experiment 1, it was evaluated if primary luteal cells culture responds to type I interferon treatment. *ISG15* mRNA expression increased in luteal cells culture in a dose dependent manner reaching a plateau at 10ng/ml of interferon-alpha. In experiment 2, luteal cells culture treated with Day 12 conditioned medium by parthenogenetic activated embryos (paSOF), increased *ISG15* mRNA expression when compared to paSOF from Days 7 and 9. Antiviral assay detected a greater bioactivity of type I interferon on Days 9 and 12 paSOF when compared to paSOF from Day 7. In experiment 3, IVF produced embryos were cultured until Days 7, 9 and 12 of development and followed by conditioned medium collection. *IFNT2* mRNA expression was assessed on embryos from Days 7, 9 and 12 of development. On Day 9, *IFNT2* mRNA expression was greater than Day 7, and no difference was observed on Day 12. ISG15 expression was evaluated on luteal cells culture treated with conditioned medium from IVF produced embryos on Days 7, 9 and 12 of development. Luteal cells culture treated with ivfSOF (SOF from embryos before of ultracentrifugation) and SN (SOF from embryos after of ultracentrifugation, depleted of extracellular vesicles) increased ISG15 mRNA expression when compared to EVs (pellet enriched with exosome obtained after ultracentrifugation of SOF from IVF embryos). Extracellular vesicles were labeled with PHK67 and their presence was observed inside the luteal cells. It is concluded, luteal cells culture respond to Type I interferon treatment present in the conditioned medium from IVF embryos as early as Day 7 of development, and this communication using interferons occurs in the free protein form.

Keywords: Corpus luteum. Cattle. Luteal cells. IFNT. ISG15. Exosomes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Rota esteroidogênica em células luteais	15
Figura 2 - Desenvolvimento embrionário inicial do conceito ovino	19
Figura 3 - Sinalização parácrina do IFNT com o endométrio no período de reconhecimento materno da gestação	22
Figure 1 - <i>ISG15</i> mRNA expression in luteal cells culture following treatment with different concentrations of IFN-alpha or conditioned SOF from parthenogenetic embryos on Days 7, 9 or 12	59
Figure 2 - Steroidogenesis and cell survival gene expression on IFN-alpha treated luteal cells	60
Figure 3 - Steroidogenesis and cell survival gene expression on luteal cells treated with SOF from parthenogenetic embryos	61
Figure 4 - <i>IFNT2</i> and cell survival gene expression in IVF embryos at different embryonic developmental days	62
Figure 5 - EVs in the conditioned medium from IVF embryos on Days 9	63
Figure 6 - <i>ISG15</i> mRNA expression in luteal cells culture following treatment with ultracentrifuged SOF from embryos on Days 7, 9 or 12	64
Figure 7 - <i>IFNAR1</i> and <i>IFNAR2</i> mRNA concentration in luteal cells treated with conditioned medium from IVF embryos	65
Figure 8 - Cell survival gene expression in luteal cells treated with conditioned medium from IVF embryos	66

LISTA DE TABELA

Table 1 - Real time PCR primer sequences..... 57

Table 2 - Progesterone (P4) production by luteal cells *in vitro* at 12h following cell adaptation to the culture and 24h following treatment with IFN-alpha or conditioned synthetic oviduct fluid (SOF) of parthenogenetic (PA) embryos 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 CORPO LÚTEO E LUTEÓLISE	13
2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO	16
2.3 INTERFERON TAU.....	18
2.4 AÇÕES DO INTERFERON TAU	19
2.5 EXOSSOMOS NA REPRODUÇÃO	22
3 CAPÍTULO 1	25
4 CONCLUSÃO.....	67
5 REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

Perdas embrionárias no início da gestação influenciam significativamente o retorno ao estro em bovinos de corte e de leite, sendo que cerca de 40% destas perdas embrionárias ocorrem entre os dias 8 e 17 do ciclo estral (Thatcher *et al.*, 2001). Este período corresponde à fase de eclosão do blastocisto e posterior alongamento do concepto, principalmente do trofoblasto, que secreta interferon-tau (IFNT) para que ocorra o reconhecimento materno da gestação em ruminantes (Mamo *et al.*, 2012). Portanto, existe a necessidade de melhorar o entendimento da comunicação entre o embrião e a mãe durante o período de reconhecimento materno da gestação.

O período clássico em que o concepto bovino secreta IFNT para sinalizar sua presença dentro do organismo materno ocorre entre os dias 12 a 26 de gestação (Farin *et al.*, 1990). Entretanto, avanços nas pesquisas sobre reconhecimento materno da gestação em ruminantes tem demonstrado que o concepto bovino sinaliza sua presença anteriormente a esse período. Estudos recentes reportam que a preparação endometrial à receptividade embrionária que pode ocorrer tão cedo quanto o dia 4 em função do aumento da concentração de hormônios esteroides oriundos de folículos grandes (Mesquita *et al.*, 2015). No dia 7 após inseminação artificial, o concepto é capaz de estimular a expressão de ISGs na junção útero-tubárica ipsilateral ao corpo lúteo (Sponchiado *et al.*, 2016), demonstrando que a secreção da proteína IFNT pode ocorrer antes do período clássico de reconhecimento materno da gestação.

O IFNT é uma citocina que age de maneira parácrina no útero, diminuindo a expressão de receptores de estrógenos e ocitocina no endométrio, possibilitando a manutenção do corpo lúteo (Roberts *et al.*, 1999). Além da função antiluteolítica, o IFNT estimula a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) no endométrio (Austin *et al.*, 2004) e em outros tecidos (Han *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008). A sinalização com o IFNT durante o reconhecimento materno da gestação também ocorre de maneira endócrina, pois proteínas expressas simultaneamente no endométrio e em outros tecidos extra-uterinos foram detectadas durante o início da gestação em ruminantes (Oliveira *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2010; Antoniazzi *et al.*, 2013).

Em ovelhas, o IFNT secretado pelo concepto chega na veia uterina e induz a expressão de ISGs nos vasos que drenam o útero (Antoniazzi, 2010 – dados não publicados) e em tecidos extra-uterinos (Gifford *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2010) nos estágios iniciais da gestação. Além disso, o IFNT atua em tecidos extrauterinos através da circulação sistêmica, chegando no corpo lúteo, estimulando síntese de ISGs nas células luteais

(Gifford *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2010). Concentrações de IFNT biologicamente ativo foi maior no sangue da veia uterina em ovelhas com 15 dias de gestação (Oliveira *et al.*, 2008). A infusão contínua de IFNT na circulação sistêmica por 3 dias em ovelhas cíclicas fez com que esses animais conseguissem manter a concentração sérica de progesterona compatível com a da gestação 24 horas após receberem a aplicação de prostaglandina F2 alfa (PGF) (Antoniazzi *et al.*, 2013). Portanto, existem fortes evidências de que a sinalização endócrina tem papel determinante durante o período inicial do reconhecimento da gestação em ruminantes.

Atualmente, sabe-se que o conceito no período de pré-implantação e o endométrio são capazes de secretar vesículas extracelulares (EVs) (Saadeldin *et al.*, 2015), onde incluem-se basicamente os exossomos, microvesículas e os corpos apoptóticos (György *et al.*, 2011) que podem atuar na comunicação celular entre células vizinhas ou tecidos distantes (Ng *et al.*, 2013). Os exossomos, um subgrupo de EVs apresentam-se como nanovesículas (30-120 nm) que transportam lipídeos, proteínas, RNAs e miRNAs (Mathivanan *et al.*, 2010), com funções de controlar rotas patológicas ou fisiológicas (Ng *et al.*, 2013).

MiRNAs transportados pelos exossomos participam na divisão celular e na ativação do genoma no período de desenvolvimento embrionário bovino (Kropp *et al.*, 2014). EVs purificadas do lavado uterino de ovelhas no dia 14 do ciclo estral foram marcadas e infundidas no lúmen uterino de ovelhas prenhes, e, aos 14 dias de gestação foram observadas no trofoblasto do conceito e epitélio uterino (Burns *et al.*, 2016). O epitélio uterino secreta exossomos que possuem RNAm de “ovine endogenous jaagsiekte retroviruses” (enJSRV) que atua via “receptores toll-like”(TLR) no trofoblasto do conceito ovino e estimula a secreção de IFNT (Ruiz-González *et al.*, 2015). Além disso, proteínas presentes dentro de exossomos derivados do conceito são capazes de estimular a expressão de ISGs pelo endométrio melhorando, desta maneira, o ambiente uterino para a implantação do conceito (Nakamura *et al.*, 2016).

Desta maneira, nossa hipótese é que o IFNT secretado pelo conceito bovino produzido *in vitro* aumente a expressão de ISGs no cultivo de células luteais. Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar a capacidade do IFNT produzido por conceitos bovinos mantidos em cultivo *in vitro* até os dias 7, 9 e 12 de desenvolvimento embrionário, de sinalizar no cultivo de células luteais; 2) identificar se o IFNT atua na forma de proteína livre ou via exossomos secretados pelo trofotoderma do conceito bovino na sinalização que ocorre no cultivo de células luteais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O reconhecimento materno da gestação em ruminantes é o mecanismo pelo qual o conceito sinaliza sua presença para a mãe. A finalidade desta sinalização é a de evitar o retorno à ciclicidade e conseqüentemente permitir a manutenção da gestação. Inicialmente o mecanismo era descrito como uma sinalização que ocorria entre o conceito e a mãe para evitar a regressão do corpo lúteo e manter a produção de progesterona estável durante a gestação. Posteriormente foi identificada a participação do interferon-tau nessa sinalização. Os interferons são citocinas com ações principalmente antivirais, que nesse período no início da gestação desempenham uma ação reprodutiva específica. Nesse momento, estudos estabelecem o mecanismo de reconhecimento materno da gestação como um evento parácrino que inibe pulsos luteolíticos de prostaglandina F₂ alfa (PGF), sendo esse conceito mantido por muitos anos. Recentemente foi demonstrado que esse mecanismo possuía um componente endócrino, e que a manutenção do corpo lúteo tinha a participação do interferon-tau. Atualmente sabe-se que o mecanismo de reconhecimento de gestação não é somente um evento local, possui componentes sistêmicos com rotas de sinalização autócrina, parácrina e endócrina; além de diversas maneiras de sinalização celular, como moléculas livres, ligadas à proteínas plasmáticas, ou como componentes de vesículas extracelulares. A seguir encontra-se uma breve revisão de literatura para um melhor entendimento dos eventos relacionados ao mecanismo de reconhecimento materno da gestação em ruminantes.

2.1 CORPO LÚTEO E LUTEÓLISE

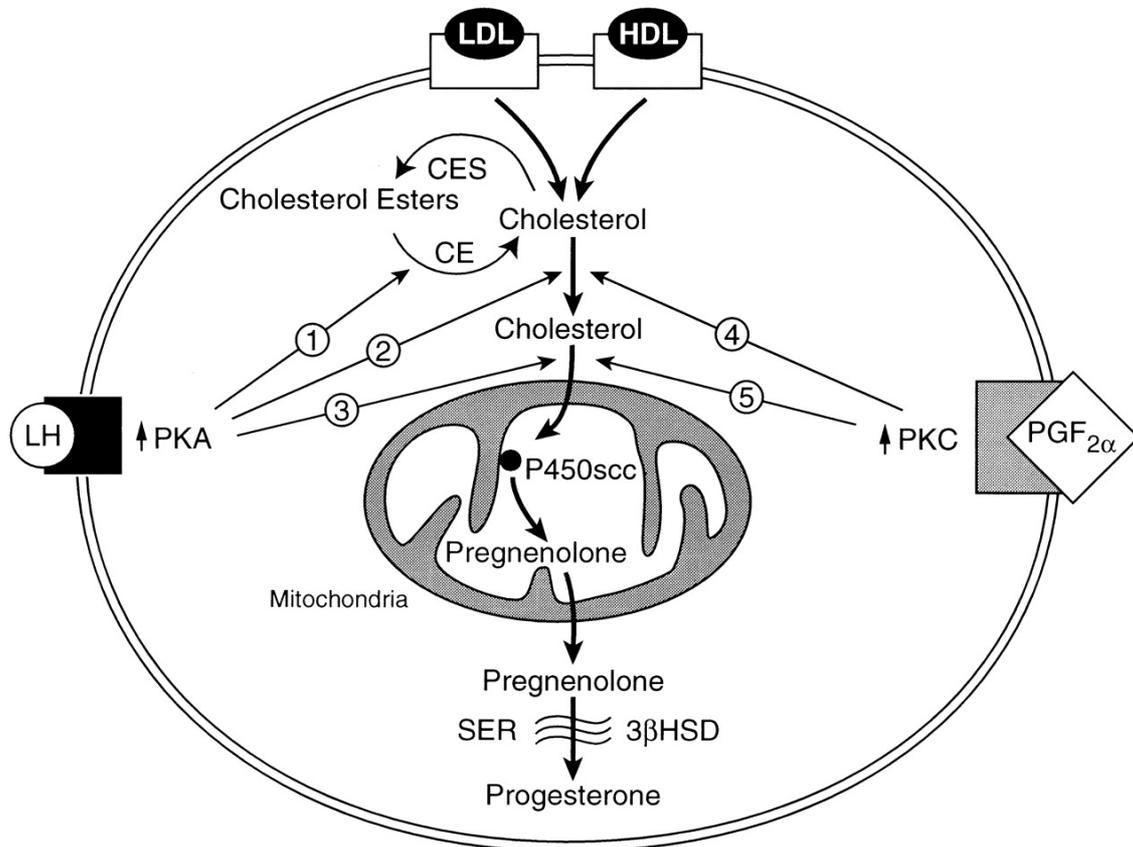
Em 1573, COITER descreveu a presença de cavidades cheias de um sólido amarelo no ovário de mulheres (1573 *apud* (Mccracken *et al.*, 1999)). Mais tarde, o número destas estruturas ovarianas foi relacionado com o número de fetos no útero de mamíferos (GRAAF, 1943 *apud* (Mccracken *et al.*, 1999)) e após ser realizada a descrição microscópica desta estrutura, ela passou a ser chamada de corpo lúteo (CL) (MALPIGHI, 1689 *apud* (Mccracken *et al.*, 1999)). Além disso, foi descoberto que a presença do CL no ovário inibia a ovulação e o estro durante a gestação (BEARD, 1897 *apud* (Mccracken *et al.*, 1999)), sugeriu-se então que ele pudesse ser uma glândula de secreção interna (PRENANT, 1898 *apud* (Mccracken *et al.*, 1999)).

Atualmente, sabe-se que o CL é uma glândula temporária que se origina de um folículo após a ovulação, secretando principalmente progesterona (P4), que é responsável pela ciclicidade e manutenção da gestação na maioria dos mamíferos (Niswender *et al.*, 2000). Instantes antes da ovulação, ocorre o pico de LH e, com isso, a luteinização das células da granulosa e teca, dando origem a alterações na rota esteroidogênica para produção de P4 pelas células luteais (Wuttke *et al.*, 1998). O LH, após ligar-se ao seu receptor, induz a ativação de adenilciclase e, subsequentemente, o aumento nos níveis de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). O processo de luteinização resulta em mudanças estruturais e funcionais no ovário. Ocorre ruptura da membrana basal que separa a camada da teca e da granulosa no folículo, e mudanças bioquímicas são determinadas, fazendo com que estruturas ovarianas que secretam predominantemente andrógeno (teca) e estrógeno (granulosa), passem a secretar P4 (Niswender, 2002). A presença de cAMP estimula a esteroidogênese, facilitando o transporte de colesterol para dentro da célula e do meio intracelular para dentro da mitocôndria, resultando em aceleração da conversão de colesterol em pregnenolona pela ação da enzima clivadora de cadeia lateral (P450_{scc}), localizada na membrana interna da mitocôndria (Figura 1). A pregnenolona é convertida em progesterona pela enzima 3 beta- hidroxisteróide desidrogenase (3Beta-HSD) que está presente no retículo endoplasmático liso (Niswender, 2002).

As células da granulosa são transformadas em células luteais grandes e as células da teca em células luteais pequenas. A estrutura do CL é formada pelas células luteais, células endoteliais, fibroblastos e leucócitos (Channing, 1969). As células luteais esteroidogênicas foram isoladas e identificadas em ovelhas (Fitz *et al.*, 1982) por meio de características morfológicas e bioquímicas (Niswender *et al.*, 2000). As células luteais grandes secretam aproximadamente 7 vezes mais progesterona quando comparada com as pequenas, sem a presença de estímulos (Kenny *et al.*, 1989), sendo conhecidas como esteroidogênicas constitutivas, pois possuem proteína quinase A (PKA) ativa (Bogan e Niswender, 2007).

O processo de lise do CL é composto pelo período de luteólise funcional, que é caracterizada pela diminuição na secreção de P4 e, pelo período estrutural onde ocorre a regressão do CL (Davis e Rueda, 2002). A PGF é produzida no endométrio durante todo o ciclo estral, mas sua concentração máxima é atingida no momento da luteólise (Rueda *et al.*, 1995). No endométrio de ovelhas os pulsos luteolíticos de PGF são regulados pela ocitocina (OXT), E2 e P4 (Bazer *et al.*, 1994). A OXT secretada pelo CL e pela neurohipófise está presente em altas quantidades nos dias 14 e 16 do ciclo estral de ovelhas, estimulando a liberação de pulsos de PGF pelo endométrio (Bazer *et al.*, 2012).

Figura 1 – Rota esteroidogênica em células luteais. 1) Aumento da atividade da enzima que hidrolisa ésteres de colesterol, 2) transporte de colesterol dentro do citoplasma e 3) entrada de colesterol para dentro da mitocôndria pela ativação da PKA. 4) Diminuição do transporte de colesterol citoplasmático e 5) para dentro da mitocôndria após ativação da PKC.



Fonte: (NISWENDER, et al., 2000, p. 10)

A progesterona quando ligada ao seu receptor bloqueia a expressão dos receptores de estrógeno (ESR1) e dos receptores de oxitocina (OXTR). No dia 13 do ciclo estral de ovelhas, concentrações de progesterona diminuem a expressão dos seus receptores permitindo um rápido aumento de E2. O estrógeno produzido pelos folículos maduros estimula a expressão de ESR1, receptores de progesterona (PGR) e OXTR no endométrio uterino. O aumento na expressão de OXTR permite a ação da OXT, que é a de garantir a frequência necessária de pulsos de PGF para que ocorra a luteólise (Spencer e Bazer, 1995; Mccracken *et al.*, 1999). Desta forma, caso não aconteça a gestação, a progesterona prepara o endométrio uterino para secretar PGF (Mccracken *et al.*, 1999).

A secreção pulsátil de PGF, estimulada pela OXT ligada no OXTR, aumenta a atividade da fosfolipase C (PLC), que leva à produção de inositol trifosfato e diacilglicerol. Estes mensageiros intracelulares aumentam ainda mais a secreção de PGF por aumentarem a expressão de fosfolipase A2, que aumenta a disponibilidade de ácido araquidônico para ser metabolizado por prostaglandina endoperóxido sintetase 2 (PTGS2) em PGF. Com isso, a secreção de PGF é controlada pela disponibilidade de ácido araquidônico e de PTGS2 (para revisão (Bazer *et al.*, 2012)).

A PGF chega no ovário por mecanismo de contracorrente, ou seja, da veia útero-ovariana para artéria ovariana (Ginther, 1974; Ginther e Del Campo, 1974), evitando que o hormônio passe pelos pulmões e seja inativado. Embora os mecanismos de luteólise e de atuação da PGF na regressão do CL não estejam totalmente elucidados, há evidências que a involução estrutural do CL é mediada por apoptose, desta maneira caracterizando o período de luteólise estrutural (Rueda *et al.*, 1995; Carambula *et al.*, 2002).

A progesterona é fundamental no início da gestação, inicialmente por promover um ambiente uterino favorável à gestação. Esta proporciona o relaxamento do miométrio, estimula a produção de MUC-1, uma proteína que evita a aderência do concepto ao endométrio e continue alongando produzindo IFNT (Johnson, Bazer, *et al.*, 2001), estimula a produção de histotrofo pelas glândulas endometriais (Forde e Lonergan, 2012). Estudos *in vitro* possibilitam que determinados fatores possam ser analisados separadamente o que mostra a importância de se ter um cultivo de células luteais bem estabelecido. O cultivo de células luteais oriundos de corpos lúteos de início ciclo produzem maior quantidade de progesterona quando comparados com os do meio do ciclo (Batista *et al.*, 2012). Alguns fatores podem ser utilizados na caracterização do cultivo de células luteais como: atividade da enzima esteroidogênia 3 β -HSD (Batista *et al.*, 2012), avaliação da produção de progesterona (Batista *et al.*, 2012; Shirasuna *et al.*, 2015) e avaliação morfológica do cultivo (Yoshioka *et al.*, 2013).

2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

O processo fisiológico pelo qual o embrião sinaliza a sua presença no sistema materno e prolonga o tempo de vida do CL no ovário é denominado de reconhecimento materno da gestação (Bazer *et al.*, 1991). Estudos mostraram que embriões transferidos para úteros com porções isoladas mantiveram 80% dos corpos lúteos adjacentes ao corno uterino gravídico. Já

os transferidos para o corno uterino contralateral não tiveram nenhum efeito na vida do CL. Em receptoras que possuíam CLs nos dois ovários, os embriões transferidos foram capazes de manter somente os CLs no ovário ipsilateral (Moor e Rowson, 1966).

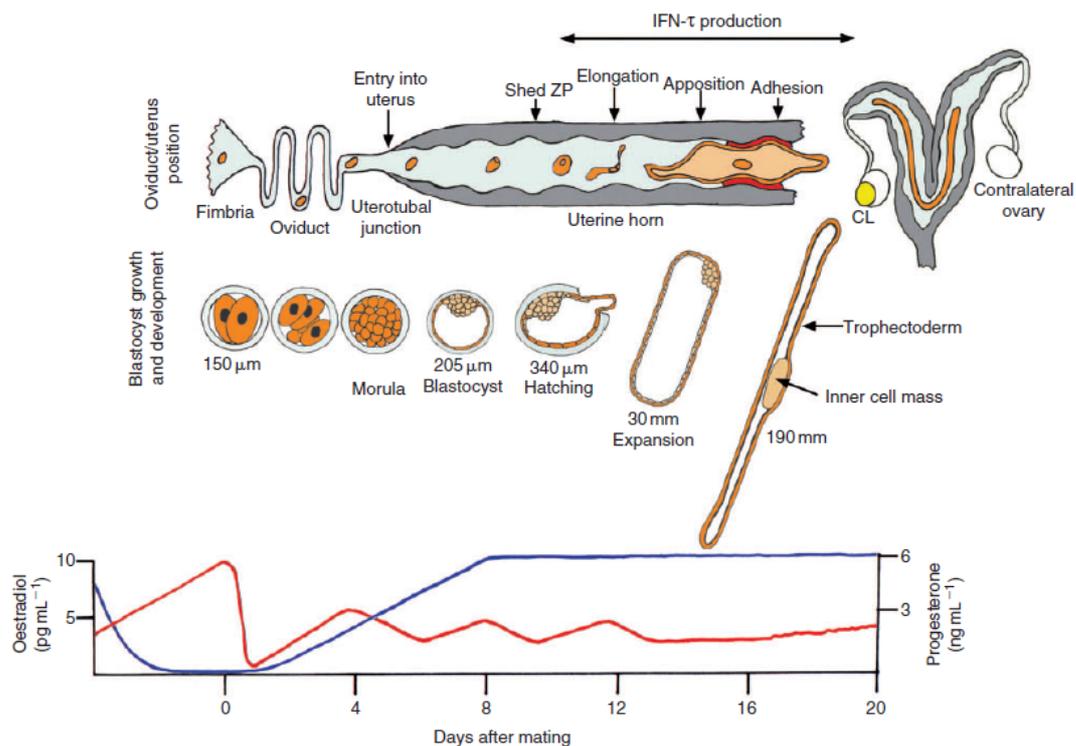
Após a fecundação, inicia-se o processo de formação do embrião (Figura 2). As fases de desenvolvimento embrionário inicial de bovinos são: zigoto, mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido (Bó e Mapletoft, 2013). A fase de mórula acontece quando o embrião entra no útero 4 a 6 dias após a fertilização do oócito. Em seguida, evolui para a forma de blastocisto, que possui uma massa celular interna (embrioblasto) e uma cavidade blastocele rodeada por uma monocamada de trofotoderma. Com 8-9 dias, ocorre a eclosão do blastocisto da zona pelúcida. O blastocisto cresce lentamente de forma tubular ou ovóide e passa a se chamar de concepto (embrião e membranas extraembrionárias). O concepto começa a alongação com 12 dias em ovelhas e 15 dias em bovinos, formando um filamento de 10 a 15 cm, que ocupa todo o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (para revisão (Dorniak *et al.*, 2013)). Na fase de alongação ocorre aumento exponencial do comprimento e peso do trofotoderma (Wales e Cuneo, 1989) e início da diferenciação das membranas extraembrionárias, incluindo a gastrulação do embrião e formação do saco vitelino e alantoide, que são vitais para a sobrevivência embrionária e formação de uma placenta funcional (Guillomot, 1995).

Em ovinos, o concepto secreta IFNT entre os dias 10 e 25, com pico de secreção entre os dias 14 e 16 de gestação (Roberts *et al.*, 1996). Já em bovinos, a secreção ocorre nos dias 12 a 26, com pico entre os dias 15 e 16 (Farin *et al.*, 1990). O IFNT é o sinal de reconhecimento da gestação produzido pelo concepto em ruminantes. O IFNT inibe a expressão de ESR1 e, portanto a expressão de receptores de ocitocina (OXTR) no endométrio uterino prevenindo a produção pulsátil de PGF luteolítica. Entretanto, a produção basal de PGF é maior em ovelhas prenhas do que nas cíclicas devido à expressão contínua de PTGS2 no endométrio uterino, bem como a produção de prostaglandinas pelo concepto (Spencer e Bazer, 2002).

Além do IFNT, o embrião bovino no dia 13 de desenvolvimento também secreta prostaglandinas, como a PGF, a prostaglandina E2 (PGE2) e a prostaglandina I2 (PGI2) que atuam de maneira parácrina com o endométrio, regulando diferentemente a expressão de genes e funções que são provavelmente importantes para a receptividade uterina, crescimento e desenvolvimento do concepto durante o início da gestação (Spencer *et al.*, 2013). A PGF aumenta a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) no endométrio uterino em novilhas com 13 dias de gestação (Spencer *et al.*, 2013). Em ovelhas com 14 dias de gestação,

a infusão de PGF e PGI2 aumenta a expressão ISGs no endométrio uterino (Spencer *et al.*, 2013).

Figura 2 – Desenvolvimento embrionário inicial no conceito ovino.



Fonte: (SPENCER, et al., 2007, p. 66)

2.3 INTERFERON TAU

O grupo dos interferons tipo 1 (IFN-I) é composto pelo interferon-alfa (IFN- α) (Nagata *et al.*, 1980), interferon beta (IFN- β) (Taniguchi *et al.*, 1980), interferon-ômega (IFN- ω) (Hauptmann e Swetly, 1985), interferon-kappa (IFN- κ) (Lafleur *et al.*, 2001) e interferon-tau (IFN- τ) em ruminantes (Roberts *et al.*, 1999). Na resposta imunológica os IFN-I (principalmente o IFN- α e o IFN- β) são secretados por células infectadas no meio extracelular e ligam-se nos seus receptores IFNAR1 e IFNAR2, e atuam via Jak/stat (Binelli *et al.*, 2001).

O interferon-tau (IFNT) é uma proteína composta por 172 aminoácidos presente somente em ruminantes. O seu gene possui uma única região de leitura de 595 pares de bases, que codifica a sequência primária (pré-proteína), com uma região sinalizadora de 23

aminoácidos que é clivada para formar a proteína com 172 aminoácidos (Roberts *et al.*, 2003).

O início da expressão do gene do IFNT parece ser programado geneticamente independente do ambiente uterino, pois ele é expresso em sistemas *in vivo* e *in vitro*. No entanto, a produção de IFNT é influenciada pelo ambiente uterino, pois a produção *in vitro* aumenta na presença de tecido uterino (Kerbler *et al.*, 1997). A síntese de RNAm para IFNT inicia-se no dia 4 no estágio de 16 células no embrião resultante da fertilização *in vitro* (FIV) (Yao *et al.*, 2009). A expressão termina com a implantação, pois o contato do trofoblasto com o endométrio cessa a produção de IFNT (Demmers *et al.*, 2001).

2.4 AÇÕES DO INTERFERON TAU

O IFNT pode atuar de maneira parácrina, endócrina e autócrina no reconhecimento materno da gestação em ruminantes. O IFNT pode atuar como um importante fator autócrino na regulação de células proliferativas do trofotoderma ovino. Sugere-se que o IFNT, na sinalização autócrina, liga-se no receptor IFNAR1 expresso no trofotoderma do embrião com 15 e 20 dias de gestação para desempenhar sua ação (Wang *et al.*, 2013). Células de trofotoderma ovino (oTr-1) foram cultivadas com IFNT recombinante bovino (rbIFNT) e apresentaram aumento na expressão de ISGs, como gene estimulado pelo interferon 15 (ISG15) e 2',5' oligoadenilato sintetase (OAS1) (Wang *et al.*, 2013). O aumento na proliferação das células oTr-1 foi dose-dependente à quantidade de rbIFNT (Wang *et al.*, 2013). Além disso, ocorreu aumento nos níveis do fator de crescimento de tecido conectivo nas células oTr-1 quando cultivadas com rbIFNT, e este fator desempenha várias funções na proliferação das células e está envolvido com a alongação do embrião (Wang *et al.*, 2013).

No início da gestação, alguns ISGs, como o OAS1 (Mirando *et al.*, 1991; Schmitt *et al.*, 1993; Johnson, Stewart, *et al.*, 2001) e o ISG15 (Naivar *et al.*, 1995) aumentam sua expressão no endométrio uterino estimulados por IFNT. O ISG15 recebeu inicialmente o nome de proteína com reação cruzada à ubiquitina, por apresentar reação cruzada com o anticorpo contra ubiquitina (Austin *et al.*, 1996). Também foi demonstrada estar aumentada no endométrio de camundongos (Austin *et al.*, 2003) e humanos (Bebington *et al.*, 1999) no início da gestação. Além disso, existe uma maior expressão de ISG15 em resposta ao IFNT no endométrio de vacas e ovelhas gestantes. Em bovinos, a proteína ISG15 é encontrada em quantidades significativas em lavados uterinos no dia 18 de gestação. O ISG15 pode estar envolvido na regulação de proteínas essenciais para o estabelecimento da gestação em

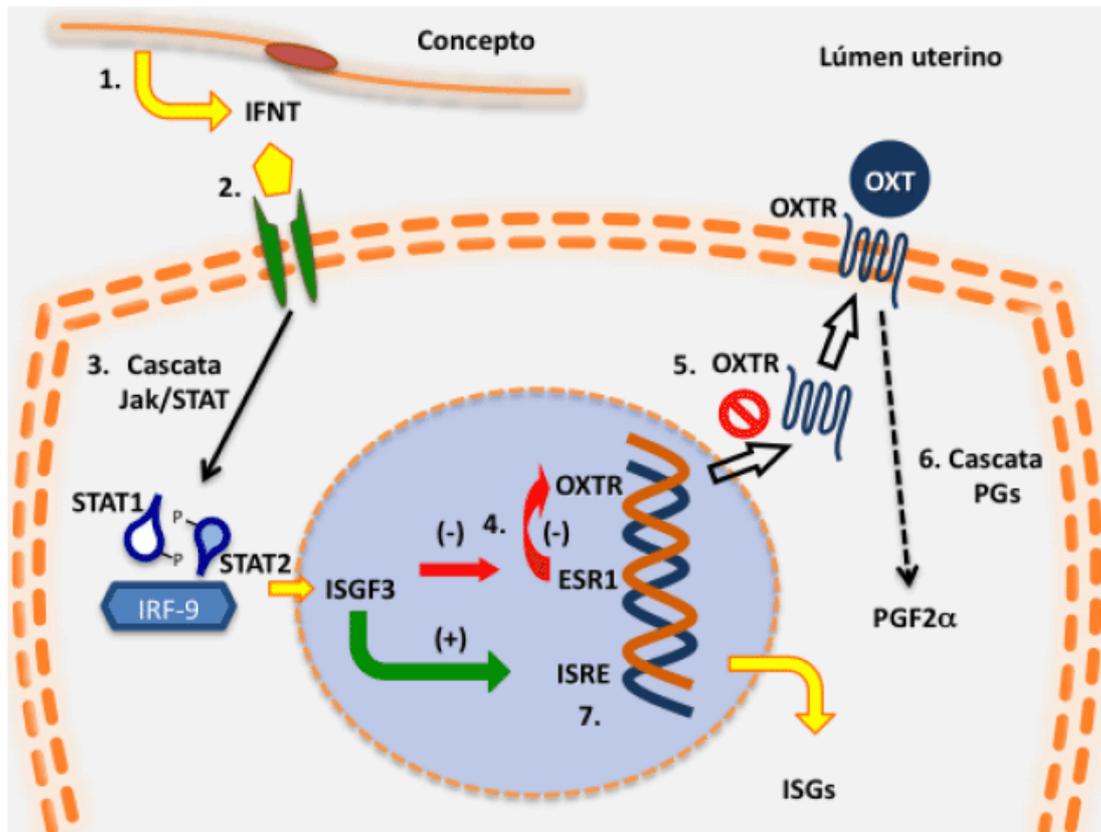
ruminantes (Johnson *et al.*, 1998). Os ISGs também são induzidos por interferon tipo I e podem conjugar-se a outras proteínas (Loeb e Haas, 1992).

Sua ação por via parácrina inicia-se no momento da sinalização onde o IFNT produzido pelo concepto é secretado no lúmen uterino (Figura 3) (Roberts *et al.*, 1989). Existem dois tipos de receptores de interferon tipo I que são IFNAR1 e IFNAR2, onde a molécula de IFNT é ligada. Estes são expressos em todos os órgãos corporais, tendo como principal função mediar respostas antivirais. Também estão presentes no útero de ovelhas e atuam na mediação de respostas maternas estimuladas pelo IFNT produzido pelo concepto. Por meio da via de transdução de sinais Jak/STAT, o IFNT consegue exercer sua ação quando ligado em seus receptores IFNAR1 e IFNAR2 (Rosenfeld *et al.*, 2002). Quando a cascata de sinalização Jak/STAT é ativada, ocorre a formação do fator de transcrição ISGF3, que inibe a transcrição do receptor de estrógeno (ESR1) e conseqüentemente o receptor de ocitocina (OXTR) (Antoniazzi *et al.*, 2011). Com isso o OXTR não é inserido na membrana e a OXT não consegue se ligar, alterando a cascata de síntese de prostaglandinas e modificando o padrão de síntese e liberação de PGF2 α e, conseqüentemente inibindo a luteólise (Antoniazzi *et al.*, 2011). Pela via de sinalização Jak/STAT, proteínas tirosina-quinases fosforilam proteínas STAT formando complexos multiméricos que agem como fatores de transcrição e regulam a expressão de ISGs. Dentre os complexos multiméricos formados está o ISGF3, que se liga a regiões responsivas a estímulos de interferons (ISRE) iniciando a síntese de ISGs (Hansen *et al.*, 1999).

Em ovelhas, o IFNT induz a expressão do fator regulatório de interferon 2 (IRF2), um potente supressor de transcrição, que silencia a transcrição de ESR1. Na ausência de ESR1, E2 é incapaz de induzir a expressão de OXTR no endométrio uterino e isto anula a ação da OXT sobre a produção pulsátil de PGF, inibindo a luteólise (Bazer *et al.*, 2011).

A P4 favorece a maioria das ações do IFNT sobre o útero. A receptividade uterina para a implantação do embrião é dependente de P4. Em ovelhas, a perda de PGR é um pré-requisito para a expressão de ISGs e a P4 também atua aumentando a expressão de progestamedinas (FGF10 e HGF) no endométrio. Ambos ISGs e progestamedinas podem atuar por MAPK e PI3K na mudança da expressão gênica e na receptividade uterina para a implantação do embrião (Spencer e Bazer, 2002). Além disso, a P4, prostaglandinas (PGs) e IFNT estimulam a produção de histotrofo pelo endométrio. Entretanto, os métodos pelos quais eles estimulam esta produção ainda não estão bem estabelecidos (Forde e Lonergan, 2012).

Figura 3: Sinalização parácrina do IFNT com o endométrio no período de reconhecimento materno da gestação.



Fonte: (ANTONIAZZI, et al., 2011, p. 179).

O IFNT produzido pelo conceito chega até a veia uterina e estimula a síntese de ISGs em leucócitos de ovelhas no início da gestação (Gifford *et al.*, 2007). O IFNT atinge a circulação sistêmica a partir de sua saída pela veia uterina, retornando para o ovário e chegando no CL, estimulando a síntese de ISGs nas células luteais (Oliveira *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2009). A expressão de ISG15 em células luteais grandes de ovelhas com 15 dias de gestação é maior do que em ovelhas não prenhes (Oliveira *et al.*, 2008). Concentrações de IFNT são maiores no sangue da artéria uterina, veia uterina e veia jugular em ovelhas com 15 dias de gestação do que em ovelhas ciclando (Oliveira *et al.*, 2008) e em ovelhas que recebem infusão de IFNT a expressão de ISG15 luteal é maior do que as do grupo controle (Bott *et al.*, 2010). Infusão contínua de roIFNT por 7 dias na veia uterina, iniciando no dia 10 do ciclo estral, prolonga o intervalo entre estros por mais de 32 dias em ovelhas cíclicas e mantém as concentrações de progesterona sérica elevadas até 32 dias pós-cio (Bott *et al.*, 2010). Além disso, a infusão contínua de IFNT na circulação sistêmica por 3 dias em ovelhas cíclicas faz

com que esses animais consigam manter a concentração sérica de progesterona compatível com a da gestação 24 horas após receberem a aplicação de PGF (Antoniazzi *et al.*, 2013).

O cultivo de células luteais tratadas com IFNT não aumenta a produção de progesterona (Shirasuna *et al.*, 2015). Entretanto, células luteais tratadas com IL8 aumentam a produção de progesterona (Shirasuna *et al.*, 2015). O IFNT estimula neutrófilos e IL8 que estão associados com o aumento nas concentrações de progesterona durante o período de reconhecimento materno da gestação em vacas (Shirasuna *et al.*, 2015).

Em novilhas da raça Holandesa, a expressão de RNAm de ISG15 e MX1(myxovirus resistance 1, ISGs) foi significativamente maior nas biopsias hepáticas de animais gestantes quando comparados com não gestantes 18 dias após o estro (Meyerholz *et al.*, 2016). A relação entre a variação na expressão de ISGs e função hepática de bovinos é desconhecida (Meyerholz *et al.*, 2016). O significado biológico da regulação de ISGs pelos tecidos de um animal gestante ainda não está bem definido, mas conhecimentos mais profundos podem ajudar a melhorar o entendimento fisiológico e fisiopatológico da manutenção da gestação em novilhas leiteiras (Meyerholz *et al.*, 2016).

Nos granulócitos polimorfonucleares (PMN), a expressão de ISGs é maior quando comparado as células mononucleares (PBMC) de vacas gestantes 5 dias após a inseminação (Shirasuna *et al.*, 2012). Além disso, em bovinos, a expressão de ISGs também foi maior em PMN a partir dos 14 dias de gestação (Kizaki *et al.*, 2013). Com isso, percebe-se que a população de células imunes PMN é mais sensível à presença do embrião no período de reconhecimento materno da gestação em bovinos (Shirasuna *et al.*, 2012).

2.5 EXOSSOMOS NA REPRODUÇÃO

As vesículas extracelulares (EVs) são divididas em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (György *et al.*, 2011), podendo mediar a comunicação celular, entre células vizinhas ou tecidos distantes (Ng *et al.*, 2013). Os exossomos, uma subcategoria de EVs, vêm se destacando por estarem envolvidos em mecanismos regulatórios em eventos reprodutivos. Os exossomos caracterizam-se por serem nanovesículas (30-150 nm) derivadas da membrana celular que carregam lipídeos, proteínas, RNAs e miRNAs (Mathivanan *et al.*, 2010), capazes de controlar vias regulatórias associadas a patologias e rotas fisiológicas (Ng *et al.*, 2013). A comunicação intercelular pode ser mediada pelos exossomos através da transferência de informação genética para células receptoras, onde desempenham um papel

fundamental na regulação de processos fisiológicos e patológicos através de redes reguladoras de genes e através da programação epigenética (Lee *et al.*, 2012). Os exossomos, dependendo da célula de origem, parecem estar envolvidos em uma série de processos; evidências sugerem que eles se fundem com a membrana plasmática da célula receptora liberando seu conteúdo para dentro desta (Ng *et al.*, 2013). Os mecanismos propostos são os de que existem receptores específicos para os exossomos na membrana da célula alvo (Segura *et al.*, 2007) ou que eles sejam internalizados por exocitose (Morelli *et al.*, 2004).

Evidências sobre a secreção de exossomos tem sido demonstrada em vários tipos celulares, incluindo células tronco embrionárias e embriões produzidos *in vitro* (Ratajczak *et al.*, 2006; Kropp *et al.*, 2014). Nas fases iniciais da gestação, é necessário que ocorra uma comunicação entre o concepto e o organismo materno, podendo ser essa também mediada por exossomos de origem materna ou fetal onde o reconhecimento materno da gestação ocorrerá com sucesso (Tannetta *et al.*, 2014). O embrião no período de pré-implantação e o endométrio materno são capazes de secretar vesículas extracelulares (EVs) (Saadeldin *et al.*, 2015). Os exossomos participam de comunicações intercelulares dentro de alguns eventos reprodutivos que são essenciais para que uma gestação tenha sucesso, como na proliferação celular, comunicação entre o organismo materno e o concepto e, na aderência embrionária (Saadeldin *et al.*, 2015). O microambiente uterino é um fator essencial para que ocorra a implantação do embrião (Mamo *et al.*, 2012).

Proteínas intracelulares foram identificadas dentro de exossomos e microvesículas secretados por células da granulosa e do cumulus (Da Silveira *et al.*, 2012). Estas EVs foram identificadas no fluido folicular de folículos no ovário equino (Da Silveira *et al.*, 2012). Em bovinos, os miRNAs transportados pelos exossomos participam na divisão celular e na ativação do genoma no período de desenvolvimento embrionário (Kropp *et al.*, 2014). EVs purificadas do lavado uterino de ovelhas no dia 14 do ciclo estral foram marcadas com PKH67 e infundidas no lúmen uterino de ovelhas prenhes durante 6 dias (Burns *et al.*, 2016). No dia 14 da gestação, as EVs marcadas foram observadas no trofoblasto do concepto e epitélio uterino mostrando que elas podem estar envolvidas na comunicação parácrina entre essas células no início da gestação (Burns *et al.*, 2016).

O epitélio endometrial de ovelhas no período que compreende o ciclo estral e o início da gestação secreta exossomos que contém RNAm de “ovine endogenous jaagsiekte retroviruses” (enJSRV) (Ruiz-González *et al.*, 2015). Os enJSRV livres ou através de exossomos atuam no trofotoderma via “receptores toll-like”(TLR) para induzir a secreção de IFNT de uma maneira semelhante à resposta imune inata realizada por macrófagos e células

dendríticas na infecção por patógenos virais (Ruiz-González *et al.*, 2015). Além disso, exossomos originados do trofoblasto de conceptos ovinos com 15 e 17 dias, possuem interferon-tau que foi capaz de estimular alguns transcritos como MX1, MX2 (myxovirus resistance 2, ISGs) e ISG15 no cultivo de células endometriais, o que sugere mudanças no ambiente uterino para que ocorra a implantação do conceito (Nakamura *et al.*, 2016).

Portanto, para que as perdas embrionárias sejam reduzidas e a gestação consiga ser mantida até o final é de fundamental importância entender como ocorre a regulação hormonal do período de reconhecimento materno da gestação em ruminantes. O IFNT produzido pelo conceito é necessário para que ocorra a sinalização e implantação do embrião e, a manutenção do corpo lúteo, atuando de maneira parácrina, endócrina e autócrina, podendo ser mediada por vesículas extracelulares.

3 CAPÍTULO 1

***In vitro* produced embryos-derived free interferon-tau stimulates ISG15 in luteal cells culture as early as day 7of development.**

Alessandra Bridi, Kalyne Bertolin, Vitor B. Rissi, Lady K. S. Mujica, Werner G. Glanzner, Mariana P. de Macedo, Juliano C. da Silveira, Flávio Vieira Meirelles, Fabio V. Comim, Paulo B. D. Gonçalves, Alfredo Q. Antoniazzi

Biology of Reproduction

Janeiro, 2017

4 CONCLUSÃO

O IFNT secretado por embriões bovinos produzidos *in vitro* com 7, 9 e 12 dias de desenvolvimento foi capaz de sinalizar em cultivo de células luteais. Como pode ser observado *in vitro*, esta sinalização ocorre antes do período clássico de reconhecimento materno da gestação (12-26 dias). Nas células luteais, a forma de proteína livre do IFNT e não via exossomos é a que parece estar atuando na sinalização. Desta forma, sugere-se que o IFNT sinaliza em receptores de membrana celular e não sofre endocitose para agir intracelular, como em outras formas de sinalização via exossomos.

5 REFERÊNCIAS

ANTONIAZZI, A. Q. et al. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, v. 41, p. 176-185, 2011. ISSN 0103-8478. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000100029 &nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000100029&nrm=iso) >.

ANTONIAZZI, A. Q. et al. Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in ewes. **Biol Reprod**, v. 88, n. 6, p. 144, Jun 2013. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616594> >.

AUSTIN, K. J. et al. Interferon-stimulated gene-15 (Isg15) expression is up-regulated in the mouse uterus in response to the implanting conceptus. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3107-13, Jul 2003. ISSN 0013-7227 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12810567 >.

AUSTIN, K. J. et al. Localization of ISG15 and Conjugated Proteins in Bovine Endometrium Using Immunohistochemistry and Electron Microscopy. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 967-975, 2004. Disponível em: < <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2003-1087> >.

AUSTIN, K. J. et al. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. **Biol Reprod**, v. 54, n. 3, p. 600-6, Mar 1996. ISSN 0006-3363 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8835381 >.

BATISTA, M. et al. Development of a bovine luteal cell in vitro culture system suitable for co-culture with early embryos. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 48, n. 9, p. 583-592, 2012// 2012. ISSN 1543-706X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-012-9552-6> >.

BAZER, F. W.; OTT, T. L.; SPENCER, T. E. Pregnancy recognition in ruminants, pigs and horses: Signals from the trophoblast. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 79-94, 1// 1994. ISSN 0093-691X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05800524> >.

BAZER, F. W.; SONG, G.; THATCHER, W. W. Roles of Conceptus Secretory Proteins in Establishment and Maintenance of Pregnancy in Ruminants. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1-16, 2012. ISSN 1011-2367/1976-5517. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4092924/> >.

BAZER, F. W. et al. **Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals.** *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*. 3: 745-767 p. 2011.

BAZER, F. W. et al. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 43, p. 39-47, 1991 1991. ISSN 0449-3087. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/1843350> >.

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. **Mol Hum Reprod**, v. 5, n. 10, p. 966-72, Oct 1999. ISSN 1360-9947 (Print) 1360-9947 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10508226 >.

BINELLI, M. et al. Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. **Biol Reprod**, v. 64, n. 2, p. 654-65, Feb 2001. ISSN 0006-3363 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11159370 >.

BÓ, G.; MAPLETOFT, R. Evaluation and classification of bovine embryos. **Anim Reprod**, v. 10, n. 3, p. 344-348, 2013.

BOGAN, R. L.; NISWENDER, G. D. Constitutive Steroidogenesis in Ovine Large Luteal Cells May Be Mediated by Tonically Active Protein Kinase A. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 2, p. 209-216, August 1, 2007 2007. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/77/2/209.abstract> >.

BOTT, R. C. et al. Uterine Vein Infusion of Interferon Tau (IFNT) Extends Luteal Life Span in Ewes. **Biol Reprod**, Dec 30 2009. ISSN 1529-7268 (Electronic)0006-3363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20042537 >.

_____. Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. **Biol Reprod**, v. 82, n. 4, p. 725-35, Apr 2010. ISSN 1529-7268 (Electronic) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20042537> >.

BURNS, G. W.; BROOKS, K. E.; SPENCER, T. E. Extracellular Vesicles Originate from the Conceptus and Uterus During Early Pregnancy in Sheep. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 3, p. 56, 1-11, March 1, 2016 2016. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/94/3/56.abstract> >.

CARAMBULA, S. F. et al. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1495-501, Apr 2002. ISSN 0013-7227 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11897708 >.

CHANNING, C. P. TISSUE CULTURE OF EQUINE OVARIAN CELL TYPES: CULTURE METHODS AND MORPHOLOGY. **Journal of Endocrinology**, v. 43, n. 3, p. 381-NP, March 1, 1969 1969. Disponível em: < <http://joe.endocrinology-journals.org/content/43/3/381.abstract> >.

DA SILVEIRA, J. C. et al. Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 71, 1-10, March 1, 2012 2012. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/86/3/71.abstract> >.

DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 7, p. 1949-1978, 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=12161347 >.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 41-9, Jan 2001. ISSN 1470-1626 (Print) 1470-1626 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11226028 >.

DORNIK, P.; BAZER, F.; SPENCER, T. Physiology and Endocrinology Symposium: biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. **Journal of animal science**, v. 91, n. 4, p. 1627-1638, 2013. ISSN 1525-3163.

FARIN, C. E. et al. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 2, p. 210-218, August 1, 1990 1990. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/43/2/210.abstract> >.

FITZ, T. A. et al. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 3, p. 703-711, October 1, 1982 1982. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/27/3/703.short> >.

FORDE, N.; LONERGAN, P. Transcriptomic Analysis of the Bovine Endometrium: What is Required to Establish Uterine Receptivity to Implantation in Cattle ? **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 2, p. 189-195, 2012.

GIFFORD, C. A. et al. Regulation of Interferon-Stimulated Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Pregnant and Bred, Nonpregnant Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 274-280, 1// 2007. ISSN 0022-0302. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207726280> >.

GINTHER, O. J. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **J Anim Sci**, v. 39, n. 3, p. 550-64, Sep 1974. ISSN 0021-8812 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4213194 >.

GINTHER, O. J.; DEL CAMPO, C. H. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: cattle. **Am J Vet Res**, v. 35, n. 2, p. 193-203, Feb 1974. ISSN 0002-9645 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4813319 >.

GUILLMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 49, p. 39-51, 1995 1995. ISSN 0449-3087. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/7623329> >.

GYÖRGY, B. et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 68, n. 16, p. 2667-2688, 05/11 01/06/received 03/30/revised 04/12/accepted 2011. ISSN 1420-682X 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142546/> >.

HAN, H. 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, November 1, 2006 2006. Disponível em: < <http://joe.endocrinology-journals.org/content/191/2/505.abstract> >.

HANSEN, T. R. et al. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 54, p. 329-339, 1999 1999. ISSN 0449-3087. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/10692865> >.

HAUPTMANN, R.; SWETLY, P. A novel class of human type I interferons. **Nucleic Acids Research**, v. 13, n. 13, p. 4739-4749, 1985. ISSN 0305-10481362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321823/> >.

JOHNSON, G. A. et al. Pregnancy and interferon-tau induce conjugation of bovine ubiquitin cross-reactive protein to cytosolic uterine proteins. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 4, p. 898-904, Apr 1998. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546718> >.

JOHNSON, G. A. et al. Muc-1, Integrin, and Osteopontin Expression During the Implantation Cascade in Sheep. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 820-828, September 1, 2001 2001. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/65/3/820.abstract> >.

JOHNSON, G. A. et al. Effects of the Estrous Cycle, Pregnancy, and Interferon Tau on 2',5'-Oligoadenylate Synthetase Expression in the Ovine Uterus. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1392-1399, 05/01/ 2001. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/cgi/content/abstract/64/5/1392> >.

KENNY, N.; FARIN, C. E.; NISWENDER, G. D. Morphometric quantification of mitochondria in the two steroidogenic ovine luteal cell types. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 1, p. 191-196, January 1, 1989 1989. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/40/1/191.abstract> >.

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, Feb 1997. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16728022 >.

KIZAKI, K. et al. Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 11, p. 6, Feb 05 2013. ISSN 1477-7827 (Electronic) 1477-7827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384108> >.

KROPP, J.; SALIH, S. M.; KHATIB, H. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 91, 04/24 02/17/received 04/03/accepted 2014. ISSN 1664-8021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4006060/> >.

LAFLEUR, D. W. et al. Interferon- κ , a Novel Type I Interferon Expressed in Human Keratinocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39765-39771, October 26, 2001 2001. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/276/43/39765.abstract> >.

LEE, Y.; EL ANDALOUSSI, S.; WOOD, M. J. A. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. R1, p. R125-R134, October 15, 2012 2012. Disponível em: < <http://hmg.oxfordjournals.org/content/21/R1/R125.abstract> >.

LOEB, K. R.; HAAS, A. L. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. **J Biol Chem**, v. 267, n. 11, p. 7806-13, Apr 15 1992. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1373138 >.

MAMO, S.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Transcriptomic changes in the bovine conceptus between the blastocyst stage and initiation of implantation. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1, p. 56-63, 2012. ISSN 0378-4320. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.011> >. Acesso em: 2016/09/11.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907-1920, 9/10/ 2010. ISSN 1874-3919. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391910001843> >.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263-323, 1999.

MESQUITA, F. S. et al. The Receptive Endometrial Transcriptomic Signature Indicates an Earlier Shift from Proliferation to Metabolism at Early Diestrus in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 2, p. 52, 1-12, August 1, 2015 2015. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/93/2/52.abstract> >.

MEYERHOLZ, M. M. et al. Pregnancy-Induced ISG-15 and MX-1 Gene Expression is Detected in the Liver of Holstein-Friesian Heifers During Late Peri-Implantation Period. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 1, p. 175-177, 2016. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12638> >.

MIRANDO, M. A. et al. Stimulation of 2',5'-oligoadenylate synthetase activity in sheep endometrium during pregnancy, by intrauterine infusion of ovine trophoblast protein-1, and by intramuscular administration of recombinant bovine interferon-alpha I1. **J Reprod Fertil**, v. 93, n. 2, p. 599-607, Nov 1991. ISSN 0022-4251 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1787480 >.

MOOR, R. M.; ROWSON, L. E. A. LOCAL UTERINE MECHANISMS AFFECTING LUTEAL FUNCTION IN THE SHEEP. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 11, n. 2, p. 307-310, April 1, 1966 1966. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/11/2/307.abstract> >.

MORELLI, A. E. et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. **Blood**, v. 104, n. 10, p. 3257-3266, 2004.

NAGATA, S.; MANTEI, N.; WEISSMANN, C. The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon-[alpha]. **Nature**, v. 287, n. 5781, p. 401-408, 10/02/print 1980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/287401a0> >.

NAIVAR, K. A. et al. Secretion of bovine uterine proteins in response to type I interferons. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 4, p. 848-854, April 1, 1995 1995. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/52/4/848.abstract> >.

NAKAMURA, K. et al. Induction of IFNT-Stimulated Genes by Conceptus-Derived Exosomes during the Attachment Period. **PLoS ONE**, San Francisco, CA USA, v. 11, n. 6, p. e0158278, 06/28 12/22/received 06/13/accepted 2016. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4924817/> >.

NG, Y. H. et al. Endometrial Exosomes/Microvesicles in the Uterine Microenvironment: A New Paradigm for Embryo-Endometrial Cross Talk at Implantation. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 8, n. 3, p. e58502, 03/13 12/13/received 02/05/accepted 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596344/> >.

NISWENDER, G. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333-339, March 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/123/3/333.abstract> >.

NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, 2000.

OLIVEIRA, J. F. et al. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1252-9, Mar 2008. ISSN 0013-7227 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18063687 >.

RATAJCZAK, J. et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. **Leukemia**, v. 20, n. 5, p. 847-856, 02/02/online 2006. ISSN 0887-6924. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/sj.leu.2404132> >.

ROBERTS, R. M. et al. Trophoblast Interferons. **Placenta**, v. 20, n. 4, p. 259-264, 1999. ISSN 0143-4004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1053/plac.1998.0381> >. Acesso em: 2016/06/13.

ROBERTS, R. M. et al. Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. **Reproduction (Cambridge, England) Supplement**, v. 61, p. 239-251, 2003 2003. ISSN 1477-0415. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/14635939> >.

ROBERTS, R. M. et al. Interferon production by the preimplantation sheep embryo. **J Interferon Res.**, v. 9, n. 2, p. 175-187, 04 1989.

ROBERTS, R. M.; XIE, S.; MATHIALAGAN, N. Maternal recognition of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 2, p. 294-302, February 1, 1996 1996. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/54/2/294.abstract> >.

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, September 1, 2002 2002. Disponível em: < <http://www.biolreprod.org/content/67/3/847.abstract> >.

RUEDA, B. R. et al. Influence of fetal death and fetectomy on gestation and the initiation of parturition in the ewe. **Reprod Fertil Dev**, v. 7, n. 5, p. 1221-5, 1995. ISSN 1031-3613 (Print) 1031-3613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8848591> >.

RUIZ-GONZÁLEZ, I. et al. Exosomes, endogenous retroviruses and toll-like receptors: pregnancy recognition in ewes. **Reproduction**, v. 149, n. 3, p. 281-291, March 1, 2015 2015. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/149/3/281.abstract> >.

SAADELDIN, I. M.; OH, H. J.; LEE, B. C. Embryonic–maternal cross-talk via exosomes: potential implications. **Stem Cells and Cloning : Advances and Applications**, v. 8, p. 103-107, 07/07 2015. ISSN 1178-6957. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500606/> >.

SCHMITT, R. A. et al. Uterine cellular changes in 2',5'-oligoadenylate synthetase during the bovine estrous cycle and early pregnancy. **Biol Reprod**, v. 48, n. 3, p. 460-6, Mar 1993. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8452923 >.

SEGURA, E. et al. CD8+ Dendritic Cells Use LFA-1 to Capture MHC-Peptide Complexes from Exosomes In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1489-1496, August 1, 2007 2007. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/179/3/1489.abstract> >.

SHIRASUNA, K. et al. Upregulation of interferon-stimulated genes and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. **J Reprod Dev**, v. 58, n. 1, p. 84-90, 2012. ISSN 1348-4400 (Electronic) 0916-8818 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052007> >.

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. 217-225, September 1, 2015 2015. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/150/3/217.abstract> >.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1527-1543, December 1, 1995 1995. Disponível em: < <http://www.bioreprod.org/content/53/6/1527.abstract> >.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Front Biosci**, v. 7, n. 1-3, p. d1879-98, Sep 01 2002. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12161340> >.

SPENCER, T. E. et al. Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. **Reproduction**, v. 146, n. 4, p. 377-387, October 1, 2013 2013. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/content/146/4/377.abstract> >.

SPONCHIADO, M. et al. O embrião bovino modula a função do endométrio 7 dias após o estro in vivo. **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu.**, p. 313, 2016.

TANIGUCHI, T. et al. Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. **Nature**, v. 285, n. 5766, p. 547-549, 06/19/print 1980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/285547a0> >.

TANNETTA, D. et al. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. **Cell Mol Immunol**, v. 11, n. 6, p. 548-563, 11/print 2014. ISSN 1672-7681. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2014.42> >.

THATCHER, W. W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001. ISSN 0093-691X. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00645-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00645-8) >. Acesso em: 2016/06/05.

WALES, R.; CUNEO, C. 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: < <http://www.publish.csiro.au/paper/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. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12169> >.

WUTTKE, W. et al. Regulation of Steroid Production and its Function Within the Corpus Luteum. **Steroids**, v. 63, n. 5-6, p. 299-305, 5// 1998. ISSN 0039-128X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X98000373> >. Acesso em: 1998/6//.

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. ISSN 1439-0531. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01009.x> >.

YOSHIOKA, S. et al. Proliferation of luteal steroidogenic cells in cattle. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e84186, 2013. ISSN 1932-6203.