

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ISABELLE CRISTINA PEREIRA

**CULTIVO E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS DO ISTMO DA TUBA UTERINA
DE BOVINOS APRESENTANDO DIFERENTES ESTRUTURAS OVARIANAS**

Belo Horizonte

2023

Isabelle Cristina Pereira

**CULTIVO E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS DO ISTMO DA TUBA UTERINA
DE BOVINOS APRESENTANDO DIFERENTES ESTRUTURAS OVARIANAS**

Versão final

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Zoccolaro
Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. José de Oliveira
Carvalho Neto

Belo Horizonte

2023

P436c Pereira, Isabelle Cristina, 1994 -
Cultivo e expressão gênica de células do istmo da tuba uterina de bovinos
apresentando diferentes estruturas ovarianas / Isabelle Cristina Pereira. – 2023.
69f.

Orientadora: Letícia Zoccolaro Oliveira
Coorientador: José de Oliveira Carvalho Neto
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.
Bibliografias: f. 58 a 68.

1- Bovino – Reprodução - Teses – 2. Fisiologia veterinária – Teses –
I. Oliveira, Letícia Zoccolaro – II. Carvalho Neto, José de Oliveira –
III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089 26

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

ISABELLE CRISTINA PEREIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Reprodução Animal.

Aprovado(a) em 21 de junho de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Leticia Zoccolaro Oliveira

Dr.(a). Jose de Oliveira Carvalho Neto

Dr.(a). Alan Maia Borges

Dr.(a). Julia Meireles Nogueira



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Zoccolaro Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 21/06/2023, às 18:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alan Maia Borges, Professor do Magistério Superior**, em 21/06/2023, às 18:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Júlia Meireles Nogueira, Usuário Externo**, em 26/06/2023, às 09:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jose de Oliveira Carvalho Neto, Usuário Externo**, em 06/07/2023, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2370160** e o código CRC **978CF638**.

*Dedicado à glória de Deus e ao
desenvolvimento das pesquisas nas
universidades brasileiras.*

AGRADECIMENTOS

“Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre!”

Romanos 11:36 – Bíblia Sagrada.

Agradeço em primeiro lugar ao meu Deus, meu Aba. Ele é o firme fundamento no qual decidi construir minha vida. Durante o mestrado, tive o privilégio de conhecer Seu coração como nunca antes. Por meio das aflições, conheci Sua doce presença de perto. E é nesse lugar, debaixo de Suas asas, que eu quero permanecer todos os dias da minha vida. Por meio dEle, entendi que sou muito além do que mais uma pessoa nesse mundo, sou filha amada e de inestimável valor para Ele. Que os meus dias, minhas escolhas, meus caminhos e tudo que há em mim, me levem pra mais perto dEle. Eu pertencço a Ele e Ele a mim para sempre. Por onde eu andar que o nome dEle seja conhecido através de mim.

“Honra a teu pai e a tua mãe, para que se prolonguem os teus dias na terra que o Senhor teu Deus te dá” Êxodo 20:12 – Bíblia Sagrada.

Aos meus amados pais, Ari e Selma. Vocês me ensinaram muitas coisas na vida, mas a principal delas, que eu quero levar comigo, é o princípio da honra. Quero que Deus me dê o privilégio de honrar vocês na mesma medida da bondade que vocês derramam sobre mim. Recebam essa conquista, como fruto de todo investimento feito em mim e em minha vida profissional. Hoje sou eu quem cuido de vocês, mas quero, por meio dessa conquista, agradecer vocês por todo cuidado comigo desde sempre. Conseguimos! Amo vocês de todo coração. Ao meu irmão e minha cunhada por todos os conselhos, por todo apoio, por todos os ensinamentos e principalmente por estarem do meu lado em todos os momentos de minha vida. Amo vocês.

À minha orientadora, Profa. Leticia Zoccolaro, por enxergar em mim um potencial que às vezes eu tenho dificuldade de acreditar que existe. Seu comprometimento, assistência e paixão pela pesquisa me impactaram. Eu quero ser uma profissional tão boa como você é. Agradeço por confiar em meu trabalho e me dar “asas” pra voar. Obrigada por me incentivar a encarar os meus desafios. Existe um provérbio que diz que assim como ferro afia o ferro, assim o indivíduo afia o seu próximo. Por meio de você fui afiada, moldada e amadurecida. Obrigada por tanto. Esse é um retorno de inestimável valor.

Ao Dr. José Carvalho Neto por toda ajuda, paciência e dedicação durante a execução do meu experimento. Obrigada por me ajudar a pensar em propostas e metodologias para meu

trabalho. Agradeço por confiar a mim seu carro para que eu pudesse fazer as coletas das tubas uterinas. Agradeço por se sensibilizar quando os dias não eram tão bons. Obrigada por toda cordialidade e atenção conosco.

Ao Dr. Antônio de Pinho Marques Júnior e Dr. Álan Maia Borges por toda ajuda e pelas diretrizes dadas sobre meu projeto de mestrado. Obrigada por usarem toda experiência que possuem para me ajudarem a elaborar um delineamento experimental que me permitiu obter ótimos resultados. Obrigada por disponibilizarem a mim o recurso mais precioso: tempo. A vocês toda minha gratidão.

À equipe do Dr. José Carvalho Neto que me auxiliou em meu experimento, em especial, minha amiga Gabriela e ao Lucas, pela companhia ao frigorífico todas as terças-feiras. Obrigada por me apoiarem na linha de frente, enfrentando os desafios comigo. Obrigada por torcerem por mim e compartilharem pequenas alegrias ao longo da caminhada. Quem diria que voltar pra UFES com muitas tubas uterinas seria sinal de felicidade para nós, não é mesmo?

À Dra. Jankerle Neves Boeloni, ao Dr. Leonardo Oliveira Trivilin e à equipe maravilhosa do laboratório de patologia da UFES, em especial Thaís Tavares, Thaís Togneri e Márcio Philip. O profissionalismo e a excelência de vocês me impactaram. Quero agradecer não só a ajuda profissional, mas principalmente a amizade. Obrigada por me acolherem, fazerem uma festinha surpresa pra mim e me receberem tão bem. Quero vê-los de novo!

Aos funcionários da UFES- Alegre/ES que me auxiliaram de alguma forma no meu experimento. Aos seguranças por abrirem os portões à noite enquanto eu trocava o meio de cultivo no laboratório, e às auxiliares de serviços gerais por me ensinarem sobre a esterilização, sobre os protocolos da UFES e principalmente por dividirem a mesa comigo, enquanto contávamos histórias nos horários de intervalo.

Aos meus amigos da Igreja Evangélica Portas Abertas (IEPA- SJDR) e aos amigos da Igreja Evangélica Casa de Oração em Alegre/ES por todo companheirismo, intercessão, amizade e carinho de sempre. Agradeço em especial às minhas amigas Daisy, Fernanda, Monique, Tayná e Yara, por serem manifestação do coração de Deus em minha vida. Obrigada por caminharem ao meu lado.

Agradeço à dona Olga que me recebeu em Alegre e por sua companhia nas compras da feirinha de produtores rurais toda sexta-feira. Agradeço pelos pratos deliciosos que fez para mim quando eu chegava cansada depois de um dia de trabalho. Agradeço por compartilhar sua

casa comigo e por me apoiar em todos os momentos, principalmente nos dias que eu chegava tarde da UFES, em que você ficava na varanda da casa sempre me esperando.

Às minhas queridas amigas de Alegre: Gabriela e Daiana. Existem pessoas que só Jesus para colocar no nosso caminho. Vocês são essas pessoas para mim. Sou grata a Deus pela amizade de vocês, pelo companheirismo, pela ajuda e pelo ânimo que me deram. Alegre não seria a mesma sem vocês. Obrigada pelos lanches, sorvetes, passeios e pela companhia para comer o famoso macarrão na chapa que só Alegre faz!

À minha amiga e companheira de pós-graduação Ana Carolina. Ana, quero que saiba como você é um exemplo para mim. Você me ensinou muito sobre como encarar a vida, como encarar a pós-graduação e como olhar adiante com esperança de que, no final, tudo vai dar certo. Obrigada por me ajudar na linha frente também. Que você faça uma colheita abundante de toda sementeira que tem feito ao longo da sua vida.

Agradeço ao frigorífico Cofril de Atílio Vivacqua – ES, por abrirem as portas para mim e permitirem, tão prontamente, que eu realizasse as coletas de tubas uterinas. Agradeço em especial à Médica Veterinária do estabelecimento, Dona Selma e à equipe da diretoria por me auxiliarem nos trâmites administrativos. Deixo meu agradecimento especial à toda equipe do setor da triparia, onde eu coletava as peças. Agradeço pela amizade, pelas histórias compartilhadas, pelas brincadeiras e pelos cafés. Obrigada por torcerem por mim e, para cada peça coletada, vibrarem de alegria comigo. Conseguimos, meus amigos. Agradeço a vocês por isso.

À toda equipe do LABODE – ICB, por tão prontamente abrirem as portas para parcerias e por permitirem que as análises de expressão gênica fossem realizadas. Sem vocês, esse projeto não seria possível. Agradeço em especial à Dra. Érika Cristina Jorge e à Dra. Júlia Meireles Nogueira por contribuírem de forma decisiva no meu trabalho. Agradeço por agregarem ricamente ao meu mestrado!

Ao Prof. Dr. Álan, e Dr^a Júlia Meireles por aceitarem o convite para compor a banca examinadora de defesa, é uma honra tê-los presentes neste momento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de mestrado. À UFMG e a UFES.

RESUMO

As células que compõem o epitélio tubárico estão envolvidas em inúmeros processos relacionados a fertilidade. Diante disso, diversos modelos de cultivo *in vitro* dessas estruturas já foram relatados. Atualmente, o modelo mais utilizado é o cultivo de explantes ou agregados celulares. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de formação de agregados celulares a partir do cultivo primário de células do istmo da tuba uterina de fêmeas bovinas apresentando diferentes estruturas ovarianas e correlacionar os resultados com a expressão dos genes ESR1 (gene que codifica a transcrição do receptor α de estrógeno), ESR2 (gene que codifica a transcrição do receptor β de estrógeno) e PGR (gene que codifica a transcrição do receptor de progesterona) nos diferentes grupos experimentais. Para isso, tubas uterinas foram coletadas de vacas de abatedouro e classificadas em três grupos experimentais: tubas uterinas provenientes de tratos reprodutivos contendo ovários com folículos ≤ 5 mm (Grupo folículos pequenos; FP); ovários com folículos entre 8-10mm (Grupo folículos grandes; FG); e ovários contendo corpo lúteo CL (Grupo CL). Na primeira etapa, (etapa pré-cultivo), as células oriundas desse tecido foram recuperadas e microscopicamente classificadas de 1 a 5 quanto à sua quantidade (1 = pouca quantidade; 5 grande quantidade de células) e cultivadas em estufa a 39°C e 5% de CO₂ por 24h. Ao final desse período (etapa pós-cultivo), o número de agregados formados em cada grupo experimental foi avaliado. Foram coletadas duas tubas uterinas de cada grupo experimental em cada réplica e foram realizadas 5 réplicas deste delineamento (n=30). Na segunda etapa, foi realizado RT-PCRq para avaliação da expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR nos fragmentos do istmo das tubas uterinas de cada grupo experimental. Foram coletadas seis tubas uterinas de cada grupo experimental (n=18). Os dados da etapa pré cultivo foram submetidos a análise de variância e teste de Tukey. Os dados da etapa pós cultivo, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn e, por fim, as análises comparativas das expressões gênicas entre os grupos experimentais, foram avaliadas por meio software REST 2009. Para todas as análises foi considerado 5% de significância. Na etapa pré cultivo houve diferença ($P < 0,05$) com relação à nota visual para a quantidade de células do istmo recuperadas, sendo semelhante ($P = 0,654$) entre os grupos FG ($3,4 \pm 0,9$) e FP ($3,0 \pm 0,7$) e entre os grupos FP e CL ($2,2 \pm 0,4$; $P = 0,215$), ao passo que foi maior ($P = 0,049$) no grupo FG comparado ao grupo CL. Na etapa pós cultivo, o número de agregados celulares formados diferiu ($P = 0,004$) entre os grupos experimentais, sendo maior no grupo FG ($364,0 \pm 139,1$) quando comparado com o grupo FP ($197,6 \pm 127,7$) que, por sua vez, foram maiores que no grupo CL ($8,0 \pm 11,0$). Na segunda etapa, o grupo CL expressou cerca de 20,5x mais o gene

PGR, quando comparado ao grupo FP ($P=0,003$), enquanto não foram verificadas diferenças ($P>0,05$) na expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR entre os grupos CL e FG. Por outro lado, o grupo FP expressou 18,7x mais o gene ESR1 ($P=0,007$) e 0,05x menos o gene PGR, quando comparado ao grupo FG ($P=0,001$). A expressão do gene ESR2 não diferiu ($P>0,05$) entre os grupos experimentais. Concluiu-se que a ação do estrógeno (E_2) e progesterona (P_4) sobre as células da tuba uterina influenciam na capacidade de formação de agregados celulares. As células do istmo provenientes de tubas uterinas ipsilaterais ao ovário contendo CL possui menor capacidade de formação de agregados celulares, ao passo que células do istmo contralateral ao ovário, na ausência de corpo lúteo, contendo folículos entre 8-10 mm possui maior capacidade de formação de agregados celulares, quando comparado aos demais grupos. A expressão dos genes ESR1 e PGR na tuba uterina variou de acordo com as estruturas ovarianas presentes no ovário, entretanto, a expressão do gene ESR2 não diferiu entre os grupos experimentais avaliados.

Palavras chave: Bovino; Células da tuba uterina; Estrógeno; Expressão gênica; Progesterona.

ABSTRACT

The cells that make up the tubal epithelium are involved in numerous processes related to fertility. Therefore, several models of in vitro cultivation of these structures have been reported. Currently, the most used model is the cultivation of explants or cell aggregates. The aim of this study was to evaluate the ability to form cell aggregates from the primary culture of cells from the isthmus of bovine females with different ovarian structures and to correlate the results with the expression of the ESR1 genes (gene that encodes the transcript of the estrogen receptor α), ESR2 (gene that encodes the transcription of the estrogen receptor β) and PGR (gene that encodes the transcription of the progesterone receptor) in the different experimental groups. For this purpose, fallopian tubes were collected from slaughter cows and classified into three experimental groups: fallopian tubes from reproductive tracts containing ovaries with follicles ≤ 5 mm (Small Follicle Group; FP); ovaries with follicles between 8-10mm (Large Follicle Group; FG); and ovaries containing CL corpus luteum (CL Group). In the first stage, in the pre-cultivation stage, the cells derived from this tissue were recovered and microscopically classified from 1 to 5 according to their quantity (1 = small quantity; 5 large quantity of cells) and cultivated in an oven at 39°C and 5 % CO₂ per 24h. At the end of this period (post-cultivation stage), the number of aggregates formed in each experimental group was evaluated. Two fallopian tubes were collected from each experimental group in each replicate and 5 replicates of this design were performed (n=30). In the second stage, RT- qPCR was performed to evaluate the expression of the ESR1, ESR2 and PGR genes in the isthmus fragments of the fallopian tubes of each experimental group. Six fallopian tubes were collected from each experimental group (n=18). Data from the pre-cultivation step were submitted to analysis of variance and Tukey's test. Data from the post-cultivation stage were evaluated using the Kruskal-Wallis and Dunn tests and, the comparative analyzes of gene expressions between experimental groups were evaluated using REST 2009 software. For all analyzes, was considered 5 % significance. In the pre-culture stage, there was a difference ($P < 0.05$) in relation to the visual score for the amount of recovered isthmus cells, being similar ($P = 0.654$) between the FG (3.4 ± 0.9) and FP groups (3.0 ± 0.7) and between the FP and CL groups (2.2 ± 0.4 ; $P = 0.215$), whereas it was higher ($P = 0.049$) in the FG group compared to the CL group. In the post-cultivation stage, the number of cell aggregates formed differed ($P = 0.004$) between the experimental groups, being higher in the FG group (364.0 ± 139.1) when compared to the FP group (197.6 ± 127.7) which, in turn, were higher than in the CL group (8.0 ± 11.0). In the

second stage, the CL group expressed about 20.5x more the PGR gene, when compared to the FP group ($P=0.003$), while no differences were verified ($P>0.05$) in the expression of the ESR1, ESR2 and PGR genes between CL and FG groups. On the other hand, the FP group expressed 18.7x more the ESR1 gene ($P=0.007$) and 0.05x less the PGR gene, when compared to the FG group ($P=0.001$). ESR2 gene expression did not differ ($P>0.05$) between experimental groups. It was concluded that the action of estrogen (E_2) and progesterone (P_4) on fallopian tube cells influence the ability to form cell aggregates. Isthmus cells from the fallopian tubes ipsilateral to the ovary containing CL have a lower capacity to form cell aggregates, whereas cells from the contralateral isthmus to the ovary, in the absence of a corpus luteum, containing follicles between 8-10 mm have a greater capacity to form of cellular aggregates, when compared to the other groups. The expression of the ESR1 and PGR genes in the fallopian tube varied according to the ovarian structures present in the ovary, however, the expression of the ESR2 gene did not differ between the evaluated experimental groups.

Keywords: Bovine; Fallopian tube cells; Estrogen; Gene expression; Progesterone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dinâmica da expressão dos receptores de E ₂ (ER α e ER β) e P ₄ (PR) ao longo do ciclo estral na região do istmo e ampola da tuba uterina de fêmeas bovinas.	26
Figura 2. Dinâmica da expressão de receptores E ₂ (ER α e ER β) e P ₄ (PR) em células do istmo e da ampola da tuba uterina cultivadas <i>in vitro</i> e suplementadas com E ₂ e P ₄ .	27
Figura 3. Recuperação das células do istmo tubárico por meio da separação mecânica, utilizando pressão com lâminas de vidro sobre toda a extensão do fragmento de tecido, proveniente de cada grupo experimental.	41
Figura 4. Rastreamento de placas de Petri para identificação e contagem dos agregados celulares formados após 24 horas de cultivo de cada grupo experimental.	42
Figura 5. Ilustração esquemática referente à dinâmica da expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR na região do istmo da tuba uterina de fêmeas bovinas ao longo do ciclo estral.	50
Figura 6. Expressão relativa dos genes ESR1, ESR2 e PGR entre grupos FP e CL.	51
Figura 7. Expressão relativa dos genes ESR1, ESR2 e PGR entre grupos CL e FG.	52
Figura 8. Expressão relativa dos genes ESR1, ESR2 e PGR entre grupos FG e FP.	53

Figura 9. Esquema ilustrativo referente à produção de agregados celulares (etapa 1) e à dinâmica da expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR nos grupos experimentais (etapa 2).

57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenhos dos pares de oligonucleotídeos diretos e reversos dos genes GAPDH, ESR1, ESR2 e PGR.	45
Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão (DP) e medianas (seguida de valor mínimo e máximo) da quantidade de células do istmo na etapa pré-cultivo, e do número de agregados celulares da tuba uterina formados na etapa pós-cultivo nos diferentes grupos experimentais.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

CL	Corpo Lúteo
COUP-TFII	Fator de transcrição de ovalbumina de galinha II
CX43	Conexinas 43
DEPC	Dietilpirocarbonato
DLD	Domínio de ligação ao DNA
DLL	Domínio de ligação ao ligante C terminal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAC	DNA complementar
DNT	Domínio N terminal
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatos
DP	Desvio Padrão
E ₂	Estrógeno
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ER α	Receptor de Estrógeno α
ER β	Receptor de Estrógeno β
ESR1	Gene que codifica a transcrição do receptor de estrógeno α
ESR2	Gene que codifica a transcrição do receptor de estrógeno β
FG	Folículos grandes
FGF	Fator de crescimento Fibroblástico
FOXJ1	Fatores de transcrição <i>Forkhead</i> 1
FP	Folículos pequenos
GPX4	Glutathione peroxidase 4
h	hora
Hand 2	Produtos expressos e derivados de coração e crista neural do tipo 2
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2
Ihh	<i>Indian hedgehog</i>

K.O.	<i>Knock Out</i>
LABODE	Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinases
OVGP1	Glicoproteína ovidutal 1
P ₄	Progesterona
PCRq	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGG2	Prostaglandina G2
PGR	Gene que codifica a transcrição do receptor de progesterona
PGRMC1	Componente da membrana no receptor de progesterona 1
PGRMC2	Componente da membrana no receptor de progesterona 2
PR-A	Isoforma A do gene que codifica a transcrição do receptor de progesterona
PR-B	Isoforma B do gene que codifica a transcrição do receptor de progesterona
PI3	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PKA	Proteínas quinases do tipo A
PR	Receptor de Progesterona
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
SOG	Glicoproteína ovidutal sulfatada
TALP	Tyrodé-albumina-lactato-piruvato
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. HIPÓTESES	19
3. OBJETIVOS	19
4. REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1. Características gerais da tuba uterina	20
4.2. Hormônios esteroides e sua atuação na tuba uterina	23
4.3. Modelos de cultivo <i>in vitro</i> de células da tuba uterina	28
4.3. Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa (PCRq)	34
5. MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1. Local	39
5.2. Experimento	39
5.3. Cultivo <i>in vitro</i> de células de tuba uterina	40
5.3.1. Coleta e processamento das células da tuba uterina	40
5.3.2. Coleta de TU para a realização da análise de PCRq	42
5.3.3. Realização da técnica de PCRq dos fragmentos do istmo	43
5.3.3.1. Extração de RNA total	43
5.3.3.2. Síntese de cDNA	44
5.3.3.3. Desenho de oligonucleotídeos	44
5.3.3.4. RT-PCRq	45
5.4. Análise estatística	45
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

Ao longo das décadas, maior ênfase foi direcionada para a relevância da tuba uterina nos processos que culminam na eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas. Isso porque os primeiros estudos envolvendo a tuba uterina apontavam esse segmento como uma estrutura passiva no trato reprodutivo, responsável apenas pelo transporte de gametas e embriões no seu interior. Entretanto, atualmente, sabe-se que essa estrutura é dinâmica. Ou seja, a composição tecidual se modifica quanto à proporção de células e substâncias secretadas ao longo do ciclo estral, além de modular os processos de seleção espermática, formação do reservatório espermático, transporte de gametas, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (Suarez *et al.*, 1998; Binelli *et al.*, 2018).

Anatômica e didaticamente, a tuba uterina é composta pelo infundíbulo, ampola e istmo e o epitélio desses três segmentos é composto por células ciliadas e secretórias. A proporção de células ciliadas aumenta do istmo, local em que ocorre a formação do reservatório espermático, em direção ao infundíbulo. Uma vez que os espermatozoides passam pelos processos de capacitação espermática e reação acrossômica, eles são transportados para a ampola da tuba uterina. Esse transporte também é mediado pelas células ciliadas. No epitélio tubárico também se encontram as células secretórias, responsáveis pela síntese e secreção de substâncias que compõem o fluido da tuba uterina. Dentre os três segmentos da tuba uterina, a ampola apresenta maior proporção desse tipo celular (Donnez *et al.*, 1985; Hunter, 2012; Binelli *et al.*, 2018).

Por ser uma estrutura dinâmica, a proporção de células da tuba uterina e o perfil do seu microambiente se modifica ao longo do ciclo estral. Essas alterações são mediadas pelo estrógeno (E_2) e progesterona (P_4) e um dos mecanismos de ação desses esteroides é através do mecanismo clássico, ou seja, mediado por receptores. Nesse sentido, ao longo de toda porção tubárica são encontrados receptores de E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$) e de P_4 (PR) e, uma vez que esses esteroides se ligam aos seus receptores, eles induzem a transcrição de genes que, uma vez ativados, executam determinada função no organismo (Abdel-Hafiz e Horwitz, 2014; Hagan e Lange, 2014).

Dada a relevância dessas células nos processos fisiológicos citados anteriormente, uma série de trabalhos foram desenvolvidos visando estudar de forma mais aprofundada os papéis desenvolvidos por esses tipos celulares. Para isso, diversos modelos de cultivo celular *in vitro* foram desenvolvidos. Todavia, atualmente, um dos modelos mais utilizados é o cultivo de

células da tuba uterina para formação de agregados celulares, intitulados de explantes (Suarez *et al.*, 1998). Por meio desse modelo, alguns estudos foram direcionados para a busca de informações sobre a interação dessas estruturas com as células espermáticas e sua relação com a fertilidade de reprodutores; a correlação desses agregados e a capacitação espermática de sêmen sexado e convencional; e a interação desses agregados com embriões e as substâncias por eles produzidas (Gualtieri e Talevi, 2003; Rajagopal *et al.*, 2006; Ulbrich *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2017; Ferraz *et al.*, 2017).

Embora já tenha sido amplamente relatada a influência fisiológica dos esteroides sobre a tuba uterina e apesar de todo o avanço apontado no cultivo de agregados celulares, ainda não foram desenvolvidos trabalhos que correlacionem a influência de diferentes domínios hormonais, ao longo do ciclo estral, com a capacidade de formação desses agregados. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de formação de agregados celulares a partir do cultivo de células do istmo da tuba uterina de fêmeas bovinas apresentando diferentes estruturas ovarianas, além de correlacionar os resultados com a expressão dos genes ESR1 (que codifica a transcrição do receptor de E₂ do subtipo α - ER α), ESR2 (que codifica a transcrição do receptor de E₂ do subtipo β - ER β) e PGR (que codifica a transcrição do receptor de P₄ – PR) no istmo de fêmeas bovinas.

2. HIPÓTESES

1. A capacidade de formação de agregados celulares oriundos do cultivo de células do istmo tubárico difere em função da influência dos esteroides em que essas estruturas estão submetidas.
2. Tubas uterinas sob influências esteroidais distintas, apresentam diferenças na expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR que influenciam a capacidade de formação dos agregados celulares.

3. OBJETIVOS

- 1- Estudar a capacidade de formação e contabilizar o número de agregados celulares oriundos de células do istmo de tuba uterina provenientes de tratos reprodutivos contendo

ovários com folículos inferiores à 5 mm (Grupo folículos pequenos; FP), com folículos entre 8-10 mm (Grupo folículos grandes; FG) e ovários com corpo lúteo (Grupo CL).

2- Correlacionar a capacidade de formação desses agregados com a expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR no istmo dos diferentes grupos experimentais.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Características gerais da tuba uterina

Os primeiros estudos envolvendo a tuba uterina apontavam esse segmento como uma estrutura passiva do trato reprodutivo, responsável apenas pelo transporte de gametas e embriões no seu interior. Todavia, atualmente, sabe-se que a tuba uterina é uma estrutura extremamente dinâmica e está envolvida nos processos de seleção de espermatozoides, formação do reservatório espermático, capacitação espermática, transporte de gametas, desenvolvimento embrionário inicial e ativação do genoma embrionário (Hunter, 1988; Suarez *et al.*, 1998).

Anatomicamente, constitui-se em um tubo musculomembranoso de grande mobilidade com comprimento de 20-25 cm nos bovinos. Ela se comunica com o útero através da junção útero-tubárica e é dividida em três segmentos: infundíbulo, ampola e istmo. O infundíbulo apresenta uma estrutura de funil e em sua extremidade é constituído das fímbrias, que são prolongamentos ou pregas da mucosa do infundíbulo. As fímbrias apresentam íntimo contato com a superfície ovariana pois são responsáveis pela captação e transporte dos oócitos liberados no período da ovulação. A porção final do infundíbulo se conecta à região da ampola (Bai, 2011).

Nos bovinos, a porção da ampola é a região da tuba uterina com maior diâmetro e representa o local em que ocorre a fertilização. Essa região é composta por pregas ou dobras longitudinais primárias, secundárias e terciárias e compõe dois terços do comprimento da tuba uterina. Adicionalmente, é a região que apresenta maior capacidade de secreção para composição do fluido da tuba uterina, quando comparado aos outros segmentos. Além disso, em quantidade superior às outras regiões, na ampola da tuba uterina são secretadas proteínas como as embriocinas, responsáveis pela manutenção da viabilidade embrionária; osteopontinas,

indutoras da reação acrossomal e proteínas do choque térmico (Saint – Dizier *et al.*, 2012; Binelli *et al.*, 2018).

A ampola se conecta com o istmo através da junção ístmica-ampular e, ao contrário do que foi descrito sobre a ampola, o istmo é o segmento da tuba uterina que apresenta o menor diâmetro e o lúmen mais estreito. Adicionalmente, possui a camada muscular mais desenvolvida, quando comparado à região da ampola, a qual possui inúmeras dobras longitudinais adjacente a uma fina camada de musculatura lisa (Wrobel *et al.*, 1993; Yaniz *et al.*, 2000; Ferraz *et al.*, 2017).

No istmo da tuba uterina ocorre a formação dos reservatórios espermáticos, isso porque seu lúmen estreito, com poucas vilosidades, favorece o íntimo contato dos espermatozoides com o epitélio tubárico. Nessa região, os espermatozoides se conectam às células ciliadas e permanecem ligados a elas até o momento próximo da ovulação. Essa interação é mediada por carboidratos. Ou seja, na cabeça dos espermatozoides existem as proteínas de ligação espermática (BSP) que se conectam à fucose, carboidrato presente na membrana das células ciliadas do istmo. Por meio dessa interação, ocorre a modulação na expressão gênica e produção de proteínas no ambiente tubárico, objetivando aumentar a viabilidade dos gametas e do embrião a ser produzido posteriormente (Suarez *et al.*, 1998; Gualtieri e Talevi, 2003; Suarez e Wu, 2016).

Histologicamente, da região externa em direção ao lúmen, a tuba uterina é dividida em: serosa; camada muscular, que inclui uma camada longitudinal e outra circular; lâmina própria, que sustenta as pregas da mucosa e mucosa, com seu epitélio de revestimento (Hafez, 2002).

No infundíbulo e na ampola, a camada muscular é composta de uma camada circular interna e alguns feixes longitudinais externos de músculo liso. No istmo, porém a camada muscular é mais proeminente e une-se à camada muscular circular uterina. Do infundíbulo em direção à junção útero-tubárica ocorre a redução no diâmetro do lúmen em função do aumento na camada mucosa e na proporção de musculatura lisa nesses segmentos (Hafez, 2002).

A lâmina própria da tuba uterina é constituída de tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos. A mucosa é revestida por epitélio simples cilíndrico ou pseudoestratificado cilíndrico, formado por células ciliadas e células secretórias (Dellmann e Brown, 1982; Abe, 1996). A proporção dessas células varia de acordo com o segmento tubárico em questão. Nesse sentido, a quantidade de células ciliadas aumenta à partir do istmo até o infundíbulo, por outro lado, as células secretórias são encontradas em maiores quantidades na ampola, quando comparado ao istmo e ao infundíbulo (Binelli *et al.*, 2018).

As células ciliadas estão envolvidas no transporte de gametas e embriões, formação dos reservatórios espermáticos e, em menor proporção, secreção de moléculas. Essas células apresentam grande quantidade de mitocôndrias, uma vez que precisam de energia produzida à partir de ATP, para realizarem seus batimentos sob influência do E_2 (Hafez, 2002; Binelli *et al.*, 2018).

Por outro lado, as células secretórias apresentam uma maquinaria especializada para a síntese e secreção de substâncias que compõem o fluido da tuba uterina, sendo este último constituído pelas secreções dessas células, pelo fluido peritoneal, pelo fluido folicular e pelo transudato do plasma sanguíneo. Além disso, por apresentarem essas funções, o citoplasma dessas células é rico de organelas como o retículo endoplasmático rugoso e lisossomos. Elas apresentam a capacidade de autorrenovarem e, também, de darem origem às células ciliadas durante a fase estrogênica do ciclo estral (Donnez *et al.*, 1985; Hunter, 2012; Binelli *et al.*, 2018).

As células epiteliais (ciliadas e secretórias) da tuba uterina são polarizadas, isto é, apresentam dois pólos bem definidos, sendo eles o pólo basal ou basolateral e o pólo apical. O pólo apical está direcionado para o interior do lúmen da tuba uterina enquanto que o pólo basal está direcionado para a região da lâmina própria. Essa característica relacionada a polaridade celular se deve às junções do tipo *Tight* presentes entre essas células. As *Tight junctions* são junções de oclusão, presentes na região superior da membrana celular lateral de duas células adjacentes. São assim chamadas por apresentarem uma característica de impedir o efluxo de proteínas a partir dos compartimentos basal e apical. Além disso, são constituídas de proteínas denominadas de claudinas (Bai, 2011).

Além das *Tight junctions*, as células da tuba uterina são conectadas entre si por pelo menos quatro tipos de junções intercelulares, sendo eles as *gap junctions*, as junções de adesão, os desmossomos e os hemidesmossomos. As *gap junctions* são classificadas em junções comunicantes, uma vez que são constituídas de canais constituídos de conexinas, responsáveis por conectarem o citoplasma de células adjacentes e permitirem a troca de íons, moléculas e nutrientes entre elas. As junções de adesão conectam os filamentos de actina entre as células vizinhas. Os desmossomos e hemidesmossomos são protrusões da membrana plasmática, constituídas de cadesinas e integrinas, respectivamente, responsáveis por ancorar às células umas às outras e também à lâmina própria da tuba uterina (Grund e Grümmer, 2018).

4.2. Hormônios esteroides e sua atuação na tuba uterina

Ao longo do ciclo estral o ambiente tubárico e a proporção de suas células se modificam, sendo os hormônios esteroides os principais moduladores dessas alterações. Isso se deve à presença de receptores de E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$) e P_4 (PR) ao longo dos segmentos da tuba uterina. Nesse sentido, uma vez que esses esteroides se ligam em seus receptores, eles modulam o ambiente tubárico bem como a sua morfologia.

À medida em que ocorre o desenvolvimento folicular e as quantidades de E_2 aumentam, na ausência do domínio progesterônico realizado pelo CL, a proporção de células nos diferentes segmentos da tuba uterina se modifica. Dessa forma, durante as fases de proestro e estro o número de células ciliadas, a extensão desses cílios, bem como o volume do fluido tubárico, oriundo das células secretórias, aumentam (Ayen *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2016; Lamy *et al.*, 2016).

O E_2 prepara o trato reprodutivo para que a célula espermática tenha condições de chegar à ampola da tuba uterina, sítio de fertilização do gameta feminino. Através desse esteroide, os cílios da tuba uterina movimentam-se transportando o espermatozoide ao longo do istmo e da ampola. Além disso, sob influência do E_2 , a musculatura lisa uterina contrai, auxiliando o transporte espermático ao longo do trato reprodutivo até a tuba uterina (Hafez, 2002). Em contrapartida, durante as fases de metaestro e diestro, quando as concentrações de P_4 aumentam gradativamente no plasma sanguíneo, a proporção de cílios e sua extensão diminuem, assim como o volume do fluido da tuba uterina. Acredita-se que P_4 diminua a expressão de genes responsáveis pela produção de proteínas como a multiciclina e ciclina, responsáveis pelo crescimento ciliar tubárico. Assim, a P_4 é considerada um esteroide que apresenta um efeito inibitório na ciliogênese no interior da tuba uterina (Lamy *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018).

Os hormônios esteroides apresentam dois mecanismos de ação: o mecanismo clássico e o não clássico. O mecanismo clássico é mediado pela ligação dos esteroides aos seus receptores. O receptor de progesterona apresenta três domínios de ligação, sendo eles: o Domínio de ligação ao ligante C terminal (DLL) e ele apresenta um subdomínio de transcrição denominado de AF_2 ; Domínio de ligação ao DNA (DLD); e o Domínio N terminal (DNT) que apresenta um subdomínio de ativação transcricional denominado de AF_1 . No mecanismo de ação clássico, a P_4 se liga ao seu receptor e desencadeia mudança conformacional no subdomínio AF_2 , compondo o DLL. Essa alteração conformacional recruta proteínas que ativam genes de transcrição para que seja executada determinada ação causada pela P_4 no organismo.

Por outro lado, o mecanismo de ação não clássico envolve modificações pós transcricionais no PR tais como a fosforilação. Assim, uma vez que o PR é fosforilado, ele é transportado para o núcleo da célula, se ligando ao DNA e induzindo a transcrição de genes que, uma vez ativados, executam suas respectivas funções no organismo (Abdel-Hafiz e Horwitz, 2014; Hagan e Lange, 2014; Binelli *et al.*, 2018).

Na tuba uterina, a P_4 pode atuar através de dois receptores: o receptor nuclear convencional (PR) e suas bioformas: PR-A e PR-B; e os receptores referidos como componentes da membrana no receptor de P_4 1 e 2 (PGRMC1 e 2). O PGRMC1 é uma proteína de 26 a 28 kDa e pertence à família de receptores P_4 associados à membrana (Saint-Dizier *et al.*, 2012). Estudos sugerem que o PGRMC 1 apresenta ações anti-apoptóticas em células da granulosa de roedores (Peluso *et al.*, 2006) e, além disso, essa proteína atua na reação acrossômica em suínos e humanos (Losel *et al.*, 2005), na maturação de oócitos bovinos (Luciano *et al.*, 2010; Aparicio *et al.*, 2011) e no relaxamento miométrial em humanos (Wu *et al.*, 2011).

Na espécie bovina, durante a fase pré-ovulatória, conhecida pelo domínio estrogênico, ocorre aumento na expressão de PR-A na tuba uterina. Todavia, ao iniciar a fase lútea, essa isoforma diminui sua expressão. Por outro lado, a isoforma PR-B é igualmente expressa na tuba uterina, principalmente no istmo, ao longo de toda a fase lútea (Ulbrich, 2003). Vegeto e colaboradores (1993) demonstraram que o PR-A atua como um inibidor na expressão de genes que, sob domínio progesterônico, são naturalmente expressos. Por outro lado, o PR-B atua como um ativador na transcrição de genes sensíveis ao domínio progesterônico. Nesse sentido, a PR-A parece alterar seu padrão de expressão em função da variação na concentração de esteroides ao longo do ciclo estral e, sendo assim, modula as funções progesterônicas na tuba uterina. Todavia, a PR-B, por apresentar um padrão constante de expressão ao longo da fase lútea, parece estimular, via expressão gênica, as ações mediadas pela P_4 no ambiente tubárico.

Ulbrich e colaboradores (2003), ao utilizarem tubas uterinas oriundas de vacas abatidas em frigorífico, buscaram identificar a variação na expressão de receptores de P_4 ao longo do ciclo estral, por meio da técnica de PCRq. Nesse trabalho, os autores identificaram que, durante a fase folicular, em que as concentrações de E_2 são crescentes, ocorre *feedback* positivo que desencadeia aumento no número de transcritos de RNAm de PR na tuba uterina. Por outro lado, ao longo da fase lútea, em que as concentrações plasmáticas de P_4 estão elevadas, o número de transcritos de RNAm de PR é menor, quando comparado à fase folicular. Assim, o E_2 foi identificado como o grande regulador na expressão de PR na tuba uterina, potencializando, posteriormente, as ações da P_4 no ambiente tubárico.

O E₂ apresenta dois tipos de receptores, sendo eles o α e β , transcritos dos genes ESR1 e ESR2, respectivamente. Esses receptores também apresentam variados domínios de ligação, sendo eles o Domínio de região terminal N; Domínio C; D; E e F. Da mesma forma ao que foi descrito para a P₄, o mecanismo de ação clássico envolve a ligação do E₂ ao seu receptor, desencadeando alterações conformacionais em seus domínios. Tais alterações recrutam proteínas específicas que induzem a transcrição de determinados genes alvo. Esses genes, uma vez ativados, executam suas respectivas funções.

Por outro lado, no mecanismo de ação não clássico, acredita-se que a proteína G, ligada à membrana plasmática das células, contém um receptor específico, denominado de receptor estrogênico acoplado à proteína G. Nesse sentido, o E₂ se liga nesse receptor, ativando segundos mensageiros que, por sua vez, atuarão em outras moléculas que desencadeiam funções específicas no organismo (Mosselman *et al.*, 1996; Genazzani, 2000; Simpson e Santen, 2015; Binelli *et al.*, 2018).

No trato reprodutivo, o ER α é o subtipo expresso em maior predominância. No entanto, em tecidos como a glândula mamária e ovário, o ER β se expressa em maior quantidade e desempenha papel mediador nas funções estrogênicas (Pelletier *et al.*, 2000). Ulbrich e colaboradores (2003) realizaram um estudo objetivando identificar e quantificar os receptores ER α e ER β em tubas uterinas de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico, ao longo do ciclo estral. Além disso, nesse mesmo estudo, os autores isolaram as células das tubas uterinas, suplementando, em seu meio de cultivo, E₂ e P₄. Esse procedimento foi realizado com o objetivo de comparar a dinâmica de expressão de receptores ER α e ER β antes e após a suplementação com esteroides. Foram retiradas amostras de sangue para dosagem de E₂ e P₄ dos animais abatidos.

Por meio desse estudo, os autores identificaram que, quando as concentrações plasmáticas de E₂ estavam elevadas, foram encontrados mais transcritos de RNAm dos receptores ER α na tuba uterina. Da mesma forma, *in vitro*, quando as células foram suplementadas com E₂, o número de transcritos dos receptores ER α também se elevaram, conforme identificado pela técnica de PCRq. De acordo com os autores, esse padrão de expressão de receptores dependente da concentração plasmática de E₂, e também se repete para o tecido endometrial, em bovinos (Xiau e Goff, 1999). Ainda nesse trabalho, foi possível identificar que o aumento na expressão de ER β estava associado à altas concentrações de P₄ tanto *in vivo*, quanto na suplementação desse esteroide *in vitro*. A Figura 1 sintetiza os resultados descritos anteriormente.

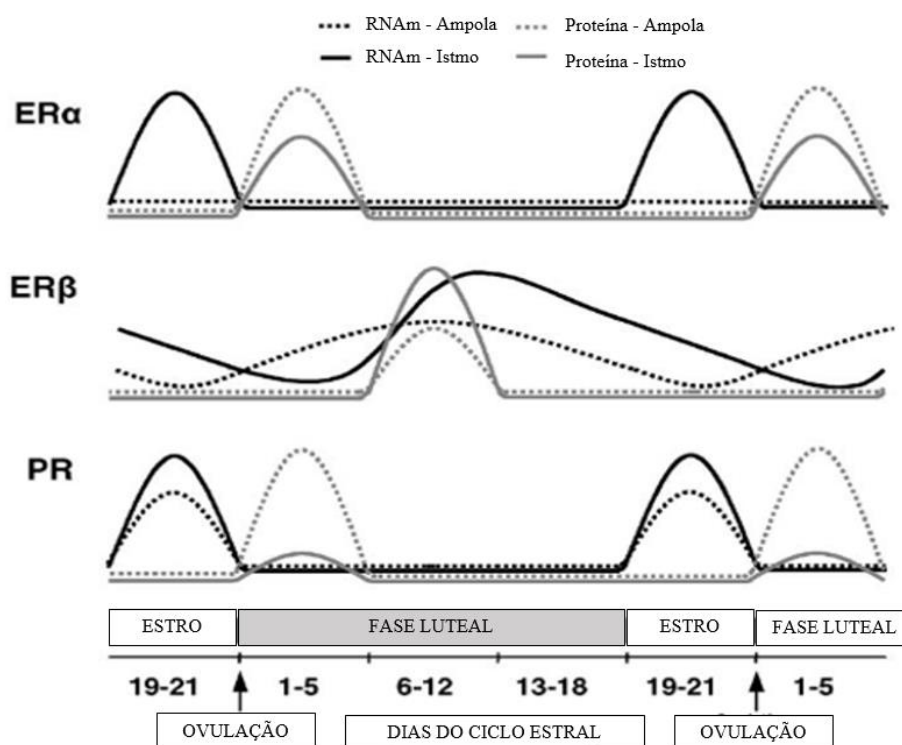


Figura 1. Dinâmica da expressão dos receptores de E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$) e P_4 (PR) ao longo do ciclo estral na região do istmo e ampola da tuba uterina de fêmeas bovinas (Adaptado de Ulbrich *et al.*, 2003).

Em contrapartida, quando as células da tuba uterina foram suplementadas com *in vitro* E_2 , a expressão de $ER\beta$ permaneceu inalterada. Nesse sentido, os autores acreditam que a P_4 exerça regulação na expressão desse receptor, enquanto o E_2 não executa essa função, assim como aconteceu nos $ER\alpha$. De acordo com eles, é possível que o $ER\beta$ iniba mecanismos que desencadeiam funções estrogênicas, nessa fase do ciclo estral. Adicionalmente, por meio da técnica de imunohistoquímica, os autores identificaram maior quantidade de núcleos celulares corados para os receptores β , quando comparado aos receptores α na região do istmo, indicando a maior abundância do subtipo β nessa região da tuba uterina (Xiau e Goff, 1999). Esses resultados são ilustrados a seguir, na Figura 2.

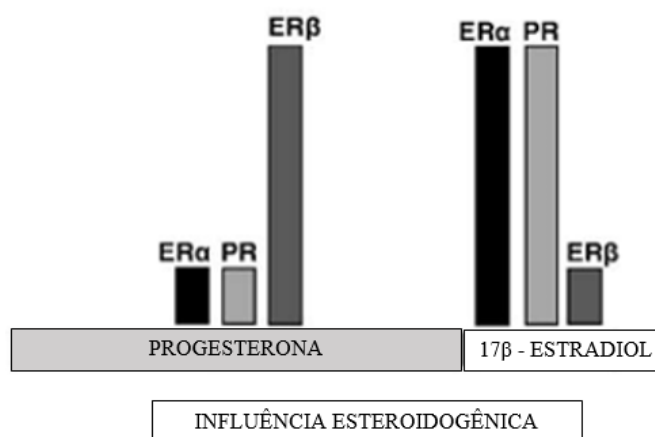


Figura 2. Dinâmica da expressão de receptores E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$) e P_4 (PR) em células do istmo e da ampola cultivadas *in vitro* e suplementadas com E_2 e P_4 (Adaptado de Ulbrich *et al.*, 2003).

Em outro estudo mais recente na espécie bovina, Hazano *et al.* (2021) utilizaram tubas uterinas e ovários de animais abatidos e buscaram mensurar as concentrações tubáricas de E_2 e P_4 na fase folicular, imediatamente pós-ovulação e na fase lútea inicial. Além disso, os autores investigaram a relação das concentrações de E_2 e P_4 na tubas uterinas e a expressão de genes como o *ESR1*, que codifica a transcrição do $ER\alpha$; do *ESR2*, que codifica a transcrição do $ER\beta$; e do *PGR*, que codifica a transcrição do PR.

O delineamento experimental foi dividido em quatro momentos ao longo do ciclo estral, sendo os intervalos entre os dias 0 e 1 (momento em que ocorre a ovulação do folículo dominante); 2 a 4 (momento pós ovulação, em que se inicia a fase de metaestro e, por consequência formação do corpo lúteo); 5 a 7 (momento em que o corpo lúteo foi formado e encontra-se ativo e maduro, produzindo as maiores concentrações de P_4); 19 a 21 (momento em que já ocorreu a luteólise, os animais encontram-se na fase do estro, em que as concentrações de E_2 estão elevadas).

Os resultados demonstraram que o ambiente tubárico nos dias 19 a 21 do ciclo estral foi caracterizado por alto E_2 e baixa P_4 , alta expressão de *ESR1* e *PGR* e baixa expressão de *ESR2*. Já os dias 0 e 1 foram caracterizados pelo meio endócrino sem dominância hormonal, enquanto o ambiente tubárico nos dias 2 a 4 e nos dias 5 a 7 foi caracterizado por tendência oposta das concentrações de hormônios e expressão de RNAm de seus receptores, quando comparado aos dias 19 a 21.

4.3. Modelos de cultivo *in vitro* de células da tuba uterina

Dada a relevância da tuba uterina e as células que compõem seu epitélio nos processos fisiológicos citados anteriormente, diversos trabalhos foram desenvolvidos visando estudar, de forma mais aprofundada, os papéis desempenhados por esse segmento do trato reprodutivo. Para isso, diversos modelos de cultivo celular *in vitro* foram desenvolvidos, um exemplo deles é o cultivo de monocamadas de células da tuba uterina. Nesse modelo experimental, as células da tuba uterina podem ser isoladas de seu revestimento epitelial por duas formas: pelo método enzimático, com o uso da tripsina associada ao ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); ou por separação mecânica, mediante a compressão do epitélio da tuba uterina por meio de lâminas de vidro usadas em rotinas laboratoriais (Gualtieri e Talevi, 2003; Hollinshead *et al.*, 2003; Aldarmahi, 2016).

De forma geral, no método enzimático, as amostras de tuba uterina são lavadas em PBS e seu lúmen é preenchido com a tripsina – EDTA. Essas peças são submetidas a incubação de 90 minutos em atmosfera de 39°C e 5% CO₂. Logo em seguida, esse conteúdo é inserido em tubos Falcon e direcionado para centrifugação, ressuspensão em meio de cultivo, e direcionado para cultivo em estufa em atmosfera de 39°C e 5% CO₂ (Aldarmahi, 2016).

Por outro lado, a separação mecânica envolve a realização de ligeira compressão ao longo da tuba uterina, com auxílio de lâminas de vidro, usadas em rotinas laboratoriais. Dessa forma, é possível separar as células da tuba uterina de seu epitélio e, assim, recuperá-las em tubos Falcon suplementados com meios de cultivo (Aldarmahi, 2016). Assim como no método enzimático, esse conteúdo também é submetido a centrifugação, ressuspensão e cultivo à 39°C e 5% CO₂ com períodos variáveis, de acordo com o delineamento experimental de cada estudo.

Neste modelo, as células são cultivadas em garrafas e o meio de cultivo é submetido a trocas em intervalos que variam de 12 a 48 horas (Gualtieri e Talevi, 2003; Aldarmahi, 2016). Durante o período de incubação, as células da tuba uterina se organizam linearmente, formando monocamadas. Esse modelo experimental tem como objetivo a investigação das funções da tuba uterina *in vitro*, assim como a interação dessas células epiteliais com os espermatozoides (Ellington *et al.*, 1990; Ellington *et al.*, 1999).

Além disso, estudos investigando a interação dessas células com embriões em fase inicial de desenvolvimento já foram relatados. Nestes últimos trabalhos, esse modelo experimental foi útil para obter informações relacionadas a produção de fatores embriotróficos

e a influência das células tubáricas sobre a ativação do genoma embrionário (Galndolfi e Moor, 1987; Nancarrow e Hill, 1994; Ferraz *et al.*, 2017).

O uso do modelo de monocamadas de células da tuba uterina apresenta como principal vantagem a possibilidade de utilização das células tubáricas, sem sinais de deterioração, por um período superior a 24 horas de cultivo. Isso porque uma das etapas desse modelo envolve a substituição dos meios de cultivo, renovando-os, o que favorece o aumento da viabilidade dessas células. Outra grande vantagem é que esse é um modelo pouco laborioso e de metodologia simples de ser empregada (De Pauw *et al.*, 2002; Gualtieri *et al.*, 2012).

Por outro lado, períodos de cultivo superiores a 48 horas podem prejudicar a atividade secretora, a polaridade, altura e a integridade ciliar das células do epitélio tubárico, além da perda de receptores presentes nessas estruturas (Gualtieri *et al.*, 2012). Nesse sentido, essas alterações comprometem a manutenção da integridade da arquitetura celular. Adicionalmente, a comunicação celular, mecanismo essencial para a homeostase celular, torna-se inviabilizada, o que torna este modelo menos adequado no estudo de interações específicas entre gametas e embriões com as células da tuba uterina (Pampaloni *et al.*, 2007).

Outro modelo de cultivo relatado na literatura são os organoides celulares. Neste modelo, dois métodos para seu desenvolvimento já foram descritos. No primeiro método, pequenos fragmentos de tuba uterina foram cultivados no interior de um recipiente com matriz de alginato, substância componente de parede celular de algas (King *et al.*, 2011). O segundo, baseou-se na utilização de células tronco da região distal da tuba uterina, cultivando-as em uma matriz de membrana basal suplementada com fatores de crescimento, como fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento transformador β (TGF- β) (Paik *et al.*, 2012).

Os organoides permitem a realização de estudos voltados para a expressão gênica de células ciliadas, atividade secretora do epitélio tubárico, avaliação do fluido da tuba uterina, interação de espermatozoides, oócitos e embriões com essas células, assim como a formação de reservatórios espermáticos (Kessler *et al.*, 2015). Como vantagem, esse método permite que as células se proliferem e formem estruturas em formato 3D, denominadas de esferóides. Os organóides apresentam células epiteliais colunares altamente polarizadas, isto é, com os polos basal e apical facilmente identificados e orientados como ocorre *in vivo*.

O epitélio é totalmente diferenciado, com células ciliadas e secretoras que podem se comunicar diretamente (por meio das junções intercelulares do tipo *tight*) ou indiretamente (por meio substâncias secretadas) com gametas e embriões (Paik *et al.*, 2012). Por outro lado, o acesso aos compartimentos basal e luminal desse sistema de cultivo só é possível mediante ao

uso de micromanipuladores e de conhecimento técnico para seu correto manuseio (Ferraz *et al.*, 2017).

Outro modelo, com alguns pontos em comum aos organoides, é o sistema de cultivo *ex vivo* da tuba uterina, relatado em estudos em humanos (Kervancioglu *et al.*, 1994; Rajagopal *et al.*, 2006). Neste modelo, a tuba uterina é mantida em PBS a 4°C até que seja processada. O processamento envolve a incubação dessas peças em meio de cultivo suplementado com DNase durante 48 a 72 horas a 4°C. As células epiteliais são desagregadas umas das outras e submetidas à centrifugação e ressuspensão em meio de cultivo suplementado com penicilina ou estreptomicina. Posteriormente, elas são distribuídas em placas de cultivo contendo meio de crescimento celular e incubadas a 37°C a 5% de CO₂ (Levanon *et al.*, 2010).

Esse modelo é utilizado em estudos que objetivam avaliar aspectos relacionados a carcinogênese de segmentos da tuba uterina. Entretanto, a cinética das células ciliares, a atividade secretora das células da tuba uterina, a identificação de marcadores genéticos, perfil proteico, e características do sistema imune já foram relatados em estudos utilizando o sistema de cultivo *ex vivo* da tuba uterina (Levanon *et al.*, 2010). Como vantagem, destaca-se a utilização um sistema que possibilita a co-cultura de células ciliadas e secretoras da tuba uterina, além da preservação da arquitetura tecidual e celular, uma vez que apresenta formado 3D.

Adicionalmente, as células mantêm a polaridade e morfologia características e preservam sua capacidade secretória e, também, a capacidade de responderem a injúrias. No entanto, como desvantagem, destaca-se o alto custo para desenvolvimento e manutenção dessas estruturas, uma vez que o próprio fragmento da tuba uterina é isolado, cultivado, e deve permanecer íntegro ao longo de todo o período de cultivo (Rajagopal *et al.*, 2006).

Atualmente, contudo, o modelo laboratorial mais utilizado para o cultivo de células da tuba uterina é pela formação de agregados celulares (Lefebvre *et al.*, 1997; Suarez *et al.*, 1998; Binelli *et al.*, 1999; Fazeli *et al.*, 1999). O conceito de explante da tuba uterina está relacionado com a formação de agregados de células epiteliais que se organizam para formarem vesículas com cílios ativos em sua superfície externa (Ferraz *et al.*, 2017). Esse é um modelo de cultivo celular em formato 3D. Para que essas estruturas sejam formadas, as células da tuba uterina são isoladas do epitélio através de pressão mecânica, utilizando lâminas de vidro, ao longo de todo o segmento tubárico. Esse procedimento permite que as células epiteliais e estromais sejam desagregadas do tecido tubárico e se desprendam em conjunto em direção ao lúmen da tuba uterina (Silva, 2021).

Uma vez que essas células se desprendem em conjunto em direção ao lúmen, é necessário que, após a recuperação, elas sejam submetidas a pipetagens sequenciais com o

objetivo de desagregá-las umas das outras. Esse procedimento é possível de ser realizado já que, ao serem recuperadas, essas células ainda agregadas umas às outras são colocadas em tubos Falcon contendo meio TALP (constituído de TCM 199 e soro fetal bovino à 10%). Sendo assim, o conteúdo celular e o meio de cultivo são submetidos a pipetagens sequenciais, até que as células da tuba uterina se desprendam umas das outras. À medida que esse procedimento é realizado, essas células também passam por lavagens em meio TALP (Silva, 2021).

Dessa forma, durante essa etapa, inicialmente elas são submetidas à pipetagens sequenciais e, em seguida, esse conteúdo é separado para decantação, de maneira que as células, por serem mais densas, deslocam para o fundo do tubo Falcon e o meio TALP permanece na superfície. Em seguida, o sobrenadante é retirado e, no tubo Falcon, adiciona-se meio de cultivo novo, para que as células sejam submetidas novamente à etapa de desagregação. Esse processo é repetido até que as células da tuba uterina estejam completamente desagregadas umas das outras. Para isso, à cada lavagem, esse conteúdo é avaliado microscopicamente com o auxílio de estereomicroscópios.

Posteriormente, esse conteúdo (células da tuba uterina e o meio de cultivo) é colocado em placas de Petri e levado para cultivo em estufa a 39°C e 5% CO₂, por 18 a 24 horas. Durante esse período, as células anteriormente desagregadas se reorganizam formando os agregados celulares. Ao final do período de cultivo, essas estruturas são avaliadas quanto à sua movimentação (devido ao batimento das células ciliares), tamanho e quantidade de agregados formados (Carvalho *et al.*, 2017).

Convencionalmente, a porção tubárica mais utilizada para esse modelo experimental é o istmo (Carvalho *et al.*, 2017; Celin, 2019; Silva, 2021). Todavia, outros trabalhos já desenvolveram essa técnica de cultivo utilizando os segmentos da ampola e infundíbulo (Lefebvre *et al.*; 1997; Suarez *et al.*, 1998; Binelli *et al.*, 1999; Fazeli *et al.*, 1999). É importante ressaltar que por meio desse modelo experimental, assim como dos outros citados anteriormente, o objetivo primário é mimetizar o ambiente tubárico *in vivo*, de modo buscar informações por meio de análises *in vitro* que permitam inferir, pelo menos em parte, sobre os eventos fisiológicos desencadeados na tuba uterina.

Através desse modelo, Petrunkina e colaboradores (2001) buscaram identificar a influência do trato reprodutivo de fêmeas suínas, do segmento tubárico utilizado para a formação dos agregados celulares, e da concentração espermática de cinco varrões sobre a capacidade de interação dos espermatozoides com os agregados celulares. Para isso, esse estudo foi dividido em três etapas. Em uma das etapas, os autores buscaram comparar a capacidade de espermatozoides suínos, nas concentrações de $2,5 \times 10^4$ e $4,0 \times 10^5$ spz/mL, em se ligarem aos

agregados celulares oriundos das células do istmo de fêmeas suínas, nos primeiros 15 minutos de incubação. Os autores identificaram correlação positiva entre a concentração espermática e a capacidade dos espermatozoides em se ligarem aos agregados celulares. Ou seja, quanto maiores foram as concentrações espermáticas, mais rapidamente e, mais facilmente, os espermatozoides se ligaram aos agregados celulares.

Em outra etapa, os autores cultivaram agregados celulares oriundos da ampola ou do istmo da tuba uterina de fêmeas suínas e compararam a capacidade dos espermatozoides (10^5 spz/mL) de se ligarem a esses agregados. As amostras de sêmen de cada reprodutor foram cultivadas individualmente com os agregados celulares oriundos das células da ampola ou do istmo. Ao fazerem isso, os autores buscaram identificar possíveis diferenças nas taxas de ligação dos espermatozoides aos agregados celulares oriundos de diferentes segmentos da tuba uterina. Ao final dessa etapa, os autores não encontraram diferença significativa na taxa de ligação das células espermáticas aos agregados celulares.

Por fim, os autores compararam a taxa de ligação de espermatozoides (10^5 spz/mL) de varrões aos agregados celulares oriundos do istmo de porcas vs. marrãs. As amostras de sêmen de cada reprodutor foram cultivadas individualmente com os agregados celulares oriundos do istmo de porcas vs. marrãs. Não foram encontradas diferenças significativas na taxa de ligação dos espermatozoides aos agregados celulares oriundos de tuba uterina de porcas adultas vs. marrãs indicando, na prática, que independente da condição do trato reprodutivo, os espermatozoides interagem com o epitélio tubárico de forma semelhante.

Em outro estudo, Carvalho e colaboradores (2017) trabalharam com agregados de células do istmo da tuba uterina bovina para compararem a capacidade de interação de espermatozoides, sexados ou não sexados, com esses agregados celulares. Após 30 minutos de incubação não houve diferença entre os grupos controle e sexado, no número de espermatozoides ligados aos agregados celulares. Contudo, após 24 h, o grupo controle (sêmen descongelado não sexado) apresentava maior quantidade de espermatozoides ligados aos agregados celulares em comparação com o grupo sexado. Os autores propõem que o processo de sexagem pode ter interferido negativamente na habilidade dos espermatozoides de manterem a ligação às células tubáricas, uma vez que a técnica de sexagem pode causar desestabilização de membrana, iniciando processo de capacitação espermática e reação acrossômica, prejudicando a formação do reservatório espermático.

Por permitir maior integridade celular, a avaliação da atividade secretora das células da tuba uterina e a regulação da atividade ciliar dos agregados celulares também já foram relatados nesse modelo experimental (Hyde e Black, 1986; Ferraz *et al.*, 2017). Nesse sentido, Erickson-

Lawrence e colaboradores (1989) pesquisaram o efeito de hormônios esteroides (E_2 e P_4) na secreção de glicoproteínas em agregados oriundos de células do istmo vs. da ampola de coelhas. Para isso, esses agregados (células da ampola vs. células do istmo) foram cultivados sem suplementação de esteroides (grupo controle) ou com suplementação de esteroides (10 ng/ml de E_2 ou 10 ng/ml de E_2 + 20 ng/ml P_4). Nesses três grupos experimentais, a concentração da glicoproteína ovidutal sulfatada (SOG) foi determinada.

Os autores encontraram que o agregados celulares cultivados com E_2 e P_4 secretaram maior quantidade de SOG, quando comparado com agregados celulares do grupo controle, enquanto os agregados celulares cultivados apenas com E_2 não diferiu do grupo controle. Além disso, os agregados oriundos de células da ampola e do istmo apresentaram diferenças na capacidade de secreção de SOG. Nesse sentido, os agregados oriundos das células da ampola secretaram 650 ng de SOG, enquanto para os agregados oriundos das células do istmo, essa secreção foi de 30 ng. De acordo com os autores, esses achados sugerem que a ampola e o istmo da tuba uterina, sob estímulo conjunto do E_2 e P_4 , secretam maiores quantidades de SOG, glicoproteína responsável por auxiliar no desenvolvimento embrionário. Além disso, quando comparadas, as células oriundas da ampola sobressaem nessa capacidade secretória.

Como vantagem, o cultivo de agregados celulares é uma técnica de fácil execução e alta repetibilidade, dispensando, pelo menos em parte, a mão de obra especializada. Além disso, os agregados celulares da tuba uterina são capazes de manter sua morfologia diferenciada, caracterizada por cílios, numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e expressão de marcadores de células epiteliais, como por exemplo a glicoproteína ovidutal 1 (OVGP1), glutathione peroxidase 4 (GPX4) e proteínas da família dos fatores de transcrição *Forkhead 1* (FOXJ1) (Ferraz *et al.*, 2017). Sendo assim, esse conjunto de fatores aumentam o custo-benefício para a execução dessa técnica, tornando-a acessível de ser incorporada nas rotinas laboratoriais.

Por outro lado, uma desvantagem é a viabilidade limitada do agregados celulares que, após 48 horas, perdem sua diferenciação celular de maneira que as células dessa estrutura tornam-se planas e perdem seus cílios (Rottmayer *et al.*, 2006). Períodos superiores a 48 horas de cultivo podem induzir a deterioração celular, prejudicando sua viabilidade e integridade. Rottmayer e colaboradores (2006) cultivaram agregados celulares oriundos de células da ampola e do istmo de fêmeas bovinas, ao longo de 24 horas, e avaliaram a expressão quantitativa de genes relacionados à transcrição de receptores de E_2 , P_4 e da enzima glutathione peroxidase, que atua nos mecanismos antioxidantes celulares. Ao final das 24 horas, os autores identificaram que, a partir de 6 horas de cultivo, os transcritos gênicos dos receptores de E_2 e

da enzima glutathione peroxidase diminuíram significativamente. Além disso, outra desvantagem relacionada ao cultivo dessas estruturas *in vitro* é a necessidade do uso de grandes volumes de meio de cultivo, durante os períodos de incubação (Gualtieri *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2017; Ferraz *et al.*, 2017).

4.4. Reação em cadeia da Polimerase Quantitativa (PCRq)

O uso de biotecnologias envolvendo a análise genômica se iniciou na década de 60 e, inicialmente, teve como alvo o estudo de microorganismos em determinados sistemas ambientais, como em águas termais, com o objetivo de comparar e caracterizar o material genético desses microorganismos (Giovannoni *et al.*, 1990). Essas técnicas possibilitaram a descrição de grande parte de linhagens microbianas presentes em sistemas ambientais, assim como a descoberta de marcadores de genéticos presentes nesses microorganismos (Larkin *et al.*, 2005). Todavia, apesar de toda contribuição trazida para a comunidade científica, essas técnicas apresentam protocolos de longa duração e pouca repetibilidade. Além disso, são técnicas de baixa sensibilidade, ou seja, demandam grande quantidade de amostras de RNA para que os ensaios sejam devidamente realizados e apresentem resultados fidedignos (Zinn *et al.*, 1983; Melton *et al.*, 1984).

Em 1985, outra biotecnologia empregada pelo cientista Kary Mullis, foi a RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), que permite a amplificação do material genético de uma amostra com o objetivo de identificar a presença de segmentos específicos de nucleotídeos no DNA ou RNA de uma célula ou tecido. Nessa técnica, a partir de uma amostra biológica de interesse, é feita a extração do RNA dessa amostra. Uma vez que o RNA dessa amostra é isolado, ele é submetido à transcrição reversa, ou seja, à partir de uma fita de RNA é produzido uma fita de DNA complementar (DNAC), que será usada para amplificação. Esse processo de amplificação é mediado pela enzima polimerase. A polimerase é uma enzima de DNA termoestável, utilizada para sintetizar novos filamentos de DNA complementares à sequência de DNA de uma amostra.

Na reação, essa enzima é introduzida com o molde de DNA (material genético inicial que contém a sequência alvo), os *primers* (pequenos fragmentos de fita de DNA projetados para se ligarem à sequência de DNA alvo e indicar para a DNA polimerase a direção para se iniciar a síntese da fita complementar do DNA alvo) e nucleotídeos (unidades das bases de DNA, também conhecidas como desoxinucleotídeos trifosfatos [dNTPs]) (O'Driscoll L *et al.*, 1993; Khuang *et al.*, 2018).

Para as amostras cujo material genético isolado é o DNA e não o RNA, o primeiro passo para a amplificação do genoma de interesse é a desnaturação da fita dupla do DNA extraído de uma amostra. Ou seja, para que os *primers* se liguem na fita de DNA simples e a DNA polimerase inicie a síntese da fita complementar de DNA, é necessário que o DNA da amostra, inicialmente presente em fita dupla, tenha suas fitas fragmentadas. Nesse sentido, de forma geral, a técnica é realizada através de três reações repetidas ciclicamente: desnaturação (aquecimento da amostra à 90°C para separação da fita dupla de DNA), anelamento (redução da temperatura para, em média, 55°C, permitindo a ligação do primer na fita de DNA), e polimerização (síntese da fita de DNAC). Ao final desse processo, a sequência alvo é amplificada em bilhões de cópias da fita de DNA alvo (O'Driscoll L *et al.*, 1993; Khuang *et al.*, 2018).

Essa biotécnica foi considerada um divisor de águas para a biologia molecular, uma vez que por meio da amplificação de uma única fita de DNA foi possível identificar segmentos específicos de nucleotídeos presentes no genoma de uma célula ou tecido. Contudo, essa técnica fornece informação qualitativa, ou seja, se uma determinada sequência de nucleotídeos está presente ou não no DNA de uma amostra.

Na década de 90, a RT- PCR passou por modificações, de maneira que a amplificação do material genético, realizada convencionalmente, passou a ser quantificada. Nesse sentido, os segmentos de DNA a serem estudados puderam ser identificados, por meio do processo de amplificação, e também quantificados. Por esse motivo, esse aprimoramento deu lugar à técnica de RT- PCRq ou, convencionalmente conhecida por PCR quantitativa (PCRq) (Higuchi *et al.*, 1992; Bustin *et al.*, 2009).

Ao contrário da técnica de PCR tradicional, a PCRq é capaz de detectar a amplificação dos segmentos de DNA ao final de cada ciclo, por meio de um sistema de corante fluorescente e um termociclador, com capacidade de detecção de fluorescência. O PCRq é rápido e fácil de executar em comparação com outros métodos de quantificação de RNA, como *Northern Blotting* e Hibridização *in situ*. Além disso, o método de detecção de PCRq é mais sensível e específico em comparação com os outros ensaios, ou seja, é capaz de identificar a presença de nucleotídeos de interesse, em baixos níveis de expressão nas células e tecidos (O'Driscoll *et al.*, 1993; Bustin *et al.*, 2005).

De maneira geral, a PCRq é realizada em sete etapas principais: (1) aquisição e manipulação das amostras experimentais; (2) extração de RNA ou DNA total de amostras experimentais; (3) avaliação da concentração e qualidade do RNA ou DNA; (4) síntese de cDNA a partir do RNA ou DNA extraído; (5) otimização das condições para o ensaio PCRq;

(6) otimização da técnica de PRCq para medir o nível de expressão dos genes alvo; e (7) análise de dados.

Uma vez obtidas, as amostras devem ser submetidas a um processo de higienização para retirada do excesso de sangue, tecido conjuntivo e adiposo. Os materiais utilizados na coleta devem ser trocados periodicamente, de maneira a reduzir a contaminação das células de interesse. Em seguida, as amostras devem ser congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e permanecerem congeladas até a extração do RNA/DNA, com o mínimo de manipulação possível. Para a extração do material genético das amostras, é necessário que sejam descongeladas e ressuspensas em TRIzol. O TRIzol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que simultaneamente solubiliza o material biológico (por exemplo, tecidos e células de origem humana, animal, vegetal, leveduriforme ou bacteriana) e desnatura proteínas, permitindo que as fitas de RNA/DNA sejam extraídas de um tecido ou de uma célula. Ao final desse processo, o material biológico, em fase aquosa, é transferido para outro recipiente e é submetido à precipitação, por meio da adição de etanol ao conteúdo (Nolan *et al.*, 2006; Rio *et al.*, 2010).

Após a extração, o material genético deve ser avaliado quanto a sua pureza, isto é, ausência de contaminação, e sua concentração. Para isso, a amostra é inserida em um gel de agarose e corante fluorescente e direcionada para a análise em um espectrofotômetro UV/VIS. Por meio desse equipamento é realizada a medição da quantidade de luz absorvida pelo DNA/RNA, em solução no comprimento de onda de 260 nanômetros. Quanto maior for a absorção de luz nesse comprimento de onda, maior a concentração de DNA/RNA na solução. A absorbância a 260 nanômetros (A260) fornece medição específica da concentração de ácido nucleico, e a absorbância de 280 nanômetros (A280) mede a concentração de proteínas.

Para verificar se uma amostra foi contaminada com proteínas e outras substâncias, ou se apresenta concentrações adequadas de DNA/RNA, é feito um cálculo em que se divide a quantidade de luz absorvida por uma amostra, no comprimento de onda de 260 nanômetros, pela quantidade de luz absorvida pela amostra no comprimento de luz de 280 nanômetros. Valores entre 1,4 e 2,0 indicam pureza adequada das extrações de DNA/RNA, enquanto valores abaixo de 1,4 podem significar a presença de proteínas ou outros contaminantes.

Por outro lado, ao avaliar o gel de agarose, para que uma amostra apresente o material genético íntegro, sem contaminações, é necessário identificar duas bandas de RNA nítidas que representam as subunidades grandes e pequenas de RNAs ribossômicos (28S e 18S). Além disso, uma das bandas deve apresentar uma intensidade de coloração superior à outra, sendo a

banda de 28S apresentando coloração mais intensa do que a banda de 18S (Fleige, 2006; Cicinnati *et al.*, 2008; Ahlfen e Schlumpberger, 2010).

Durante a transcrição reversa, a enzima transcriptase reversa utiliza o modelo da fita de RNA e *primers* para direcionarem a síntese da primeira fita de DNAC, que é então usada como modelo para a reação de amplificação na PCRq. A forma como a fita de DNAC é sintetizada pode variar de acordo com o tipo de *primer* utilizado. Existem os *primers oligo-dT*, que são sequências curtas de nucleotídeos desoxitimidina usados para produzir cópias completas do mRNA, ligando-se à extremidade 3' (ou cauda poliA) da fita de mRNA, ou ainda, os *primers* aleatórios, que podem se ligar ao longo de todo o comprimento do RNA, garantindo a transcrição reversa de todas as sequências de RNA devido à sua estrutura aleatória.

Ao optar pelo uso de *primers oligo-dT*, é possível que a TaseR interrompa a síntese da DNAC ao encontrar estruturas ligadas na extremidade 5' da fita de RNA, impedindo o processo completo de transcrição reversa, por exemplo. Por outro lado, ao optar pelo uso de *primers* aleatórios, eles não dependem da presença da cauda poliA na fita de RNA e são menos sensíveis à variação na qualidade do RNA, porém, todavia, são menos específicos e seletivos para os tipos

Durante a reação de PCRq propriamente dita, para que a amplificação da fita de DNAC, contendo a sequência de nucleotídeos de interesse seja quantificada, esse processo precisa ser marcado com substâncias fluorescentes. Assim, a fluorescência emitida será lida e posteriormente convertida em valores quantificáveis, na etapa de análise de dados. Para isso, existem alternativas quanto a substância fluorescente a ser utilizada na PCRq, tais como a sonda de hidrólise ou, ainda, o uso de corantes de DNA. A detecção de fluorescência, baseada em sonda de hidrólise, requer um par de *primers* e uma sonda de hidrólise, que é um fragmento de DNA específico de sequência curta que pode se ligar a uma sequência de nucleotídeos de interesse.

A sonda de hidrólise é assim chamada pois contém um marcador de corante fluorescente na extremidade 5' e um inibidor de fluorescência na extremidade 3'. Durante o ciclo de PCRq, tanto os *primers* quanto a sonda irão emparelhar com a sequência alvo a ser amplificada. Assim, a cada vez que novos filamentos de DNA são sintetizados pela enzima (Taq DNA polimerase), a enzima cliva a sonda e separa o corante do inibidor de fluorescência. Ou seja, durante cada ciclo, mais moléculas de corante são liberadas da sonda e isso resulta em aumento na intensidade da fluorescência, proporcional à quantidade de novos filamentos de DNA sintetizados.

A especificidade proporcionada pela sonda de hidrólise garante que a fluorescência, emitida durante o PCRq, seja derivada apenas da amplificação da sequência alvo e, portanto, é uma alternativa mais sensível e reprodutível do que os corantes de ligação ao DNA (Yin *et al.*, 2001; Kuang *et al.*, 2018). Outra opção é o uso de corantes de DNA. O mais utilizado é o SYBR Green, que é um corante de ligação de DNA popularmente usado em PCRq e apenas fluoresce quando ligado a DNA de fita dupla, e não na presença de DNA de fita simples. O custo de empregar o SYBR Green como um método de detecção PCRq é muito menor do que as sondas de hidrólise, e tem sido sugerido como a química mais econômica para investigações iniciais e etapas de otimização de *primers* (VanGuilder *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2015).

A etapa final do processo é a análise de dados, ou seja, a análise quantitativa da fluorescência emitida, como consequência da presença de determinados segmentos de nucleotídeos presentes do material genético de uma amostra biológica. Durante essa etapa, dois métodos estão disponíveis para quantificar resultados de PCRq, sendo eles a curva padrão ou quantificação absoluta, e a quantificação relativa (Arya *et al.*, 2005).

Na quantificação relativa, é utilizado um algoritmo de computador que avalia a emissão de fluorescência durante a amplificação da PCRq a cada 8,5 segundos, gerando um valor quantitativo representado pela variável AR_n . Esse valor reflete quanto o corante presente na sonda de hidrólise foi degradado. O algoritmo ajusta uma função exponencial aos valores médios de AR_n dos últimos três pontos de dados de cada ciclo da PCRq, gerando um gráfico de amplificação. Um limite relativo de emissão fluorescente é definido com base na linha de base do AR_n , durante os primeiros 10-15 ciclos. O algoritmo calcula o ciclo no qual cada amplificação de PCR atinge um limiar (CT) significativo (ou seja, geralmente 10 vezes o desvio padrão da linha de base). Assim, o valor CT é uma medida quantitativa das cópias do gene de interesse encontradas em uma amostra.

Esse é um método de avaliação comparativo e é usado para calcular os níveis de expressão relativos de um gene em uma amostra de interesse, em relação a uma amostra controle de referência (Gibson *et al.*, 1996; Arya *et al.*, 2005). Neste método, os resultados são expressos em ordem de grandeza, ou seja, quantas vezes um gene foi expresso na amostra de interesse, quando comparado à amostra convencional.

Por outro lado, na quantificação absoluta, é necessário construir uma curva padrão. Para isso, uma amostra pura, contendo um número de cópias de RNA previamente conhecido, é submetida à cinco ou dez diluições. Após cada diluição, uma nova quantificação de RNA é realizada ao longo desse processo, e a variação na quantidade de RNA é influenciada pelas

diluições que é utilizada para construção da curva padrão. Em seguida, utilizando a amostra de interesse e com RNA ainda não quantificado, o mesmo procedimento é realizado e, ao final do processo, a curva padrão é comparada à curva de expressão de RNA da amostra de interesse e valores numéricos são obtidos, o que nos permite afirmar, com maior precisão, o quão expresso é determinado gene, dentro de uma amostra de interesse (Arya *et al.*, 2005; VanGuilder *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local

A primeira etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Reprodução Animal e no Laboratório de Cultivo Celular da Universidade Federal do Espírito Santo (Alegre, ES).

A segunda etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento (LABODE), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

5.2. Experimento

Inicialmente, foram coletadas tubas uterinas de fêmeas bovinas oriundas de frigorífico sob inspeção estadual e, no laboratório de Reprodução Animal da UFES, parte das tubas uterinas foram direcionadas para cultivo *in vitro* para formação dos agregados, e a outra parte das tubas uterinas foram armazenadas em nitrogênio líquido para posterior realização da PCRq.

No frigorífico, as tubas uterinas foram classificadas em três grupos experimentais, de acordo com as características ovarianas, ou seja, foram selecionadas as tubas uterinas de tratos reprodutivos contendo ovários com folículos inferiores à 5 mm (Grupo folículos pequenos; FP), com folículos entre 8-10 mm (Grupo folículos grandes; FG), e ovários com corpo lúteo (Grupo CL). Sendo que neste último grupo, os ovários selecionados deveriam apresentar corpos lúteos na proporção de 80% da superfície ovariana, coloração variando do castanho escuro ao laranja e vascularização evidente na periferia da estrutura Ireland et al. (1980).

Para a primeira etapa do experimento (cultivo *in vitro* para formação dos agregados celulares), as células do istmo dos três grupos foram cultivadas *in vitro* para formação dos agregados celulares durante 24 horas e, ao final deste período, foi verificada a capacidade de

formação dos agregados celulares e o número de agregados formados em cada grupo experimental. Foram realizadas 5 repetições dessa etapa experimental. Cada dia de coleta e cultivo celular, foi considerado uma repetição e, para cada dia de coleta, duas tubas uterinas de animais distintos, de cada grupo experimental, contendo as características descritas anteriormente, foram selecionadas. Nesse sentido, nessa etapa, ao todo, foram coletadas 30 tubas uterinas.

Na segunda etapa do experimento (análise de PCRq) foram coletadas tubas uterinas e as células armazenadas em botijão de nitrogênio líquido e, posteriormente, encaminhadas para o Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento (LABODE), do ICB na UFMG. No laboratório foi realizada a técnica de PCRq para estudo da expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR expressos no istmo das tubas uterinas de vacas dos três grupos experimentais. Foram coletadas seis tubas uterinas de cada grupo experimental, totalizando 18 tubas uterinas.

O detalhamento de toda a metodologia realizada em ambas as etapas está descrito a seguir.

5.3. Cultivo *in vitro* de células de tuba uterina

5.3.1. Coleta e processamento das células da tuba uterina

A coleta das células da tuba uterina e a formação dos grupos experimentais foram definidos de acordo com características ovarianas dos tratos reprodutivos dos quais as células foram recuperadas, sendo: grupo folículos pequenos (FP; células do istmo proveniente de trato reprodutivo cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresentava folículos menores que 5 mm, certificando-se ausência de CL em ambos os ovários); grupo folículos grandes (FG; células do istmo proveniente de trato reprodutivo cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresentava um ou mais folículos com diâmetro entre 8-10 mm, certificando-se ausência de CL em ambos os ovários); grupo corpo lúteo (CL; células do istmo proveniente de trato reprodutivo cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresentava CL).

Os complexos de tuba uterina e ovários foram coletados em abatedouro e transportados ao laboratório de reprodução animal em solução salina (NaCl 0,9%) aquecida à 35 °C, onde as células foram separadas do epitélio. Para isso, as tubas uterinas foram dissecadas com o auxílio de tesouras (Wiltex, São Paulo, Brasil) para remoção de tecidos adjacentes. Após dissecação, a região do istmo foi separada considerando até 6 cm a partir da junção útero tubárica, sendo este segmento utilizado para obtenção das células epiteliais da tuba uterina.

As tubas uterinas foram colocadas individualmente em placas de Petri descartáveis de 60X15 mm (ProLab, São Paulo, Brasil) e cobertas de TALP (TCM-199 com sais de Hank's, Gibco, BRL[®]) suplementado com soro fetal bovino à 10% (SFB, Gibco BRL[®]) e 100 UI/mL de amicacina (Pareun, Ourofino, São Paulo, Brasil). Os fragmentos de istmo foram pressionados em toda sua extensão com o auxílio de lâminas de vidro (Vision Glass, Rio Grande do Sul, Brasil), sendo as células epiteliais da tuba uterina extravasadas para o meio TALP (Figura 3).

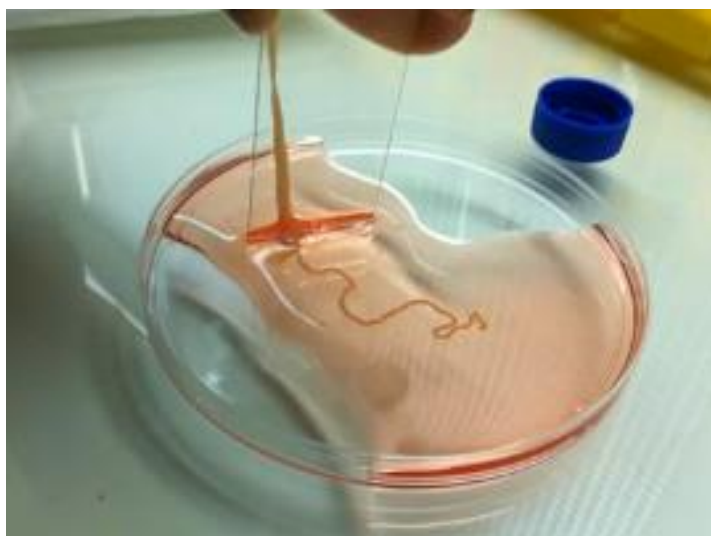


Figura 3. Recuperação das células do istmo tubário por meio da separação mecânica, utilizando pressão com lâminas de vidro sobre toda a extensão do fragmento de tecido, proveniente de cada grupo experimental. Foto cedida pelo prof. Dr. José Carvalho Neto (UFES).

Após a coleta, as células foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL (Kasvi, Paraná, Brasil) e submetidas à lavagens, com o objetivo de desagregá-las umas das outras. Para as lavagens, foram utilizados, em média, 5mL de meio TALP. Na primeira lavagem, as células foram desagregadas com pipetador automático de 1mL e separadas para decantação. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e, no tubo Falcon, adicionou-se meio de cultivo novo, para que as células fossem submetidas à etapa de desagregação novamente.

Na segunda e terceira lavagem, as células foram transferidas para placas de Petri, devidamente identificadas para cada grupo experimental, e, para desagregação, foram utilizados escalpes de 19 gauge acoplado a uma seringa de 10 mL. As células desagregadas, das tubas uterinas de cada grupo experimental, foram transferidas para placas de Petri descartáveis (60 x 15mm; ProLab, São Paulo, Brasil) contendo volume final aproximado de 25 mL de meio TALP.

Por meio de estereomicroscópio no aumento de 2X (Nikon SMZ 645, Tóquio, Japão), os agrupamentos celulares foram classificados, de forma subjetiva e visual numa escala de 1 a 5, quanto a quantidade de células epiteliais presentes na placa de Petri, sendo 1 = pouquíssimas células; 2= poucas células; 3= quantidade mediana de células; 4:grande quantidade de células; 5 = quantidade ideal de células nas amostras de cada grupo experimental, durante a etapa pré cultivo. Na sequência, essas células foram cultivadas em estufa a 39°C e 5% de CO₂ por 24h para formação de agregados celulares.

Após 8h de cultivo foi realizada troca de 50% do meio TALP, sendo que ao final das 24 horas de cultivo, os agregados celulares formados foram avaliados com o auxílio de estereomicroscópio, em aumento de 2X (Nikon SMZ 645, Tóquio, Japão). Durante avaliação foi realizada contagem do número de agregados formados em cada grupo experimental (etapa pós cultivo) (Figura 4).



Figura 4. Rastreamento de placas de Petri para identificação e contagem dos agregados celulares formados após 24 horas de cultivo, para tubas uterinas de cada grupo experimental.

5.3.2. Coleta de tubas uterinas para a realização da análise de PCRq

Para essa etapa do experimento, foram coletadas seis tubas uterinas de trato reprodutivos contendo ovários com folículos inferiores à 5 mm (Grupo FP), seis tubas uterinas de trato reprodutivos contendo ovários com folículos entre 8-10 mm (Grupo FG), e seis tubas uterinas

de trato reprodutivos contendo ovários com CL (Grupo CL), totalizando 18 tubas uterinas de fêmeas bovinas abatidas.

Para cada trato reprodutivo obtido no frigorífico, foi coletada apenas a tuba uterina ipsilateral ao ovário contendo as características ovarianas descritas anteriormente (Grupos FP, FG e CL).

À medida em que os tratos reprodutivos passavam pelas linhas de inspeção, as tubas uterinas eram higienizadas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e eram realizadas incisões com bisturis descartáveis (Wiltex, São Paulo, Brasil) para isolar esse segmento do restante do trato reprodutivo. Uma vez isolada a tuba uterina, novas incisões foram realizadas para isolar o segmento do istmo a partir da junção útero-tubárica, conforme realizado na primeira etapa do experimento.

Os istmos coletados de cada grupo experimental foram colocados separadamente em tubos criogênicos (Corning, São Paulo, Brasil), e posteriormente conservados em botijão de nitrogênio líquido à -196°C até a realização da técnica de PCRq, realizada no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

5.3.3. Realização da técnica de PCRq dos fragmentos do istmo

5.3.3.1. Extração de RNA total

Uma vez coletados os fragmentos do istmo de cada grupo experimental, esses fragmentos foram transferidos para homogeneizador automático. Posteriormente, foram homogeneizados em TRIzol Reagent (Invitrogen - Life Technologies) na proporção de 1 mL de TRIzol para cada 100 mg de tecido. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de tecido macerado em TRIzol, a fim de separar o RNA total dos restos celulares, e o tubo foi incubado à temperatura ambiente, por 3 min.

Em seguida, o material foi centrifugado à 13000 rpm, por 15 minutos à 4°C e, após a centrifugação, a fase aquosa superior foi transferida para tubo limpo, devidamente identificado. O RNA total foi então precipitado pela adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e, após um período de incubação de 10 min à temperatura ambiente, o material foi novamente centrifugado a 13000 rpm a 4 °C por 10 min. O *pellet* foi lavado em etanol 75% (preparado com água tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato - DEPC, para a remoção das RNases) e ressuspensionado em 20 µL com água também tratada com DEPC. Após a ressuspensão, o material foi incubado em

bloco aquecedor por 10 min a 55 °C. A pureza e a concentração do RNA total foram avaliadas por meio de dosagem espectrofotométrica em *NanoDrop® ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer* e eletroforese em gel de agarose a 1 %.

5.3.3.2. Síntese de cDNA

Aproximadamente 1 µg de RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), seguindo instruções dos fabricantes do kit *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Syntesis* (Fermentas). Ao RNA total foi adicionado 0,5 µg de Oligo dT e incubados à 65°C por 5 minutos, em um volume final de 10 µL, para permitir o anelamento do oligo dT às caudas poli(A) dos RNAs mensageiros presentes na amostra. Após esse período, foram adicionados 2 µL de 10 mM dNTP mix, 4 µL do tampão da enzima [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl], 20 U da RiboLock RNase Inhibitor e 200 U da RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. A reação foi incubada a 42°C por 1 hora, seguida de uma desnaturação da enzima por 5 minutos à 70°C. O cDNA foi estocado em freezer -20°C.

5.3.3.3. Desenho de oligonucleotídeos

Pares de oligonucleotídeos foram desenhados para permitir a amplificação de fragmento do RNA mensageiro de genes específicos de fêmeas bovinas (*Bos taurus taurus*). As sequências do RNA mensageiro utilizadas como molde para o desenho dos oligos foram obtidas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, Tabela 1). O programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) foi utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos direto e reverso. O tamanho do amplicon (produto a ser amplificado) sugerido para o programa foi de 200pb. A especificidade dos *primers* foi confirmada por meio de BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os pares de *primers* foram avaliados segundo o software NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>).

Tabela 1. Desenhos dos pares de oligonucleotídeos diretos e reversos dos genes GAPDH, ESR1, ESR2 e PGR.

Gene	Forward	Reverse
GAPDH	CCAGAACATCATCCCTGCTT	ATGCCTGCTTCACCACTT
ESR1	TCCATGGAGCACCCAGGAAAG	CGGAGCCGAGATGACGTAGCC
ESR2	TCCTGAATGCTGTGACCGAC	GTGCCTGACGTGAGAAAGGA
PGR	CCCGCCCTATCTCAACTACC	CCCTTCCATTGCCCTTTT

5.3.3.4. RT-PCRq

A RT-PCRq foi realizada utilizando-se o *iTAqTM Universal SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad). 0,4 µM de cada oligo e os cDNAs foram diluídos na proporção 1:10 provenientes do istmo da tuba uterina de cada grupo experimental. As reações de amplificação de cada fragmento foram realizadas segundo o protocolo: um ciclo de 2 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C e 20 segundos a 72°C e um ciclo de 5 minutos a 72°C.

A reação de controle negativo, ou branco dos *primers* utilizados, foi sintetizada na ausência de cDNA. A RT-PCRq foi realizada com equipamento Rotor Gene 3000 Real Time PCR System, e a análise de expressão diferencial foi realizada utilizando-se o software REST 2009 desenvolvido por Pfaffl e colaboradores (2001, 2002), e os gráficos foram obtidos pelo software GraphPad Prisma. Durante essa etapa, foram realizadas triplicatas técnicas, com o objetivo de padronizar a expressão gênica das amostras utilizadas.

5.4. Análises estatísticas

Na análise estatística da primeira etapa do experimento, para comparação entre os grupos com relação à nota aferida quanto ao número de células pré-cultivo foi realizada a análise de variância e teste de Tukey. Para comparação entre os grupos da quantidade de agregados celulares obtidos pós-cultivo foi realizado o teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. As avaliações foram realizadas por meio do software R 3.6.1 (R Core Team, 2019) e o nível de significância, considerado em todas as análises, foi de 5%.

Para a segunda etapa, a análise de expressão gênica diferencial entre os grupos FG, FP e CL foi realizada utilizando-se o software REST 2009, desenvolvido por Pfaffl e colaboradores

(2001, 2002) e os gráficos foram obtidos pelo software Prisma GraphPad. Para todas as análises, foi considerado 5% de significância.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenvolvido com o intuito de realizar o cultivo de células do istmo da tuba uterina de fêmeas bovinas cujos ovários possuíam folículos grandes (entre 8-10 mm; FG), pequenos (<5mm; FP) ou ainda com CL, além de correlacionar a capacidade de formação de agregados com a expressão dos genes ESR1 (ER α), ESR2 (ER β) e PGR presentes no istmo tubárico dos animais de cada grupo experimental.

Os resultados demonstraram que células do istmo, proveniente de tratos reprodutivos cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresenta CL não possui capacidade satisfatória para formação de agregados celulares obtidos, diferente do observado em tratos reprodutivos de fêmeas que não apresentam CL, em especial aqueles cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresenta folículos entre 8 e 10 mm (grupo FG).

Na etapa pré cultivo, diferenças entre esses dois grupos experimentais também foram observadas. Ou seja, células provenientes de tratos reprodutivos cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresenta CL obtiveram menor nota visual para a quantidade de células recuperadas do istmo, quando comparado ao grupo cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresenta folículos entre 8 e 10 mm.

Assim, esse estudo possibilitou um refinamento da técnica de cultivo de agregados celulares, de maneira que por meio dele, um grupo experimental contendo características ovarianas ipsilaterais à tuba uterina pode ser escolhido, buscando maior formação de agregados durante as etapas de cultivo celular. Adicionalmente, a expressão dos receptores estudados variou nos três grupos experimentais e a expressão gênica permitiu justificar, pelo menos em parte, a diferença na produção dos agregados celulares entre os grupos experimentais.

Os resultados da primeira etapa (Tabela 2) demonstraram que houve diferença ($P<0,05$) com relação à nota visual para a quantidade de células do istmo recuperadas na etapa de pré-cultivo, sendo semelhante ($P=0,654$) entre os grupos FG ($3,4 \pm 0,9$) e FP ($3,0 \pm 0,7$) e entre os grupos FP e CL ($2,2 \pm 0,4$; $P=0,215$), ao passo que foi maior ($P= 0,049$) no grupo FG comparado ao grupo CL.

Adicionalmente, conforme também demonstrado na Tabela 2, o número de agregados celulares formados pós-cultivo diferiu ($P=0,004$) entre todos os grupos experimentais. O grupo FG foi

superior a todos os demais grupos, e o grupo CL inferior aos demais. O grupo FG ($364,0 \pm 139,1$) apresentou maior número de agregados celulares formados em relação aos demais grupos FP ($197,6 \pm 127,7$; $P=0,035$) e CL ($8,0 \pm 11,0$; $P<0,001$), e o grupo FP também apresentou maior número de agregados celulares ($P=0,002$) do que o grupo CL.

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão (DP) e medianas (seguida de valor mínimo e máximo) da quantidade de células do istmo na etapa pré-cultivo e do número de agregados celulares da tuba uterina formados na etapa pós-cultivo nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	Células pré-cultivo (nota de 1 a 5)		Número de agregados celulares da tuba uterina	
	Mediana (min - máx)	Média $\pm$ DP	Mediana (min - máx)	Média $\pm$ DP
FG (Fol. 8-10mm)	4 (2 – 4)	$3,4 \pm 0,9$ a	315 (210 – 568)	$364,0 \pm 139,1$ a
FP (Fol. <5 mm)	3 (2 – 4)	$3,0 \pm 0,7$ ab	202 (47 – 380)	$197,6 \pm 127,7$ b
CL	2 (2 – 3)	$2,2 \pm 0,4$ b	0 (0 – 21)	$8,0 \pm 11,0$ c

FG: grupo folículos grandes - trato reprodutivo cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresentava um ou mais folículos entre 8-10 mm, certificando-se ausência de CL em ambos os ovários; FP: grupo folículos pequenos - trato reprodutivo cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresentava folículos inferiores à 5 mm, certificando-se ausência de CL em ambos os ovários; CL: grupo corpo lúteo -trato reprodutivo cujo ovário ipsilateral à tuba uterina apresentava CL; Células pré-cultivo: nota visualmente aferida (de 1 a 5) de forma subjetiva, referente a quantidade de células epiteliais oriundas do istmo presentes na placa de Petri, antes do cultivo dos agregados celulares; Número de agregados celulares: número absoluto de agregados celulares do istmo formados após 24 horas de cultivo.

a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam $P<0,05$.

a,b: letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam $P<0,05$.

Conforme demonstrado na Tabela 2, o grupo CL, além de produzir menor quantidade de agregados quando comparado aos grupos submetidos à influência estrogênica (FP e FG), também apresentou menor nota relativa à quantidade de células oriundas do istmo, no momento antecedente ao cultivo celular, quando comparado ao grupo sob alta influência estrogênica (grupo FG). Adicionalmente, ainda que não tenham sido encontradas diferenças na nota visual para a quantidade de células no pré-cultivo, entre os grupos FP e CL, essa diferença foi observada após o cultivo, de maneira que mais agregados celulares foram formados no grupo FP, quando comparado ao grupo CL. Destaca-se que o grupo FG apresentou maior capacidade de formação de agregados celulares, em relação a todos os grupos experimentais desse estudo.

Esses resultados estão intimamente associados à influência hormonal pela qual as células tubáricas das vacas desses grupos estavam submetidos. Assim, os grupos FG e FP estavam sob influência estrogênica, um hormônio mitogênico (Cerny *et al.*, 2016), enquanto o grupo CL estava sob influência progesterônica, um esteroide que inibe a proliferação celular. Assim, ainda que o grupo FP não tenha se diferido do grupo CL, na etapa pré cultivo, os efeitos

mitogênicos relacionados ao E₂ no grupo FP possibilitaram maior formação de agregados na etapa pós cultivo, quando comparado ao grupo CL, sob efeitos anti-proliferativos relacionados à P₄.

No que tange a atividade mitogênica das células da tuba uterina, Endsley e colaboradores (2015) ao cultivarem células epiteliais da tuba uterina de ratas, calcularam o tempo de duplicação dessas células, ou seja, o tempo necessário para que essas células proliferem. Ao final, foi possível identificar que o tempo de duplicação das células da tuba uterina de ratas é de, em média, 24.1 horas.

Semelhantemente Brenner (1969) ao avaliar fragmentos de 36 fêmeas de macaco rhesus entre os dias 2 e 27 do ciclo estral, observou que no intervalo entre o dia 4 e 5 do ciclo estral, em que as concentrações de E₂ estão elevadas, a atividade mitótica das células apresenta-se intensa, quando comparado aos outros períodos do ciclo estral, de maneira que são observadas mais células secretórias no epitélio tubárico e maior extensão dos cílios desse epitélio.

Essas informações parecem respaldar, pelo menos em partes, a hipótese levantada neste trabalho de que os agregados sujeitos a ação estrogênica (Grupo FP e FG) apresentaram atividade mitogênica ao longo do período de cultivo quando comparado ao grupo CL, sujeito a ação progesterônica.

Ainda nesse contexto, é possível que a hipótese referente a atividade mitogênica das células da tuba uterina esteja correlacionada a característica dessa estrutura de apresentar uma espécie de reservatório de células secretórias em sua membrana que, por estímulo estrogênico, tem a capacidade de se autorrenovarem ou mesmo diferenciarem em células ciliadas (Ghosh et al., 2017). Partindo desse princípio, é provável que ainda *in vivo*, as tubas uterinas dos grupos FG e FP tenham sofrido a ação estrogênica, de maneira que as células contidas nesses reservatórios tenham sido estimuladas a se proliferarem culminando em uma maior formação de agregados celulares na avaliação pós cultivo, quando comparado ao grupo CL.

Outro ponto a ser discutido é que em função das diferenças relacionadas ao diâmetro dos folículos nos grupos FG e FP, é possível especular que o grupo FG estava sob uma influência estrogênica maior, quando comparado ao grupo FP. Ainda que essa maior influência estrogênica não tenha sido evidenciada na avaliação pré cultivo, na contagem do número de agregados, no pós cultivo essa diferença se tornou evidente. Ou seja, a maior influência estrogênica na qual o grupo FG estava submetido possibilitou a formação de agregados pós cultivo, quando comparado aos demais grupos experimentais.

O efeito inibitório da P₄ sobre a proliferação celular foi relatado por Donnez *et al.* (1985), Wetendorf e DeMayo (2012) e Slayden *et al.* (2022). De acordo com os autores, isso se

deve à capacidade da P₄ em se ligar aos receptores ER α e PR e inibir a proliferação celular. Além disso, a literatura relata que o receptor de P₄ é subdividido em isoformas A e B, sendo a isoforma A a principal responsável por desencadear os efeitos inibitórios do receptor de P₄ sobre a proliferação celular (Mulac-Jericevic *et al.*, 2000). Assim, os efeitos anti-proliferativos da P₄ e seu receptor envolvem a ativação do eixo Ihh–COUP-TFII.

O *Indian hedgehog* (Ihh) é um gene alvo do PR que está presente nas células epiteliais dos tecidos reprodutivos. Quando a P₄ se liga ao seu receptor, ela ativa esse gene denominado de Ihh e, uma vez ativado, ele realiza sinalização para o COUP-TFII, um receptor nuclear responsável por regular os mecanismos de diferenciação celular. O COUP-TFII, por sua vez, desempenha papel na ativação de Hand2 (um fator de transcrição celular) levando à inibição do FGF (Fator de crescimento Fibroblástico) (Wetendorf e DeMayo, 2012). Portanto, no grupo CL, por influência progesterônica, é possível que a cascata ativadora da proliferação celular tenha sido inibida, o que nos permite compreender as baixas pontuações na etapa pré cultivo e, principalmente, de forma mais evidente, após o cultivo, na formação dos agregados celulares.

A formação dos agregados celulares está associada à interação das células da tuba uterina, de maneira que elas se conectam formando estruturas vesiculares (Ferraz *et al.*, 2017). Todavia, na primeira etapa do experimento, as células do istmo de tubas uterinas ipsilaterais aos ovários contendo CL apresentaram baixa ou nenhuma produção de agregados celulares, quando comparado aos grupos FP e FG.

Conforme discutido anteriormente, é possível que esse resultado esteja associado às ações anti-proliferativas da P₄, oriunda do CL. Contudo, esse resultado também pode estar associado à influência direta da P₄ sobre as células tubáricas, de maneira que esse esteroide tenha inviabilizado a comunicação e a adesão célula-célula. Risek *et al.* (1995) e Grund e Grümmer (2018) relataram que a P₄ é um esteroide capaz de diminuir a integridade e resistência das junções do tipo *Tight* e do tipo *Gap* entre células adjacentes. Por meio dessas junções, ocorre o transporte de moléculas e a manutenção da viabilidade celular.

Os efeitos mitogênicos do E₂ são mediados por sua interação com os receptores α , estimulando a produção de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (Berisha *et al.*, 2002; Frasor *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 2007a). O IGF-1 tem a capacidade de ativar componentes como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e a fosfoinositídeo 3-quinase/proteína quinase B (PI3/AKT) que são os principais sinalizadores que desencadeiam a

proliferação celular (Sun *et al.*, 2003; Rowlinson *et al.*, 2008; Baumgarten *et al.*, 2014; Ipsa *et al.*, 2019).

Dessa forma, é possível que os efeitos progesterônicos tenham inviabilizado a formação de agregados celulares no grupo CL, todavia, nos grupos FP e FG, os efeitos estrogênicos tenham desencadeado suas ações mitogênicas, possibilitando, assim, uma maior formação de agregados celulares nesses grupos experimentais (e proporcional à influência estrogênica de cada grupo), quando comparado ao grupo CL.

No que tange à dinâmica da expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR no istmo da tuba uterina de fêmeas bovinas, sabe-se que esta apresenta variações em função do ciclo estral, sendo os hormônios esteróides são os principais moduladores da expressão desses genes. De maneira geral, os genes ESR1 e PGR apresentam-se expressos em maiores níveis durante a fase do estro, marcada pela influência estrogênica, ao passo que, durante a fase luteal, marcada pela influência progesterônica, a expressão desses genes diminui. Além disso, o gene ESR2, apresenta-se expresso de maneira constante ao longo do ciclo estral, conforme demonstrado na Figura 5 (Berisha *et al.*, 2002; Senger, 2003; Ulbrich, 2003).

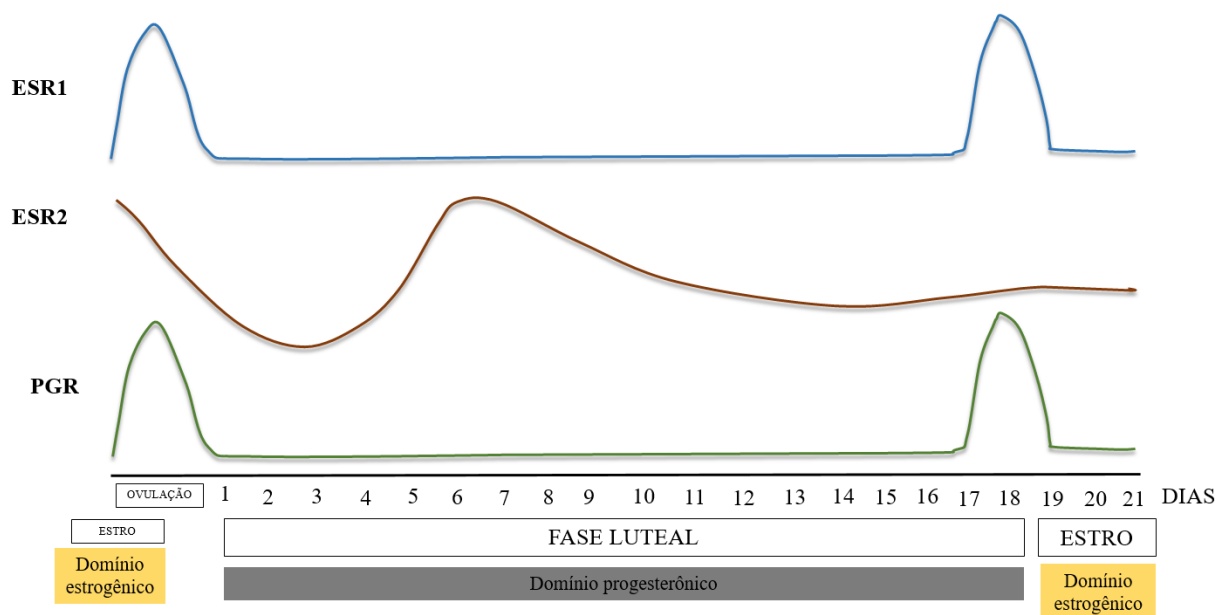


Figura 5. Ilustração esquemática referente à dinâmica da expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR na região do istmo da tuba uterina de fêmeas bovinas ao longo do ciclo estral. Adaptado de Ulbrich *et al.*, 2003.

Contudo, no presente trabalho, quando a expressão dos genes PGR de fragmentos tubáricos dos três grupos experimentais foram comparados, foi possível observar maior expressão de PGR no grupo CL em relação ao grupo FP, bem como maior expressão de PGR no grupo FG em relação ao grupo FP, conforme descrito a seguir (Figuras 6, 7 e 8).

Na Figura 3 é possível observar que a expressão gênica no grupo CL expressou cerca de 20,5X mais o gene PGR, quando comparado ao grupo FP ($P=0,003$). Portanto, no grupo sob domínio progesterônico (grupo CL) a expressão de PGR foi maior, quando comparada ao grupo sob influência estrogênica (FP).

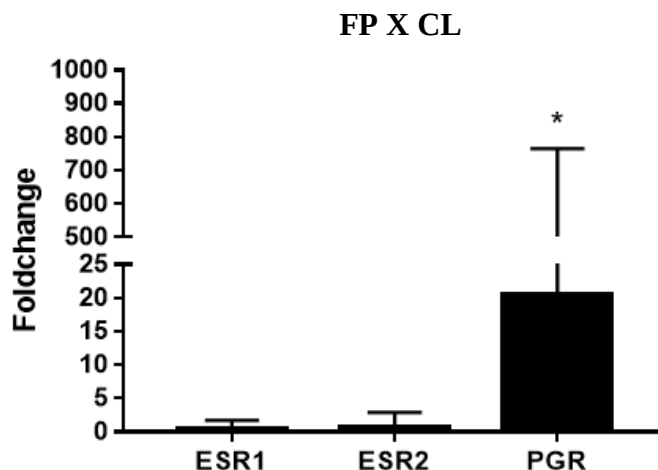


Figura 6. Expressão relativa dos genes ESR1, ESR2 e PGR entre grupos FP e CL. O grupo CL expressou 20,5x mais o gene PGR, quando comparado ao grupo FP; ESR1: gene que codifica a transcrição do $ER\alpha$ (receptor de E_2 - α); ESR2: gene que codifica a transcrição do $ER\beta$ (receptor de E_2 - β); PGR: gene que codifica a transcrição do receptor nuclear de P_4 ; grupo FP: grupo folículos pequenos - tuba uterina cujo ovário ipsilateral apresentava folículos inferiores à 5 mm, certificando-se ausência de CL em ambos os ovários; grupo CL: grupo corpo lúteo – tuba uterina cujo ovário ipsilateral apresentava CL. * indica $P<0,05$.

Por outro lado, na Figura 4 verifica-se que não houve diferença ($P < 0,05$) entre os genes analisados nos grupos FG e CL.

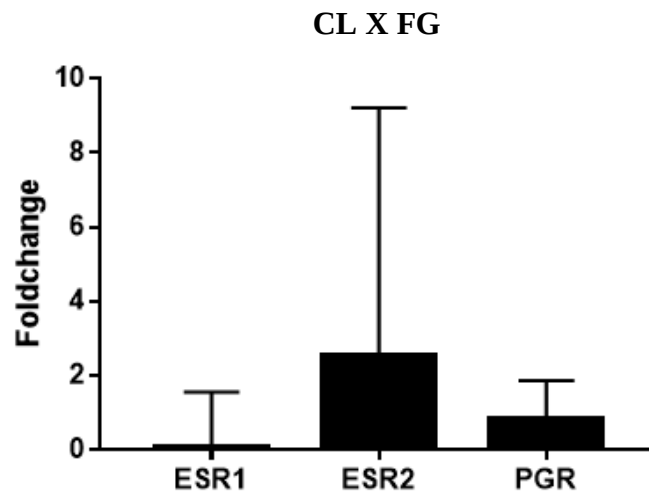


Figura 7. Expressão relativa dos genes ESR1, ESR2 e PGR entre grupos CL e FG. Não foram verificadas diferenças ($P < 0,05$) na expressão comparativa nos genes entre os grupos experimentais; ESR1: gene que codifica a transcrição do $ER\alpha$ (receptor de E_2 - α); ESR2: gene que codifica a transcrição do $ER\beta$ (receptor de E_2 - β); PGR: gene que codifica a transcrição do receptor nuclear de P_4 ; grupo FG: grupo folículos grandes - tuba uterina cujo ovário ipsilateral apresentava um ou mais folículos entre 8-10 mm, certificando-se ausência de CL em ambos os ovários; grupo CL: grupo corpo lúteo – tuba uterina cujo ovário ipsilateral apresentava CL.

Por fim, na Figura 5, é possível observar maior expressão do gene PGR no grupo FG, quando comparado ao grupo FP. Ou seja, quando os grupos FG e FP foram comparados, foi observado que o grupo FP expressou 18,7X mais o gene ESR1 ($P=0,007$) e 0,05X menos o gene PGR, quando comparado ao grupo FG ($P=0,001$).

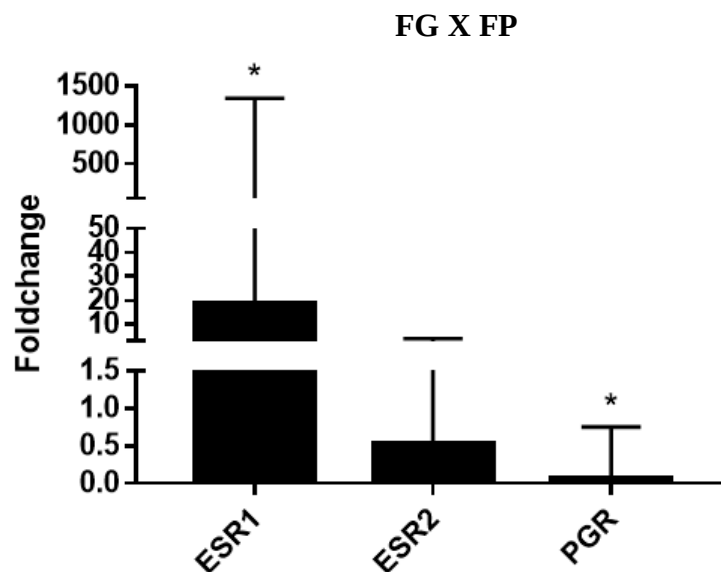


Figura 8. Expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR, no grupo FP, quando comparado ao FG; ESR1: gene que codifica a transcrição do $ER\alpha$ (receptor de $E_2-\alpha$); ESR2: gene que codifica a transcrição do $ER\beta$ (receptor de $E_2-\beta$); PGR: gene que codifica a transcrição do receptor nuclear de P_4 ; FP: grupo folículos pequenos - tuba uterina cujo ovário ipsilateral apresentava folículos inferiores à 5 mm, certificando-se ausência de CL em ambos os ovários; FG: grupo folículos grandes - tuba uterina cujo ovário ipsilateral apresentava um ou mais folículos entre 8-10 mm, certificando-se ausência de CL em ambos os ovários; * Indica $P<0,05$.

A literatura nos permite especular que os resultados obtidos estejam associados à capacidade do E_2 em realizar dupla influência sobre a expressão de PGR. Ou seja, alguns trabalhos (Parczyk *et al.*, 1997; Tibbetts *et al.*, 1998; Kurita *et al.*, 2000b; Wetendorf e DeMayo, 2012) relatam que o E_2 tem a capacidade de estimular e, também, de inibir a expressão do gene PGR. Esse mecanismo inibitório se deve à interação do E_2 com seus receptores, desencadeando efeito de *downregulation* sobre a expressão do gene PGR.

De acordo com os autores, é possível que, em menores concentrações estrogênicas (grupo FP), quando o E_2 se liga aos seus receptores, seja desencadeado efeito inibitório sobre a expressão de PGR, justificando o observado na Figura 3. À medida que a influência estrogênica aumenta esse mecanismo é invertido (Berisha *et al.*, 2002; Ulbrich *et al.*, 2003; Hazano *et al.*,

2021) e, em situações de maior influência estrogênica (grupo FG), há estímulo para a maior expressão de PGR, justificando os achados da Figura 4.

Dessa forma, a literatura parece justificar, pelo menos em parte, a menor expressão de PGR no grupo FP quando comparado ao grupo CL, bem como a maior expressão deste gene no grupo FG em relação ao grupo FP, apresentado na Figura 5. Além disso, a expressão do gene PGR está vinculada não somente à influência de esteroides, mas também à ação de determinadas proteínas (dependentes de P_4) que, ao se ligarem ao PGR, podem estimular sua expressão, assim como inibi-la. É relatado na literatura que essas proteínas (co-ativadoras ou corepressoras de PGR) competem por sítios de ligação neste gene (Mulac *et al.*, 2004; Rekawiecki *et al.*, 2017). Assim sendo, é possível que proteínas co-ativadoras, dependentes de P_4 , tenham se ligado ao PGR, estimulando sua maior expressão no grupo CL, quando comparado ao grupo FP.

Estudos anteriores demonstraram que indivíduos *Knock out* (K.O.) para o gene PGR apresentaram menor ativação de metaloproteinases (MMP), indicando que esse gene está associado com a ativação dessas proteases. As MMP são proteases que clivam proteínas responsáveis por preservarem a adesão celular como as integrinas, que conectam as células à matriz celular (Mulac *et al.*, 2004; Rekawiecki *et al.*, 2020). Nesse sentido, é possível inferir que a atuação sinérgica da P_4 , oriunda do CL, com o gene PGR tenham inviabilizado a comunicação e junção celular, etapa fundamental para a formação dos agregados celulares e manutenção de sua viabilidade, ao longo do período de cultivo. Isso justifica a menor formação de agregados celulares neste grupo experimental, quando comparado aos grupos FP e FG.

Embora não tenham sido verificadas diferenças significativas na expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR entre os grupos CL e FG (Figura 4), a produção de agregados celulares no grupo FG foi expressivamente superior ao grupo CL. É possível que a diferença encontrada na formação dos agregados celulares entre esses dois grupos não esteja associada à expressão gênica em si, mas sim ao domínio hormonal no qual esses agregados estavam submetidos.

Apesar dos genes que codificam a transcrição dos receptores de E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$) e de P_4 terem sido expressos de maneira semelhante nos grupos CL e FG, possivelmente seja a ação do hormônio preponderante na tuba uterina dos animais de cada grupo experimental, e não a expressão dos seus receptores, que definiu o efeito observado na capacidade de formação de agregados celulares. Em outras palavras, no grupo FG, sob maior domínio hormonal de E_2 do que o grupo CL, o E_2 oriundo dos folículos presentes no ovário tenha se ligado aos seus receptores e essa interação, na ausência do efeito de um domínio hormonal progesterônico, permitiu as ações mitogênicas e de adesão de célula a célula.

Por outro lado, no grupo CL, sob domínio hormonal progesterônico, a P₄ se liga a seus receptores, ocupa seus sítios de ligação e influencia as junções celulares, conforme anteriormente descrito. Além disso, a interação da P₄, oriunda do CL, com seu receptor, poderia ter suprimido as ações dos genes ESR1 e ESR2, de maneira que, ainda que esses genes tenham sido igualmente expressos nos dois grupos, o grupo CL, por ação da P₄ em seu receptor, tenha inibido as ações mitogênicas e proliferativas do ESR1.

Esses efeitos supressores da P₄ foram relatados por Kraus *et al.* (1995) que realizaram o cultivo de células endometriais de ratas para avaliarem as interações e sinalizações dos receptores ESR1 e PGR. Foi constatado que a interação da P₄ aos seus receptores (PR) desencadeia efeito supressor nas funções realizadas pelo ESR1. De acordo com os autores, isso é possível porque há interação ativa à isoforma A do PR e, uma vez ativada, essa isoforma é capaz de inativar os efeitos estrogênicos desencadeados pelo ESR1, potencializando os efeitos progesterônicos desencadeados pelo PGR nas células e tecidos.

Portanto, de diferentes maneiras, o domínio hormonal de P₄ pode justificar o motivo pelo qual no grupo CL, mesmo apresentando a mesma quantidade relativa dos genes avaliados quando comparado ao grupo FG, tenha sido observada capacidade extremamente baixa (ou nula) de produção de agregados celulares. Cabe aqui novamente destacar que, associadas às diferenças na expressão dos genes ESR1 e PGR, o grupo FG apresentou maior formação de agregados celulares, quando comparado ao grupo FP.

No presente trabalho, apesar da menor expressão do gene ESR1, que possui funções mitogênicas, no grupo FG quando comparado ao grupo FP, no grupo FG foi observada maior formação de agregados celulares em comparação ao grupo FP. Porém, apesar do E₂ ser um esteroide que atua estimulando a expressão do gene ESR1, quando as células e tecidos estão sujeitas a altas concentrações estrogênicas, a expressão de ESR1 é inibida (Tibbetts *et al.*, 1998; Shao *et al.*, 2007a; Shao *et al.*, 2007b). Portanto, visto que no grupo FG a influência estrogênica sobre as células da tuba uterina tenha sido potencialmente maior quando comparada ao grupo FP, a maior concentração de E₂ nas células do grupo FG pode ter desencadeado efeito de *downregulation* no gene ESR1. Isso justifica, pelo menos em parte, a menor expressão de ESR1 no grupo FG, quando comparado ao grupo FP.

Além disso, outra possível via de atuação que tenha resultado na menor expressão de ESR1 no grupo FG, quando comparado ao grupo FP, é a atuação da PGF_{2α} em inibir a expressão de ESR1 (Shibaya *et al.*, 2007). Outro efeito adicional da PGF_{2α} é de estimular a produção de fatores de crescimento (Zhang *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018).

Sabe-se que a tuba uterina apresenta capacidade de produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo o E_2 de importante influência estimulatória sobre a expressão de receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e, também, sobre a $\text{PGF}_{2\alpha}$ propriamente dita, no ambiente uterino e tubárico. Para biossíntese da $\text{PGF}_{2\alpha}$, ocorre a quebra dos fosfolipídeos, presentes na membrana plasmática, através da fosfolipase A2, gerando como produto dessa reação, o ácido araquidônico. O ácido araquidônico, liberado na reação anterior, sofre ação das cicloxigenases 1 ou 2 (COX1 ou COX2) formando PGG_2 , que é o produto imediato da reação. A PGG_2 sofre ação de prostaglandina endoperóxido sintetase que incorpora oxigênio à molécula, oxidando-a e formando o endoperóxido cíclico (Chan et al., 2002; Schuster et al., 2015). Este último, ao ser isomerizado, dará origem a $\text{PGF}_{2\alpha}$ (St-Arosh et al., 2004; Louis et al., 2010; Huang et al., 2015).

Essas informações nos permitem inferir que no grupo FG, sob maior domínio estrogênico, a influência da $\text{PGF}_{2\alpha}$ também era superior quando comparado ao grupo FP. Assim, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ pode ter atuado na inibição da expressão de ESR1 e/ou estimulado a maior produção de fatores de crescimento no grupo FG, quando comparado ao FP. Ainda que no grupo FG tenha ocorrido a menor expressão do ESR1, um gene que desencadeia proliferação celular por si só, quando comparado ao grupo FP, é possível que esses fatores associados à maior produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, IGF-1 e o domínio estrogênico propriamente dito, tenham ativado os mecanismos de proliferação e conexão celular descritos anteriormente, possibilitando, dessa forma, a maior formação de agregados celulares no grupo FG, quando comparado ao grupo FP.

Por fim, é interessante relatar que a expressão do ESR2 se apresentou constante durante o estudo, de maneira que a expressão desse gene não diferiu significativamente entre os grupos. Neste sentido, corroborando com nossos resultados a respeito desse gene, Ulbrich et al. (2003) também demonstraram que a expressão do ESR2 se apresenta constante ao longo do ciclo estral. Na Figura 9, encontra-se um esquema ilustrativo sintetizando os resultados da formação dos agregados celulares (Etapa 1) e da dinâmica da expressão gênica nos grupos experimentais (Etapa 2).

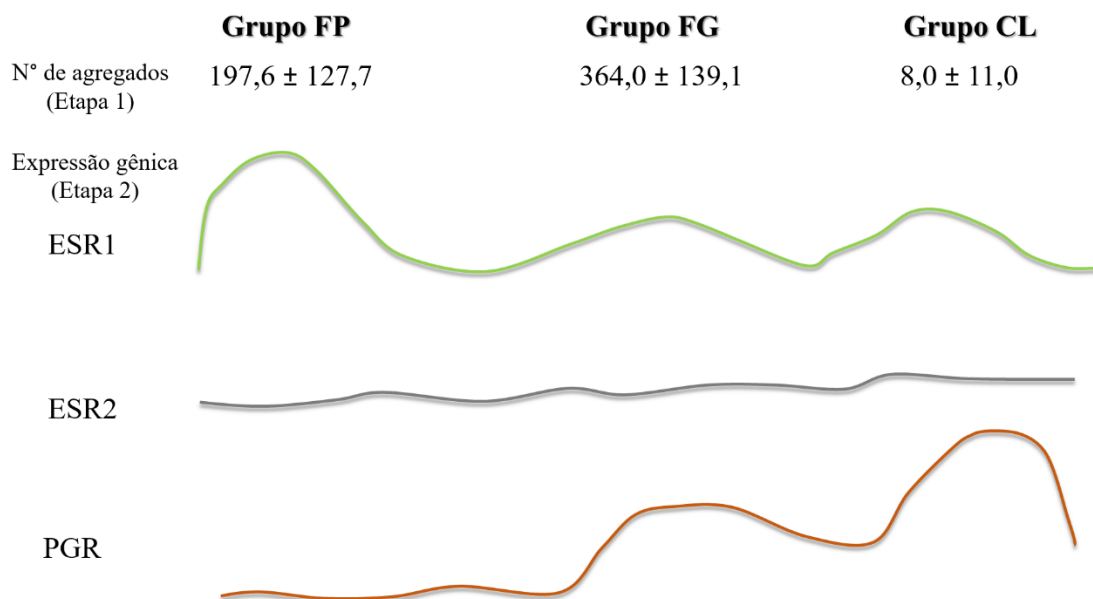


Figura 9. Esquema ilustrativo referente à produção de agregados celulares (Etapa 1) e à dinâmica da expressão dos genes ESR1, ESR2 e PGR nos grupos experimentais (Etapa 2).

7. CONCLUSÕES

Existe influência das estruturas ovarianas sobre a capacidade de formação de agregados provenientes de células do istmo. Células da tuba uterina proveniente de tratos reprodutivos cujo ovário ipsilateral apresenta CL não possui capacidade satisfatória para formação de agregados celulares, ao passo que células da tuba uterina proveniente de tratos reprodutivos cujo ovário ipsilateral contém folículos entre 8-10 mm, na ausência de CL, possui melhor capacidade de formação de agregados celulares.

A expressão dos genes ESR1 e PGR na tuba uterina variou de acordo com as estruturas ovarianas presentes no ovário, entretanto, a expressão do gene ESR2 não diferiu entre os grupos experimentais avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAFIZ, H.A.; HORWITZ, K.B. Post-translational modifications of the progesterone receptors. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, v.140, p.80–89, 2014.
- ABE, H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in citological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol. Histopathol.*, v.11, p.743-68,1996.
- ABERG, N.D.; BLOMSTRAND, F.; ABERG, M.A.I. et al. Insulin-Like Growth Factor-I Increases Astrocyte Intercellular Gap Junctional Communication and Connexin43 Expression *In Vitro*. *J. Neurosci. Res.*, v.74, n.11, p.12-22, 2003.
- AHLFEN, S.V.; SCHLUMPBERGER, M. Effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications. *Qiagen Gene Expression Newsletter*. 2010.
- ALDARMAHI, A. Establishment and characterization of female reproductive tract epithelial cell culture. *J. Microsc. Ultrastruct.*, v.5, n.2, p.105-110, 2016.
- ALWINE, J.C.; KEMP, D.J.; STARK, G.R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.74, p.5350-5354, 1977.
- APARICIO, I.M.; GARCIA-HERREROS, M.; O'SHEA, L.C. et al. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.*, v.84, p.910-921, 2011.
- AROSH, J.A.; BANU, S.K.; KIMMINS, S. et al. Effect of interferon- π on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology*, v.145, p.5280-5293, 2004.
- ARYA, M.; SHERGILL, I.S.; WILLIAMSON, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, v.5, n.2, p.209-219, 2005.
- AYEN, E.; SHAHROOZ, R.; KAZEMIE, S. Histological and histomorphometrical changes of different regions of oviduct during follicular and luteal phases of estrus cycle in adult Azarbaijan buffalo. *IJVR.*, v.13, p.42–48, 2012.
- BAI, G. T. *Establishment and Characterization of Bovine Oviductal Epithelial Cells in Culture and Study of Sperm Binding Capacity*. 2011. 94f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Aplicada) - Hedmark University of Applied Sciences, Elverum, Noruega.
- BAUMGARTEN, S.C.; CONVISSAR, S.M.; FIERRO, M.A. et al. IGF1R signaling is necessary for FSH-induced activation of AKT and differentiation of human Cumulus granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.99, p.2995-3004, 2014.
- BERISHA, B.; MICHAEL, W.; SCHAMS, D. Expression of Estrogen and Progesterone Receptors in the Bovine Ovary During Estrous Cycle and Pregnancy. *Endocrine*, v.17, n.3, p.207–214, 2002.

BINELLI, M.; GONELLA-DIAZA, A.M.; MESQUITA, F.S. et al. Sex Steroid-Mediated Control of Oviductal Function in Cattle. *Biology*, v.7, n.15, p.2-24, 2018.

BINELLI, M.; HAMPTON, J.; BUHI, W.C. et al. Persistent Dominant Follicle Alters Pattern of Oviductal Secretory Proteins from Cows at Estrus. *Biol. Reprod.*, v.61, p.127–134, 1999.

BORA, S.K. Embryo sexing methods in bovine and its application in animal breed. *J. Anim. Reprod. Biotechnol.*, v.37, n.2, p.80-86, 2022.

BRENNER, R.M. Renewal of oviduct cilia during the menstrual cycle of the rhesus monkey. *Fertil. Steril.*, v.20, n.4, 599-611, 1969.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, v.55, n.4, p.611-622, 2009.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; RODELLO, L. et al. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. *Livest. Sci.*, v. 207, p.30-37, 2017.

CELIN, L.R. *Avaliação in vitro do efeito dos espermatozoides sobre a expressão gênica em agregados de células epiteliais da tuba uterina bovina*. 2019. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

CERNY, K.L.; RIBEIRO, R.A.C.; JEOUNG, M. et al. Estrogen Receptor Alpha (ESR1)-Dependent Regulation of the Mouse Oviductal Transcriptome. *Plos One*, v.11, n.1, p.1-17, 2016.

CHAN, B.S.; ENDO, S.; KANAI, N.; SCHUSTER, V.L. Identification of lactate as a driving force for prostanoïd transport by prostaglandin transporter PGT. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v.282, p.1097-1102, 2002.

CHEN, S.; EINSPANIER, R.; SCHOEN, J. Long-term culture of primary porcine oviduct epithelial cells: Validation of a comprehensive *in vitro* model for reproductive Science. *Theriogenology*, v.80, p.862–869, 2013.

CHEN, S.; PALMA-VERA, S.E.; KEMPISTY, B. et al. *In Vitro* Mimicking of Estrous Cycle Stages: Dissecting the Impact of Estradiol and Progesterone on Oviduct Epithelium. *Endocrinology*, v.159, n.9, p3421-3432, 2018.

CICINNATI, V.R.; SHEN, Q.; SOTIROPOULOS, G.C. et al. Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer.*, v.8, p.350, 2008.

CORE TEAM R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria:Foundation for Statistical Computing; 2019. <https://www.R-project.org/>.

De PAUW, I.M.C.; VAN SOOM, A.; LAEVEN, H. et al. Sperm Binding to Epithelial Oviduct Explants in Bulls with Different Nonreturn Rates Investigated with a New *In Vitro* Model. *Biol. Reprod.*, v. 67, p.1073–1079, 2002.

DELMANN, H. D., BROWN, E. M. *Histologia veterinária*, (6.Ed). Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 1982. 397p.

DONNEZ, J.; CASANAS-ROUX, F.; CAPRASSE, J. et al. Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil. Steril.*, v.43, p.554–559, 1985.

ELLINGTON, J. E.; CARNEY, E.W.; FARRELL, P. B. et al. Bovine 1-2-cell Embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. *Biol. Reprod.*, v.43, p.97–104, 1990.

ELLINGTON, J. E.; EVENSON, D. P.; WRIGHT, R. W. et al. Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells *in vitro*. *Fertil. Steril.*, v.71 p.924–929, 1999.

ENDSLEY, M.P.; MOYLE-HEYRMAN, M.; KARTHIKEYAN, S. et al. Spontaneous Transformation of Murine Oviductal Epithelial Cells: A Model System to Investigate the Onset of Fallopian-Derived Tumors. *Front. Oncol.*, v.5, n. 154, p. 1-11 ,2015.

ERICKSON- LAWRENCE, M.F.; TURNER, T.T.; THOMAS, T.S. et al. Effect of steroid hormones on sulfated oviductal glycoprotein secretion by oviductal explants *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.40, n.6, p.1311-1319, 1989.

FAGERLIND, M.; STÅLHAMMAR, H.; OLSSON, B. et al. Expression of miRNAs in bull spermatozoa correlates with fertility rates. *Reprod. Domest. Anim.*, v.50, p.587-594, 2015.

FAZELI, A.; DUNCAN, A.E.; WATSON P.F. et al., Sperm-Oviduct Interaction: Induction of Capacitation and Preferential Binding of Uncapacitated Spermatozoa to Oviductal Epithelial Cells in Porcine Species. *Biol. Reprod.*, v.60, p.879–886, 1999.

FERRAZ, M.A.M.M.; HENNING, H.H.W.; STOUT, T.A.E. et al. Designing 3-Dimensional *In Vitro* Oviduct Culture Systems to Study Mammalian Fertilization and Embryo Production. *Ann. Biomed. Eng.*, v.45, n.7, p.1731–1744, 2017.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M.W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT PCR performance. *Mol. Aspects. Med.*, v.27, n.2, p.126-139, 2006.

FONTES, P.K.; ERENO, R.L.; PEIXOTO, A.R. et al. Can the antral follicular count modulate the gene expression of bovine oviducts in Aberdeen Angus and Nelore heifers? *Plos One.*, v.13, n.8, p.1-21, 2018.

FRASOR, J.; BARNETT, D.; DANES, J. M. et al. Response-Specific and Ligand Dose-Dependent Modulation of Estrogen Receptor (ER) α Activity by ER β in the Uterus. *Endocrinology*, v.144, n.4, p.3159–3166, 2003.

GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.*, v.81, p.23-28, 1987.

GAO, L.; GAO, R.; MAO, W. et al. PTGFR activation promotes the expression of PTGS-2 and growth factors via activation of the PKC signaling pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Anim. Reprod. Sci.*, v.199, p.30-39, 2018.

GENAZZANI, A.R.; STOMATI, M.; MORITTU, A. et al. Progesterone, progestagens and the central nervous system. *Hum. Reprod.*, v.15, p.14-27, 2000.

GHOSH, A.; SYED, S.M.; TANWAR, P.S. In vivo genetic cell lineage tracing reveals that oviductal secretory cells self-renew and give rise to ciliated cells. *Development*, v.144, p. 3031–3041, 2017.

GIBSON, U.E.M.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Genome. Res.*, v.6, n.10, p.995-1001, 1996.

GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L. et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, v.345, p.60-62, 1990.

GONELLA-DIAZA, A.M.; MESQUITA, F.S.; SILVA, K.R. et al. Sex steroids modulate morphological and functional features of the bovine oviduct. *Cell Tissue Res.*, v.370, n.2, p.319-333, 2017.

GRUND, S.; GRÜMMER, R. Direct Cell–Cell Interactions in the Endometrium and in Endometrial Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.*, v.19, n.8, p.2-22, 2018.

GUALTIERI, R.; TALEVI, R. Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium *in vitro*. *Reproduction*, v.125, p.251–258, 2003.

GUALTIERI, R.; MOLLO, V.; BRAUN, S. et al. Long-term viability and differentiation of bovine oviductal monolayers: Bidimensional versus three-dimensional culture. *Theriogenology*, v.78, p.1456–1464, 2012.

HAGAN, C.R.; LANGE, C.A. Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. *BMC Med.*, v.12, p.1-9, 2014.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal, (7.Ed). Barueri: EDITORA MANOLE, 2004. 513p.

HAZANO, K.; HANEDA, S.; KAYANO, M. et al. Local sex steroid hormone milieu in the bovine oviduct ipsilateral and contralateral to preovulatory follicle or corpus luteum during the periovulatory phase. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.74, p.1-11, 2021.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, v.10, n.4, p.413-417, 1992.

HOLLINSHEAD, F.K.; GILLAN, L.; O'BRIEN, J.K. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.15, p.351-359, 2003.

- HUANG, N.; LIU, B.; DONG, Z. et al. Prostanoid receptors EP2, EP4, and FP are regulated by estradiol in bovine oviductal smooth muscle. *Prostag. Other. Lipid. Mediat.*, v.121, p.170-175, 2015.
- HUNTER, R.H. The Fallopian Tubes Their Role in Fertility and Infertility, (1. Ed). Editora: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1988. 202p.
- HUNTER, R.H. Components of oviduct physiology in eutherian mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, v.87, p.244–255, 2012.
- HYDE, B.A.; BLACK, D.L. Synthesis and secretion of sulphated glycoproteins by rabbit oviduct explants *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, v.78, n.1, p.83-91, 1986.
- IPSA, E.; CRUZAT, V.F.; KAGIZE, J.N. et al. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Action in Reproductive Tissues. *Front. Endocrinol.*, v.10, p.1-14, 2019.
- IRELAND, J. J.; MURPHEE, R. L., COULSON, P. B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J. Dairy. Sci.*, v.63, p.155-160, 1980.
- ITO, S.; KOBAYASHI, Y.; YAMAMOTO, Y. et al. Remodeling of bovine oviductal epithelium by mitosis of secretory cells. *Cell Tissue Res.*, v.366, p.403–410, 2016.
- KERVANCIOGLU, M.E.; SARIDOGAN, E.; MARTIN, J.E. et al. A simple technique for the long-term nonpolarised and polarised culture of human fallopian tube epithelial cells. *Biol. Cell.*, v.82, p.103–107, 1994.
- KESSLER, M.; HOFFMANN, K.; BRINKMANN, V. et al. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat. Commun.*, v.6, p.1-11, 2015.
- KRAUS, W.L.; WEIS, K.E.; KATZENELLENBOGEN, B.S. Inhibitory Cross-Talk between Steroid Hormone Receptors: Differential Targeting of Estrogen Receptor in the Repression of Its Transcriptional Activity by Agonist- and Antagonist-Occupied Progesterin Receptors. *Mol. Cell. Biol.*, v.15, n.4, p.1847-1857, 1995.
- KUANG, J.; YAN, X.; GENDERS, A.J. et al. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *Plos One*, v.13, n.5, p.1-27, 2018.
- KURITA, T.; LEE, K.J.; COOKE, P.S. et al. Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor and lactoferrin by progesterone in the mouse uterus. *Biol. Reprod.*, v.62, p.831–838, 2000a.
- LAKSHMY, K.V.; MANIMEGALAI, J.; LAMBE, U. Different methods of embryo sexing: a review. *Pharma Innov.*, v.7, p.170-172, 2018.
- LAMY, J.; LIERE, P.; PIANOS, A. et al. Steroid hormones in bovine oviductal fluid during the estrous cycle. *Theriogenology*, v.86, n.6, p.1409-1420, 2016.

- LARKIN, M.J.; OSBORN, A.M.; FAIRLEY, D. A molecular toolbox for bacterial ecologists: PCR primers for functional gene analysis. *Mol. Microbiol. Ecol.*, v.1, p.281-301, 2005.
- LEFEBVRE, R.; LO, M.C.; SUAREZ, S.S. Bovine Sperm Binding to Oviductal Epithelium Involves Fucose Recognition. *Biol. Reprod.*, v.56, p.1198-1204, 1997.
- LEVANON, K.; NG, V.; PIAO, H.Y. et al. Primary ex vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. *Oncogene*, v.29, p.1103–1113, 2010.
- LOPERA-VÁSQUEZ, R.; URIBE-GARCÍA, F.; RONDÓN-BARRAGÁN, I. Effect of estrous cycle phases on gene expression in bovine oviduct epithelial cells. *Vet. World.*, v.15, n.7, p.1665 – 1675, 2022.
- LOSEL, R.; BREITER, S.; SEYFERT, M. et al. Classic and non- classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm. Metab. Res.*, v.37, p.10-14, 2005.
- LUCIANO, A.M.; LODDE, V.; FRANCIOSI, F. et al. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction*, v.140, p.663- 672, 2010.
- MELTON, D.A.; KRIEG, P.A.; REBAGLIATI, M.R. et al. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids. Res.*, v.12, p.7035-7056, 1984.
- MELO, A.N.; SANTOS JÚNIOR, E.R.; ADRIÃO, M. et al. Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.36, n.2, p.105-112, 2012.
- MIESSEN, K.; SHARBATI, S.; EINSPANIER, R. et al. Modelling the porcine oviduct epithelium: A polarized *in vitro* system suitable for long-term cultivation. *Theriogenology*, v.76, p.900–910, 2011.
- MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.*, v.392, p.49–53, 1996.
- MULAC, B.; CONNEELY, O.M. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*, v.128, p.139-146, 2004.
- MULAC B.; MULLINAX, R.A.; DEMAYO, F.J. et al. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, v.289, p.1751–1754, 2000.
- MURPHY, S. V.; ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.*, v.32, p.773–785, 2014.
- NANCARROW, C. D.; HILL, J.L. Co-culture, oviduct secretion and the function of oviduct-specific glycoproteins. *Cell. Biol. Int.*, v.18, p.1105–1114, 1994.
- NAVARRO, E.; SERRANO-HERAS, G.; CASTANO, M.J. et al. Real-time PCR detection chemistry. *Clin. Chim. Acta.*, v.439, p.231-250, 2015.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.*, v.1, n.3, p.1559-1582, 2006.

O'DRISCOLL, L.; DALY, C.; SALEH, M. et al. The use of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate specific gene expression in multidrug-resistant cells. *Cytotechnology*, v.12, p.289-314, 1993.

ÖZBEK, M.; HITIT, M.; KAYA, A. et al. Sperm Functional Genome Associated With Bull Fertility. *Front. Vet. Sci.*, v.8, p.1-17, 2022.

PAIK, D.Y.; JANZEN, D.M.; SCHAFENACKER, A.M. et al. Stem-Like Epithelial Cells are Concentrated in the Distal End of the Fallopian Tube: A Site for Injury and Serous Cancer Initiation. *Stem Cells.*, v.30, p.487-2497, 2012.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E.G.; STELZER, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v.8, p.839-845, 2007.

PARCZYK, K.; MADJNO, R.; MICHNA, H. et al. Progesterone receptor repression by estrogens in rat uterine epithelial cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, v.63, p.309-316, 1997.

PELLETIER, G.; LABRIE, C.; LABRIE, F. Localization of oestrogen receptor oestrogen receptor and androgen receptor in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.*, v.165, p.359-370, 2000.

PELUSO, J.J.; PAPPALARDO, A.; LOSEL, R.; WEHLING, M. Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology*, v.147, p.3133-3140, 2006.

PETRUNKINA, A. M.; GEHLHAAR, R.; DROMMER, W. et al. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium *in vitro*. *Reproduction*, v.121, p.889-896, 2001.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids. Res.*, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

PFAFFL, M. W.; GRAHAM, W. H.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids. Res.*, v.30, n.9, p.1-10, 2002.

RAJAGOPAL, M.; TOLLNER, T.L.; FINKBEINER, W.E. et al. Differentiated structure and function of primary cultures of monkey oviductal epithelium *in vitro*. *Cell Dev. Biol. Anim.*, v.42, p.248-254, 2006.

REKAWIECKI, R.; KOWALIK, M.K.; KOTWICA, J. The expression of progesterone receptor coregulators mRNA and protein in corpus luteum and endometrium of cows during the estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.183, p.102-109, 2017.

REKAWIECKI, R.; DOBRZYN, K.; KOTWICA, J.; KOWALIK, M.K. Progesterone Receptor Coregulators as Factors Supporting the Function of the Corpus Luteum in Cows. *Animals*, v.11, p.1-12, 2020.

RIO, D.C.; ARES, M. JR.; HANNON, G.J. et al. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.*, v.6, 2010.

RISEK, B.; KLIER, F.G.; PHILLIPS, A. et al. Gap junction regulation in the uterus and ovaries of immature rats by estrogen and progesterone. *J. Cell Sci.*, v.108, p.1017-1032, 1995.

ROTTMAYER, R.; ULBRICH, S.E.; KOLLE, S. et al. A bovine oviduct epithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo–maternal interactions: morphological and functional characterization. *Reproduction*, v.132, p.637–648, 2006.

ROWLINSON, S.W.; YOSHIKATO, H.; BARCLAY, J.L. et al. An agonist-induced conformational change in the growth hormone receptor determines the choice of signalling pathway. *Nat. Cell. Biol.*, v.10, p.740-747, 2008.

SAINT-DIZIER, M.; MAHÉ, C.; REYNAUD, K. et al. Sperm interactions with the female reproductive tract: A key for successful fertilization in mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.516, n.20, p.30256- 302562, 2012.

SCHWABER, J.; ANDERSEN, S.; NIELSEN, L. Shedding light: The importance of reverse transcription efficiency standards in data interpretation. *Biomol. Detect. Quantif.*, v.17, p.1-7, 2019.

SCHUSTER, V.L.; CHI, Y.; LU, R. The Prostaglandin Transporter: Eicosanoid Reuptake, Control of Signaling, and Development of

High-Affinity Inhibitors as Drug Candidates. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, v.126, p.248-257;2015.

SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition, (2nd. Ed.). Washington: CURRENT CONCEPTIONS INC., 2003. 368p.

SHAO, R.; EGECIOGLU, E.; WEIJDEGARD, B. et al. Dynamic regulation of estrogen receptor- α isoform expression in the mouse fallopian tube: mechanistic insight into estrogen-dependent production and secretion of insulin-like growth factors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.293, n.5, p.1430-1442, 2007.

SHAO, R.; LJUNGSTROM, K.; WEIJDEGARD, B. et al. Estrogen-induced upregulation of AR expression and enhancement of AR nuclear translocation in mouse fallopian tubes in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.292, p.604–614, 2007a.

SHAO, R.; WEIJDEGARD, B.; FERNANDEZ-RODRIGUEZ, J. et al. Ciliated epithelial-specific and regional-specific expression and regulation of the estrogen receptor-beta2 in the fallopian tubes of immature rats: a possible mechanism for estrogen mediated transport process in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v.293, p.147–158, 2007b.

SHIBAYA, M.; MATSUDA, A.; HOJO, T. et al. Expressions of Estrogen Receptors in Bovine Corpus Luteum: Cyclic Changes and Effects os Prostaglandin F2 α and Cytokines. *J. Reprod. Dev.*, v.53, n.5, p.1059- 1068, 2007c.

SIEBER, M.W.; RECKNAGEL, P.; GLASER, F. et al. Substantial performance discrepancies among commercially available kits for reverse transcription quantitative polymerase chain reaction: A systematic comparative investigator driven approach. *Anal. Biochem.*, v.401, p.303-311, 2010.

SILVA, M.A. *Strategies to predict and minimize differences in field fertility in bulls*. 2021. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal e Pastagens) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SIMPSON, E.; SANTEN, R.J. Celebrating 75 years of oestradiol. *J. Mol. Endocrinol.*, v.55, p.1-20, 2015.

SLAYDEN, O.D.; LUO, F.; BISHOP, C.V. Physiological Action of Progesterone in the Nonhuman Primate Oviduct. *Cells*, v.11, n.9, p.1-16, 2022.

SMITH, J.C.; OSBORN, A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.67, n.1, p.6-20, 2009.

STÅHLBERG, A.; THOMSEN, C.; RUFF, D. et al. Quantitative PCR Analysis of DNA, RNAs, and Proteins in the Same Single Cell. *Clin. Chem.*, v.58, p.1682-1691, 2012.

ST-LOUIS, I.; SINGH, M.; BRASSEUR, K. et al. Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.8, p.1-10, 2010.

SUAREZ, S.S.; REVAH, I.; LO, M. et al. Bull Sperm Binding to Oviductal Epithelium Is Mediated by a Ca²⁺-Dependent Lectin on Sperm That Recognizes Lewis-a Trisaccharide. *Biol. Reprod.*, v.59, p.39-44, 1998.

SUAREZ, S. S.; WU, M. Microfluidic devices for the study of sperm migration. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 23, n. 4, p. 227-234, 2016.

SUN, G.W.; KOBAYASHI, H.; SUZUKI, M. et al. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I synergistically induce up-regulation of cartilage link protein (Crtl1) via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/Akt in rat granulosa cells. *Endocrinology*, v.144, p.793-801, 2003.

TIBBETTS, T.A.; MENDOZA-MENESES, M.; O'MALLEY, B.W.; CONNEELY, O, M. Mutual and Intercompartmental Regulation of Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Expression in the Mouse Uterus. *Biol. Reprod.*, v.59, p.1143–1152, 1998.

ULBRICH, S.E.; EINSPANIER, K.R. Expression and localization of estrogen receptor, estrogen receptor and progesterone receptor in the bovine oviduct in vivo and *in vitro*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.84, p.279-289, 2003.

ULBRICH, S.E.; ZITTA, K.; HIENDLEDER, S.; et al. *In vitro* systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. *Theriogenology*, v. 73, p. 802–816, 2010.

VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Bio. Techniques.*, v.44, p.619-626, 2008.

VEGETO, E.; SHAHBAZ, M.M.; WEN, D.X. et al. Human progesterone receptor A form is a cell-and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.*, v.7, n.10, p.1244-1255, 1993.

VELHO, A.; WANG, H.; KOENIG, L. et al. Expression dynamics of Integrin Subunit Beta 5 in bovine gametes and embryos imply functions in male fertility and early embryonic development. *Andrologia*, v.51, n.7, p.1-11, 2019.

WETENDORF, M.; DEMAYO, F.J. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.357, p.108-118, 2012.

WROBEL, K.-H.; KUJAT, R.; FEHLE, G. The bovine tubo uterine junction: general organization and surface morphology. *Cell Tissue Res.*, v. 271, n. 2, p. 227-239, 1993.

WU, W.X.; OWINY, J.; ZHANG, Q. et al. Regulation of the Estrogen Receptor and its Messenger Ribonucleic Acid in the Ovariectomized Sheep Myometrium and Endometrium: The Role of Estradiol and Progesterone. *Biol. Reprod.*, v.55, p.762-768, 1996.

WU, W.; SHI, S.Q.; HUANG, H.J. et al. Changes in PGRMC1, a potential progesterone receptor, in human myometrium during pregnancy and labour at term and preterm. *Mol. Hum. Reprod.*, v.17, p.233-242, 2011.

XIAO, C.W.; GOFF, A.K. Hormonal regulation of oestrogen and progesterone receptors in cultured bovine endometrial cells. *J. Reprod. Fertil.*, v.115, n.1, p.101-109, 1999.

YANIZ, J. L.; GATIUS-LOPEZ, F.; SANTOLARIA, P. et al. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *Anat. Rec.*, v. 260, n. 3, p. 268-278, 2000.

YIN, J.L.; SHACKEL, N.A.; ZEKRY, A. et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol. Cell Biol.*, v.79, n.3, p.213-221, 2001.

ZHANG, S.; LIU, B.; GAO, L. et al. Prostaglandin F2a-PTGFR signaling activation, growth factor expression and cell proliferation in bovine endometrial explants. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.29, p.2195-2205, 2017.

ZHAO, J.; TAVERNE, M.A.; VAN DER WEIJDEN, G.C. et al. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v.58, p.287-296, 2001.

ZINN, K.; DIMAIO, D.; MANIATIS, T. Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene. *Cell*, v.34, p.865-879, 1983.

ZUCHA, D.; ANDROVIC, P.; KUBISTA, M. et al. Performance Comparison of Reverse Transcriptases for Single-Cell Studies. *Clin. Chem.*, v.66, p.217-228, 2020.

ZUCHA, D.; KUBISTA, M.; VALIHRACH, L. Tutorial: Guidelines for Single-Cell RT-qPCR. *Cells*, v.10, p.2-16, 2021.

