

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

PROTEINAS DO FLUIDO UTERINO EQUINO NO QUINTO DIA PÓS-OVULAÇÃO

DEISY JOHANA LANCHEROS BUITRAGO

**PORTO ALEGRE
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

PROTEINAS DO FLUIDO UTERINO EQUINO NO QUINTO DIA PÓS-OVULAÇÃO

AUTOR: DEISY JOHANA LANCHEROS BUITRAGO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos

ORIENTADOR: RODRIGO COSTA MATTOS

**PORTO ALEGRE
2019**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Lancheros Buitrago, Deisy Johana
Proteínas do fluido uterino equino no quinto dia
pós- ovulação / Deisy Johana Lancheros Buitrago. --
2019.
63 f.
Orientador: Rodrigo Costa Mattos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto
Alegre, BR-RS, 2019.

1. égua. 2. ovulação. 3. proteômica. 4.
reconhecimento materno. I. Costa Mattos, Rodrigo,
orient. II. Título.

DEISY JOHANA LANCHEROS BUITRAGO

PROTEINAS DO FLUIDO UTERINO EQUINO NO QUINTO DIA PÓS-OVULAÇÃO

APROVADO POR:

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim
Membro da Comissão

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho
Membro da Comissão

Prof. Dr. Henrique Boll, de Araújo Bastos
Membro da Comissão

Dedicatória: aos meus cachorros Toby e Tony (R.I.P)

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente por ter permitido esta conquista em minha vida.

À meus pais, Blanca e Reinel, por me apoiarem em todos os momentos, e apesar da distância que nos separava, me dando forças para continuar.

A meus irmãos, Ivan, Alfonso e Sergio, que sempre se orgulharam de mim e me mostraram seu carinho, apoio e proteção quando precisei.

A meu sobrinho Juan José, meu maior tesouro desta vida, por compartilhar instantes mágicos na distância e iniciar as contagens regressivas para os nossos reencontros.

A Elsita Wolff porque me acolheu com todo o afeto, como se fosse uma filha e fez sua família a minha também, fazendo com que me sentisse sempre bem.

Ao Professor Dr. Rodrigo Costa Mattos, porque sei que sem ele, eu não teria chegado ao Brasil. Agradeço pela confiança que depositou em mim, por todo apoio e conhecimento durante o mestrado.

À Paula Rodriguez, por ser uma amiga e tanto para mim, de tantas diferentes e significativas formas. Obrigada por compartilhar conhecimentos na área da proteômica e permanecer até hoje ao meu lado me apoiando.

À Joana Gregory e ao Henrique Bastos pelos ensinamentos no laboratório, parceria e amizade.

Aos meus colegas, Nicolas Cazales, Cesar Camacho e Jorge Caballeros por sua ajuda na coleta das amostras.

À Anita Pimentel por ter ajudado nas correções do meu trabalho, pelo apoio incondicional, carinho e dedicação.

Às minhas amigas Luzia Hallal e Carla Coelho que contribuíram de forma muito especial com seus conselhos, suas loucuras, suas brincadeiras e sua companhia, para que meus dias sempre tivessem alegria e brilho. Sem elas minha vida no Brasil não teria sido igual.

À Indi e Anna Bettina pela amizade, pelas palavras sinceras e pelos sorrisos. Sou grata por tudo o que vivemos juntas.

À Daiane Mentz, Bruna Willhelm, Luis Henrique, Felipe Ongarrato e German Holguin, pela amizade, risadas, brincadeiras, conversas, caronas e todas as lembranças maravilhosas que carregarei para o resto de minha vida.

À Neila Wolff e Nelson Vera por ter ajudado no planejamento da viagem para o Brasil.

Aos meus amigos da Colômbia Jully, Monica, Carol, Amanda, Javier e Oscar, que sempre estiveram presentes com todo seu carinho e apoio constante.

Aos meus colegas do Reprolab pela hospitalidade e carinho que recebi. Obrigada pela receptividade.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Aos demais, que direta ou indiretamente, de alguma forma contribuíram para que eu chegasse com sucesso ao fim desta etapa.

A todos, o meu sincero agradecimento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática das interações entre o concepto e o útero proposto no período do reconhecimento materno da prenhez nos dias 12/13 pós ovulação (AURICH; BUDIK, 2015)	22
Figura 2	Inibidores da síntese de prostaglandinas no fluido uterino de éguas prenhes. Via de eicosanoides, adaptada da Wikipédia. Proteínas encontradas para serem reguladas no fluido uterino de éguas prenhes são marcadas em vermelho(SMITS et al., 2018)	27
Figura 3	Venn diagrams showing the distribution of total reproducible spots identified from 2-D gels of each group. Into brackets is the total number of significant protein spots. Created using Venny 2.1 (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/ accessed December 7th, 2018)	38
Figura 4	Comparison of proteome by two-dimensional gel electrophoresis on Cyclic (A) and inseminated (B) uterin fluid equine at day 5 post ovulation. Numbers in the figure correspond to the Spot ID shown in Table 1.....	38
Figura 5	Mean (\pm SD) relative volume (%) of proteins with higher abundance in the uterine fluid from inseminated mares (A - Ceruloplasmin – CP) and in higher abundance in cyclic mares (B – Serotransferrin – TF; C – Albumin – ALB) on days 5 after ovulation. Different letters (a,b) represent significant differences ($P < 0.05$) between groups.....	41
Figura 6	Gene Ontology analysis of differentially regulated endometrial proteins. Proteins organized in pie charts according to the biological process, molecular functions and cellular component in which they are involved, using UniProt Consortium database.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteins identified in uterine fluid collected on day 5 post ovulation by MALDI TOF/TOF algorithm and SCAFFOLD software of cyclic and inseminated mares, 5 days after ovulation. Spot numbers refer to those shown in the 2-D gels of Fig. 4	39
Tabela 2	Proteins identified in uterine fluid collected on day 5 post ovulation by MALDI TOF/TOF algorithm and SCAFFOLD software of cyclic and inseminated mares, 5 days after ovulation. Spot numbers refer to those shown in the 2-D gels of Fig. 4.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
2.1 Reconhecimento materno da prenhez	16
2.2.Síntese de prostaglandina F₂α durante a prenhez inicial	17
2.3. Ação da oxitocina e seu receptor no período do RMP	20
2.4. Regulação de hormônios e receptores esteroides no útero	23
2.5 Ambiente uterino no início da prenhez equina	25
2.6. Desenvolvimento embrionário inicial na tuba uterina	27
3 ARTIGO	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A- Classificação funcional das proteínas identificadas pelo Gene Ontology	57
APÊNDICE B - Representações esquemáticas das vias metabólicas pelo Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes –KEGG	58

PROTEINAS DO FLUIDO UTERINO EQUINO NO QUINTO DIA PÓS-OVULAÇÃO

RESUMO

A caracterização do proteoma uterino antes da entrada do embrião no útero, é essencial para conhecer os fatores bioquímicos envolvidos nos eventos fisiológicos da prenhez. O objetivo do estudo foi comparar o perfil proteico do líquido uterino coletado no dia 5 pós-ovulação de éguas cíclicas e inseminadas. Amostras de secreção endometrial foram recuperadas durante o quinto dia pós-ovulação, ao longo de 2 ciclos. O primeiro ciclo constituiu o grupo “cíclico” (n= 10), e no seguinte ciclo, as mesmas éguas foram inseminadas e constituíram o grupo “inseminadas” (n= 10). Todas as amostras foram submetidas à eletroforese bi-dimensional (2D SDS-PAGE). Um total de 107 spots foram visualizados por 2D SDS-PAGE. Três spots com diferença na abundância entre as éguas inseminadas e cíclicas e com presença pelo menos em 80% em um dos grupos foram selecionados e identificados. Os spots selecionados foram excisados, digeridos por tripsina e analisados por matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) espectrometria de massa (MS) para identificação proteica. Três proteínas foram identificadas, ceruloplasmina (CP) serotransferrin (ST) e albumina (ALB). As proteínas identificadas neste estudo foram relacionadas com a tolerância imunológica e com o metabolismo do ferro sugerindo que mudanças no perfil proteico durante o dia 5 após à ovulação são provavelmente um mecanismo de sinalização do potencial embrião equino para o sistema imunológico materno para o seu reconhecimento imunológico. Provavelmente, mudanças na abundância da CP, ALB e TF representam um mecanismo de preparação endometrial para a fixação e desenvolvimento de um potencial embrião equino.

Palavras- chave: égua, ovulação, proteômica, reconhecimento materno

EQUINE UTERINE FLUID PROTEINS ON FIFTH DAY AFTER OVULATION

ABSTRACT

Characterization of the uterine proteome before the entry of the conceptus to the uterus is essential to know the factors involved in the physiological events of gestation. The aim of the study was to compare proteomic profile of uterine fluid collected on day 5 post ovulation of cyclic and inseminated mares. Samples of endometrial secretion were recovered over 2 cycles during the fifth day post ovulation. The first cycle constituted the Cyclic group (n = 10) and in the following cycle, the same mares were inseminated and considered as the Inseminated group (n = 10). All the samples were subjected to two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE). A total of 107 spots were visualized by 2D-PAGE. Three spots with differences in abundance between the inseminated and cyclic mares and with presence in at least 80% in one of the groups were selected and identified. The selected spots were extracted, digested by trypsin and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometry (MS) for protein identification. Three proteins were identified: ceruloplasmin (CP) serotransferrin (TF) and albumin (ALB). The identified proteins in this study were related to iron metabolism and immunological tolerance suggesting that changes in their abundance during the 5 days after ovulation are probably a signaling mechanism of the potential equine conceptus to the maternal immune system for its immunological recognition. Probably changes in abundance of CP, ALB and TF represent a mechanism of endometrial preparation for the maternal recognition, attachment and development of a potential equine embryo.

Keywords: mare, ovulation, proteomic, maternal recognition

1 INTRODUÇÃO

O sucesso da prenhez depende da acertada comunicação materno-embrionária, influenciada diretamente e indiretamente por fatores parácrinos e autócrinos que controlam o microambiente uterino (RAHEEM, 2017). Como o principal determinante de um ambiente adequado é o fornecimento contínuo de progesterona (STOUT, 2016), o reconhecimento materno da prenhez (RMP) é geralmente usado para se referir, especificamente, aos eventos iniciados pelo conceito em desenvolvimento que prolongam o tempo de vida e a atividade secretora do corpo lúteo primário para garantir um ambiente favorável ao crescimento embrionário para o estabelecimento e manutenção da prenhez (SHORT, 1969).

Uma característica do RMP na égua é a redução da secreção endometrial de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) na presença de um conceito durante o tempo esperado de luteólise. A liberação de PGF_{2α} no endométrio é atenuada, como consequência da redução da expressão das principais enzimas envolvidas na produção de prostaglandinas (KLEIN, 2015a). Durante a prenhez inicial a resposta à ocitocina é alterada, reduzindo a expressão do receptor de ocitocina (OXTR) que junto com a endoperóxido-prostaglandina sintase 2 (PTGS2), são componentes centrais da via luteolítica e sua supressão é considerada crítica para a manutenção luteal durante o início da prenhez equina (DE RUIJTER-VILLANI; VAN TOL; STOUT, 2015).

Ao contrário de muitas outras espécies domésticas, a prenhez equina apresenta características próprias e interações interessantes. O conceito equino passa ao lúmen uterino entre o dia 5-6 após a ovulação, com prévia secreção de Prostaglandina E₂. Além disso, o conceito equino é coberto por uma cápsula acelular proteica após a entrada do conceito no útero, e é altamente móvel ao longo do lúmen uterino a partir do dia 9 pós-ovulação, sendo um componente primordial no RMP na égua (GINTHER, 1985).

Embora a compreensão do diálogo contínuo do endométrio materno e do embrião em desenvolvimento apresente enormes avanços, o estabelecimento e manutenção da prenhez em equinos é somente parcialmente compreendido (KLEIN; TROEDSSON, 2011). Uma série de pesquisas no campo da transcriptômica tem analisado a expressão gênica no

endométrio de éguas cíclicas e prenhes, para esclarecer os mecanismos moleculares responsáveis pelo estabelecimento da prenhez no equino e a natureza do sinal embrionário para luteostase em éguas (BAUERSACHS; WOLF, 2012; AURICH; BUDIK, 2015). As mudanças no perfil proteico do fluido luminal uterino, em resposta à presença de um concepto, recentemente têm sido estudadas. Em relação a sinalização do RMP, Bastos et al. (2019) e Smith et al. (2018), identificaram proteínas presentes no fluido uterino de éguas cíclicas e prenhes no início do desenvolvimento embrionário, fornecendo assim, uma visão geral de proteínas potencialmente envolvidas na interação materno-embrionária no cavalo.

A diferença observada nos padrões proteicos das éguas prenhes e cíclicas no dia 7 após da ovulação (BASTOS et al., 2019) levantou-se a hipótese de prováveis alterações proteicas no ambiente uterino antes do sétimo dia pós-ovulação e em torno do momento relacionado com a produção pelo próprio embrião de prostaglandina E2, para estimular o transporte para o útero (WEBER et al., 1991a, 1991b, 1992). A identificação das proteínas secretadas pelo útero no 5 dia após ovulação na égua poderiam proporcionar esclarecimentos da participação bioquímica nos eventos fisiológicos do desenvolvimento embrionário equino e sua possível influência no RMP na fêmea equina. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar o perfil proteômico do líquido uterino coletado no dia 5 pós-ovulação de éguas cíclicas e inseminadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. 1 Reconhecimento materno da prenhez

O termo "reconhecimento materno da prenhez" é comumente utilizado para descrever a interação materno-embrionária no período inicial de prenhez que interrompe a luteólise e garante um suporte contínuo de progesterona (P4) para o desenvolvimento embrionário (KLEIN, 2016). Em fêmeas mamíferas cíclicas que normalmente sofrem luteólise no final do ciclo, se a prenhez ocorre, o corpo lúteo (CL) é mantido e continua a produzir P4, indispensável para o estabelecimento e manutenção da prenhez (GINTHER, 2009; MERKL et al., 2010).

O prolongamento do tempo de vida do CL, a fim de garantir a secreção de P4, requer sinais produzidos pelo próprio concepto (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999; AURICH; BUDIK, 2015) e o diálogo usado pelo concepto para sinalização de sua presença varia entre as espécies domésticas. Os mecanismos de comunicação materno-embrionários são melhor compreendidos em ruminantes e outros ungulados, como o suíno (KLEIN, 2015a), enquanto os equinos parecem ser distintos de outros mamíferos e o sinal de RMP derivado do concepto ainda não foi identificado (KLEIN; TROEDSSON, 2011).

Em bovinos, uma glicoproteína denominada Interferon-tau (IFN- τ), secretada pelo concepto no ambiente uterino, age de forma parácrina inibindo a expressão dos receptores de estrógenos (ESR1) e de ocitocina (OXTR) no endométrio, evitando a liberação de pulsos luteolíticos de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), hormônio responsável pelo início da luteólise (GODKIN et al., 1982; GODKIN; BAZER; ROBERTS, 1984; GRAY et al., 2006). A capacidade do concepto suíno para sintetizar e liberar grandes quantidades de estrógenos, entre os dias 14 e 18 da prenhez fornece evidência de um envolvimento do estrógeno no RMP na fêmea suína. Os estrógenos derivados do concepto suíno inibem o processo luteolítico através da reorientação da liberação de prostaglandina endometrial, para o lúmen uterino em vez de ir para a vascularização uterina (GEISERT et al., 1990).

Considerando que o IFN- τ é o sinal de reconhecimento materno em ruminantes, o Interferon delta, EqIFN-delta 1 e EqIFN-delta 2 foram clonados no cavalo para avaliar a expressão pelo concepto equino entre os dias 16 e 22 da prenhez. Em comparação com o concepto bovino, os conceptos equinos expressaram interferons IFN-delta 1 e 2 em níveis baixos (COCHET; VAIMAN; LEFÈVRE, 2009), no entanto, nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, as quantidades insignificantes expressadas de RNAm do IFN-delta provavelmente não influenciam o RMP (BUDIK; LUSSY; AURICH, 2010), Dado que, tal como nos suínos, o concepto equino sintetiza grandes quantidades de estrógeno durante o período crítico do RMP (KLEIN, 2015a) os estrógenos sintetizados pelo blastocisto expandido equino foram explorados na busca pelo sinal de RPM; no entanto, com resultados contraditórios (KLEIN; TROEDSSON, 2011)

Os efeitos observados na administração exógena de estrógeno em éguas no diestro variaram desde a luteostase prevista até uma luteólise acelerada em comparação com uma rápida prolongação da fase lútea em suínos. Apesar dos resultados inconclusivos dos experimentos, tentando provar que os estrógenos derivados de embriões equinos são responsáveis pela extensão da função do CL, a produção prolongada de estrógenos além do tempo do RMP, têm importantes efeitos intrauterinos locais na atividade miometrial e na atividade secretora glandular endometrial, os quais são essenciais para o desenvolvimento do concepto equino (STOUT; ALLEN, 2001; KLEIN, 2015a).

2.2. Síntese de prostaglandina F₂ α durante a prenhez inicial

Embora a via exata de sinalização de RMP na égua seja desconhecida (DE RUIJTER-VILLANI; STOUT, 2015), em fêmeas equinas como em outras espécies, o processo luteolítico completo requer a secreção de múltiplos pulsos de PGF₂ α pelo útero (GINTHER et al., 2008). A liberação endometrial de PGF₂ α em resposta à ocitocina (OXT) é o sinal inicial que desencadeia a luteólise em animais, e a PGF₂ α no ovário contribui para a ação luteolítica em primatas, incluindo os humanos (NAGLE et al., 2005). Tal como em

ruminantes, a presença do concepto no útero desacopla o feedback OXT-PGF2 α responsável de gerar os pulsos luteolíticos de PGF2 α (DE RUIJTER-VILLANI; STOUT, 2015).

Em éguas cíclicas, a liberação de PGF2 α do endométrio e indução da luteólise, sucede pela liberação de OXT da hipófise posterior em concomitância com um aumento no endométrio do número de OXTR no diestro tardio (CICCARELLI et al., 2017). A luteólise, definida como o período da regressão do corpo lúteo caracterizado por um declínio da P4 até <1 ng/ml (GINTHER, O.J; HANNAN, M.A; BEG, M.A., 2011), ocorre em média no dia 14 após a ovulação (GINTHER; BEG, 2012a) em associação com um pequeno pulso do metabolito da prostaglandina (PG) F2 (PGFM) entre o final da pré-luteólise e o começo da luteólise em sincronia com o aumento e diminuição inicial da OXT (GINTHER; BEG, 2012b). A estimulação do OXTR gera uma cascata de eventos que terminam por ativar a fosfolipase-A2 (PLA2), enzima chave na biossíntese da PGF2 α (ABABNEH; ABABNEH; SHIDAIFAT, 2011), aparentemente importante durante o processo luteolítico e no momento do RMP (OZEL et al., 2014).

Inicialmente, durante a síntese de prostaglandina, o ácido araquidônico (AA) é liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da ação da PLA2 (KLEIN, 2015a). A atividade da PLA2 no endométrio equino incrementa durante o diestro tardio (14 dias pós-ovulação) enquanto decresce na presença de um concepto no dia 14 de prenhez (ABABNEH; TROEDSSON, 2012). O aumento da atividade da PLA2 coincide com o período do ciclo estral onde o endométrio tem uma capacidade aumentada para secretar prostaglandinas e a síntese de PGF2 α parece ser regulada, em parte, pela atividade endometrial da PLA2. A expressão endometrial de PLA2 citosólica (isoforma da PLA2), atenua-se em éguas prenhes, embora as concentrações de P4 sejam altas no dia 14 e baixas no dia 18 da prenhez. Entretanto, durante o dia 22 após a ovulação, existe um incremento da expressão de PLA2 que pode explicar o reinício da secreção de PGF2 α nessa fase da prenhez (OZEL et al, 2014).

A regulação hormonal parece ser um inibidor da expressão de cPLA2 (PLA2 citosólica) no endométrio equino (ABABNEH; ABABNEH; SHIDAIFAT, 2011). Um incremento da expressão cPLA2 no diestro tardio com baixas

concentrações de P4 coincide com a secreção e início da luteólise, portanto, a cPLA2 pode moderar a secreção endometrial de PGF2 α . A expressão moderada da cPLA2 no dia 15 de prenhez concomitante com as baixas concentrações circulantes de P4, pode ser suficiente para iniciar a cascata da secreção de PGF2 α e não tem um papel direto no RMP.

Logo após a liberação do ácido araquidônico dos fosfolipídios da membrana, ele é catalisado em endoperóxido prostaglandina H2 (PGH2) pela ação enzimática das prostaglandinas endoperóxido sintetase 1 e 2 (PTGS1 e PTGS2, respectivamente) (BOERBOOM et al., 2004). A avaliação dos genes envolvidos na ação das prostaglandinas no endométrio equino durante o ciclo estral e na prenhez inicial, demonstrou uma expressão endometrial maior de PTGS2 em éguas não prenhes do que nas éguas prenhes, durante o tempo esperado da luteólise, (ATLI et al., 2010).

Mediante cultivos de implantes endometriais comprovou-se que as secreções do conceito diminuem a expressão do PTGS2 e reduzem a quantidade de PGF2 α liberada pelos implantes do endométrio, indicando que a expressão alterada de PTGS2 é um mecanismo central do RMP em éguas (EALY et al., 2010). Coincidindo com a capacidade do endométrio de secretar PGF2 α durante a terceira semana de prenhez, a regulação positiva da expressão de PTGS1 em éguas prenhes, entre os dias 18 e 22, em comparação com os dias 14 e 15 da prenhez, sugere uma segregação da enzima no processo luteolítico porém sem desconsiderar sua possível influência durante a prenhez inicial, considerando que as expressões de prostaglandina F sintase (PTGFS) e prostaglandina E sintase (PTGES) são também supra reguladas enquanto a expressão de PTGS2 é suprimida (ATLI et al., 2010).

PTGFS e PTGES são enzimas que catalisam a conversão de PGH2 em PGF2 α e PGE2, respectivamente (ATLI et al., 2010). A expressão de PTGFS e PTEGS não diferiu entre éguas cíclicas e prenhes no dia 15 após a ovulação, (ATLI et al., 2010; BOERBOOM et al., 2004), enquanto que a prenhez inicial alterou a expressão de RNAm do PTGFS endometrial no dia 14 após a ovulação com maior expressão nas éguas cíclicas em relação as éguas prenhes. Os níveis de expressão de PTGFS e PTGES em comparação com o dia da ovulação, permaneceram estáveis no dia 18 e 22 da prenhez, enquanto

o nível de expressão do receptor de prostaglandina (PTGFR) permaneceu diminuído nos dias 14 e 15 da prenhez em relação as cíclicas. Esses resultados sugerem que há uma cadeia orquestrada de eventos que regula a biossíntese e ação da prostaglandina, a favor da prenhez no endométrio equino (ATLI et al., 2010).

2.3. Ação da oxitocina e seu receptor no período do RMP

Os fatores endócrinos que regulam a secreção pulsátil de PGF₂ α na égua são apenas parcialmente compreendidos, não obstante, sabe-se que a OXT desempenha um papel central na liberação de PGF₂ α pelo endométrio na luteólise (KLEIN; TROEDSSON, 2011; KLEIN, 2015a). O aumento da secreção uterina de PGF₂ α , verificada pelas concentrações periféricas de PGFM, o principal metabolito da PGF₂ α , pode ser o gatilho da secreção de OXT da neuro-hipófise durante o início da luteólise equina (VANDERWALL et al., 1998). A secreção de OXT hipofisária, através da união a seu receptor no endométrio, estimula a liberação de PGF₂ α endometrial estabelecendo assim uma retroalimentação positiva (KLEIN; TROEDSSON, 2011).

Evidências indiretas do envolvimento da OXT na regulação da luteólise procedem da observação à administração sistêmica de OXT durante o ciclo estral e a prenhez inicial equina. Em éguas cíclicas, a OXT exógena provocou um aumento nas concentrações circulantes de PGFM entre os dias 13 e 16 após a ovulação, enquanto éguas prenhes não mostraram variações nas concentrações circulantes de PGFM em resposta à OXT exógena no tempo previsto da luteólise (GOFF; PONTBRIAND; SIROIS, 1987) Em consonância com à resposta diferencial à OXT dependente do estado reprodutivo, as concentrações do OXTR diferiram em éguas prenhes e não prenhes no momento da luteólise. Após a estimulação de liberação de OXT por biópsia endometrial, a expressão do OXTR em éguas prenhes foram significativamente reduzidas em comparação com éguas não prenhes no dia 14 do ciclo estral (SHARP et al., 1997; STARBUCK et al., 1998)

Entretanto, diferentes estudos demonstraram que a administração de altas doses de OXT no meio do diestro prolongaram o tempo de vida do CL equino (VANDERWALL; PARKINSON; RIGAS, 2016). A administração

repetida de OXT nos dias 7 a 14 após a ovulação, manteve a concentração de $P4 > 1 \text{ ng / mL}$ continuamente até o dia 30, inibindo a luteólise e prolongando a função lútea em éguas (VANDERWALL; RASMUSSEN; WOODS, 2007). Resultados semelhantes foram apresentados por Vanderwall et al., (2012), confirmando que a administração diária de OXT foi tão eficaz quanto a administração de OXT duas vezes ao dia, para interromper o processo luteolítico e prolongar a função do CL na fêmea equina. Após exposição repetida à OXT, os níveis de transcrição do OXTR permanecem inalterados enquanto a expressão de PTGS2 foi reduzida (KEITH et al., 2013).

A supressão inicial da capacidade do endométrio para secretar $\text{PGF2}\alpha$, em volta do dia 14 de prenhez, deve-se, tanto à inibição da expressão do RNAm de PTGS2, quanto do OXTR ao nível protéico (DE RUIJTER-VILLANI; STOUT, 2015). Portanto, dado que a capacidade de resposta à OXT subjacente à luteólise cíclica se desenvolveu em, ou por volta, do dia 10 pós ovulação (STOUT; LAMMING; ALLEN, 1999), enquanto a repressão do PTGS2 ocorreu no dia 13 de prenhez (BOERBOOM et al., 2004), é provável que a sinalização de RMP seja uma cascata de eventos que ocorra entre os dias 12 e 14 da prenhez equina (WILSHER; CLUTTON-BROCK; ALLEN, 2010; KLEIN; TROEDSSON, 2011).

A partir dos dados previamente publicados, um modelo do funcionamento dos processos biológicos da prenhez inicial equina tem se estabelecido (Fig. 1). Durante o período do RMP, o concepto equino é altamente móvel através do lúmen uterino, é dependente da ação de prostaglandinas derivadas do concepto no miométrio. O concepto sintetiza estrógenos e arginina no fluido luminal uterino e a oxitocina endometrial (OT) estimula o crescimento do concepto pela ação dos receptores OT (OTR) no trofotoderma. Por ação da regulação negativa da PTGS2, antes conhecida como ciclooxigenase 2 (COX2) no epitélio endometrial, a oxitocina endometrial não pode estimular a síntese endometrial da prostaglandina $\text{F2}\alpha$, portanto, a função do corpo lúteo é preservada (AURICH; BUDIK, 2015).

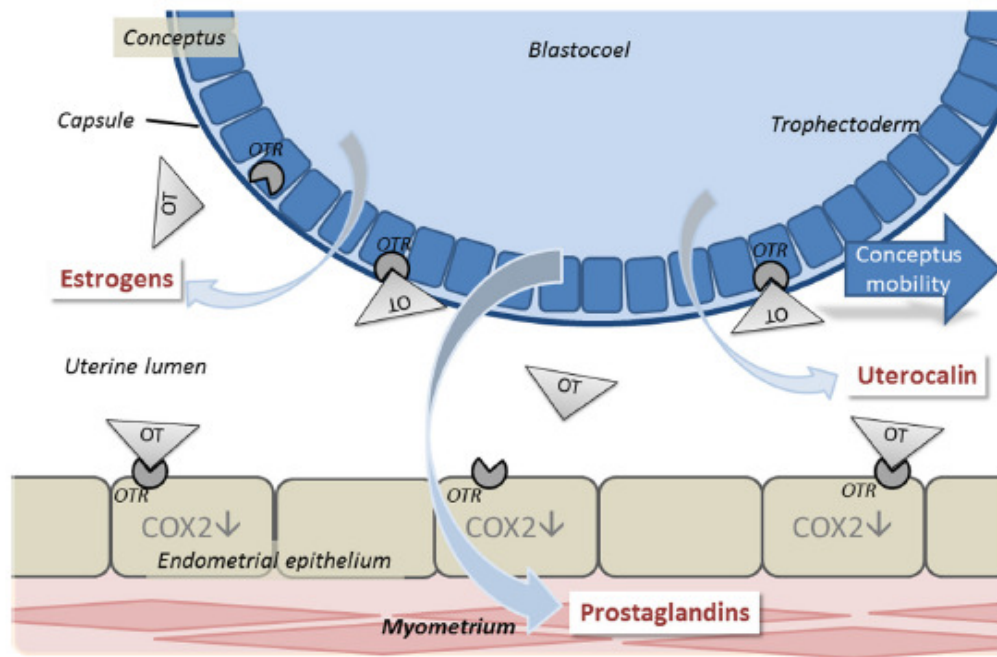


Fig. 1. Representação esquemática das interações entre o conceito e o útero proposto no período do reconhecimento materno da prenhez nos dias 12/13 pós ovulação (AURICH; BUDIK, 2015).

Apesar do mecanismo pelo qual a atividade do OXTR é suprimida no endométrio de éguas prenhes precise ser confirmado, sua ocorrência pode originar-se da cessação da migração do conceito equino (DE RUIJTER-VILLANI; VAN TOL; STOUT, 2015). Acredita-se que o conceito migra continuamente no lúmen uterino durante a prenhez, a fim de interromper o processo luteolítico. O período de mobilidade máxima do conceito coincide com o tempo do RMP e à atenuação da liberação endometrial de $\text{PGF}2\alpha$ (KLEIN, 2015a). Portanto, é possível que a ausência de migração após o dia 16, torne o conceito incapaz de manter a supressão da capacidade do OXT sobre toda a superfície do útero (DE RUIJTER-VILLANI; VAN TOL; STOUT, 2015).

Mesmo que a regulação negativa do OXTR e da PTGS2 pareça contribuir para o processo antiluteolítico inicial, a diminuição da secreção endometrial de $\text{PGF}2\alpha$ aparentemente é um evento transitório durante o RMP, uma vez que durante a terceira semana da prenhez, o endométrio retoma a capacidade de secretar $\text{PGF}2\alpha$. Deve-se, portanto, presumir que mecanismos adicionais são necessários para garantir a manutenção contínua do CL. Sendo

assim, a supressão do PTGFR, desacopla a retroalimentação da OXT-PGF2 α , desempenhando um papel significativo na prevenção de qualquer liberação de PGF2 α que se desenvolva em pulsos de tamanho luteolítico (DE RUIJTER-VILLANI; VAN TOL; STOUT, 2015; KLEIN, 2015a).

2.4. Regulação de hormônios e receptores esteroides no útero

As alterações no trato reprodutivo da égua, ao longo do ciclo estral e da prenhez inicial, são coordenadas pelos esteroides ovarianos (GINTHER, 1992). Tanto o estrógeno (E2), quanto a P4, atravessam o citoplasma, se ligam aos receptores nucleares formando complexos ligante-receptor que servem como fatores de transcrição que interatuam diretamente com o ácido desoxirribonucleico (DNA) para regular a expressão gênica, controlando assim o desenvolvimento e a diferenciação endometrial (DEFRANCO, 2002). Uma regulação espaço-temporal da expressão dos receptores de P4 (PGR) e do E2 (ER) no endométrio, parece ser um pré-requisito para a receptividade uterina (SPENCER et al., 2007).

O E2 exerce suas funções através de dois tipos de receptores (α e β) codificados por genes diferentes, o ESR1 e o ESR2 (ENMARK et al., 1997). O receptor de estrógeno α (ER- α) é o receptor de E2 predominante no útero (WEIHUA et al., 2000). Desempenha um papel importante nos efeitos luterotróficos dos E2, evidenciado pela perda da proliferação celular e produção da proteína secretora para ER- α no útero de camundongos (LUBAHN et al., 1993). O receptor de estrógeno β (ER- β) foi descrito no útero de mulheres (MATSUZAKI et al., 1999), camundongos (WEIHUA et al., 2000), e no cavalo (HONNENS et al., 2011). De modo igual, a P4 realiza suas funções por meio de duas isoformas de receptores nucleares (a isoforma PGR-A e a isoforma PGR-B), as quais são codificadas pelo mesmo gene (MOTE et al., 2006). A isoforma PGR-A é envolvida na mediação das ações da P4 no útero e nos ovários, enquanto a PGR-B é mais relevante no desenvolvimento da glândula mamária (MULAC-JERICEVIC et al., 2000, 2003).

A expressão do ESR1 e PGR na égua parece ser semelhante à da vaca, com expressão máxima durante o estro seguido de uma expressão negativa durante o diestro (HARTT et al., 2005) e uma regulação negativa ainda mais

profunda durante a prenhez, embora ainda não se saiba como isso se relaciona com a expressão de OXTR. No entanto, a sinalização estrogênica desempenha um papel importante durante o estabelecimento da prenhez em éguas, enfatizada pelo grande número de genes regulados por E2 ou genes envolvidos na sinalização de E2, que são regulamentados no início da prenhez equina (KLEIN et al., 2010).

O conceito equino expressa um número de enzimas envolvidas na síntese e metabolismo dos hormônios esteróides. A transferência de colesterol dentro da mitocôndria através da proteína reguladora da esteroidogênese aguda (STAR) e o passo limitante na biossíntese do E2 e da P4. A proteína STAR demonstrou maior expressão nos embriões dos dias 12 e 14, em comparação com os do dia 8. Semelhante ao padrão de expressão de STAR, a enzima de clivagem da cadeia de colesterol-citocromo P450 (P450SCC), uma enzima mitocondrial associada à conversão de colesterol em pregnenolona, assim como a 3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B1), uma enzima chave na produção de progesterona, andrógeno e estrógeno, expressada pelas células do trofocitotoderma; tiveram um aumento com o avanço do estágio de desenvolvimento embrionário (KLEIN; TROEDSSON, 2011).

Em todos os mamíferos, a exposição contínua do endométrio à P4 durante o diestro ou a prenhez inicial, regula negativamente a expressão do receptor de P4 (PGR) no epitélio luminal e glandular sem mudanças na expressão em células estromais (CARSON et al., 2000; SPENCER et al., 2007; DE RUIJTER-VILLANI; VAN TOL; STOUT, 2015). Especula-se que, durante o período de pré-implantação, a ação seletiva da P4 nas células estromais estimula a produção de progestamedinas, que por sua vez exercem ações parácrinas sobre o epitélio endometrial e o trofocitotoderma do conceito, regulando a produção de secreções endometriais e o desenvolvimento do conceito (SLAYDEN; KEATOR, 2007; BAZER et al., 2009; DE RUIJTER-VILLANI; VAN TOL; STOUT, 2015).

De acordo com Rambags et al (2008), além de suas ações através de receptores nucleares clássicos, a P4 pode atuar via receptores de membrana (*progesterone membrane receptor component 1* -PGRMC1 e mPR), possivelmente para mediar eventos importantes durante o início da prenhez, incluindo a diferenciação celular, modulação da apoptose e esteroidogênese, e

é expressa em trofocotoderma equino durante a prenhez inicial. Paralelamente, a presença de receptores esteroidais no concepto eleva a possibilidade de que além de exercer efeitos no endométrio, a produção de esteroides auxilie o desenvolvimento embrionário de uma maneira autócrina-parácrina.

2.5. Ambiente uterino no início da prenhez equina

No contexto da prenhez inicial, um ambiente uterino apropriado é necessário para fornecer nutrição e proteção imunológica ao embrião em desenvolvimento. A atividade secretora uterina exerce influência no crescimento embrionário por meio da nutrição histotrófica, sintetizada pelo epitélio glandular e regulada, tanto pelos hormônios maternos, quanto pelas secreções embrionárias (KOCH; RAMADOSS; MAGNESS, 2010)

Durante o período prolongado de pré-implantação, o concepto equino obtém os nutrientes através das secreções uterinas do denominado histotrofo, constituído principalmente de enzimas, fatores de crescimento, íons, citocinas, hormônios, moléculas de adesão, nutrientes e proteínas (ZAVY et al., 1982; KOCH; RAMADOSS; MAGNESS, 2010). Imediatamente após a entrada do embrião no útero, o estroma e lúmen uterino de éguas prenhes, apresenta alterações morfológicas e funcionais necessárias para o desenvolvimento inicial do embrião. A presença de pequenas quantidades de material histotrófico entre as dobras uterinas, um aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos no estroma endometrial e a perda de células ciliadas, são observadas em éguas prenhes no 7 dia pós-ovulação (CAMOZZATO et al., 2019)

As secreções uterinas ou histotróficas são um componente crítico para a sobrevivência inicial dos embriões, funcionando como o único fornecimento de nutrientes necessários para o concepto em desenvolvimento (MULLEN et al., 2012) O histotrofo, contém proteínas essenciais para o desenvolvimento do concepto (BAZER et al., 2011) e as principais proteínas encontradas são a uteroglobina (UGL), a uteroferrina (UF) e a uterocalina (UCA ou proteína P19), uma das maiores proteínas secretada unicamente pelo endométrio da égua (BEIER- HELLWIG et al., 1995; HOFFMAN et al., 2009).

A P19, principal proteína do histotrofo uterino equino, é um membro da família de proteínas que transportam pequenas moléculas hidrofóbicas

(FLOWER; NORTH; ATTWOOD, 1993). Grandes quantidades de P19 foram detectadas em lavagens uterinas nos primeiros 23 dias de prenhez (STEWART et al., 1995), e altos níveis endometriais de RNAm para P19 foram encontrados no dia 16 da prenhez equina (KLEIN, 2015b). A P4 endógena ou exógena, estimula a expressão da P19, no entanto, a expressão protéica na terceira semana de prenhez apresentaram mudanças sugerindo que outros fatores além da P4 regulam sua expressão (CROSSETT et al., 1998). A P19 equina liga-se aos ácidos graxos e ao retinol; portanto, possivelmente sua principal função seja fornecer nutrientes ao concepto em desenvolvimento (SUIRE et al., 2001).

Uma visão geral das proteínas produzidas e secretadas durante o estabelecimento de prenhez foi proporcionada por Hayes, Flanagan e Jowsey, (2012). Um subconjunto de proteínas endometriais relacionadas à prenhez com papéis potenciais no desenvolvimento embrionário e/ou imunidade inata foram analisadas por LC-MS / MS (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas). Durante o dia 20 da prenhez, as proteínas que aumentaram incluíram o ativador GM2 (GM2A), lipocalina 2 (LCN2), stanniocalcina 1 (STC1) e Serpina 14, envolvidas no transporte glicolipídico, na ligação dos complexos de ferro sideróforos, no metabolismo do cálcio e fosfato e a placentação epiteliocorial respectivamente. A fosfolipase secretora A2 (sPLA2), secretoglobina 1A1 (SCGB1A1) e vanina 1 (VNN1) diminuíram no mesmo período da prenhez.

Em torno da sinalização do RMP, as proteínas presentes no fluido uterino equino no dia 13, foram identificadas e quantificadas em grande escala, detectando a regulação positiva de vários inibidores da síntese de prostaglandinas, incluindo prostaglandin reductase 1 (PTGR1), glutathione transferase 1 (GSTP1) e annexina A1 (ANXA1). A PTGR1, catalisa o leucotrieno B4 no seu metabolito biologicamente menos ativo, sendo o passo chave na inativação metabólica do leucotrieno B4, como mostrado na Fig. 2 (SMITS et al., 2018).

A este respeito, a regulação positiva de GSTP1 associada à prenhez equina, pode estar envolvida no mecanismo luteostático pela inibição da PTGS2 (SMITS et al., 2018), embora, as glutathione transferases também estejam geralmente envolvidas na biossíntese de prostaglandinas e dos

leucotrienos (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Coincidentemente, Bastos et al. (2019), relataram mudanças no perfil proteômico da secreção endometrial durante o desenvolvimento embrionário inicial nos dias 7, 10 e 13 pós-ovulação na égua, sugerindo que as proteínas identificadas e relacionadas ao transporte de lipídios através do embrião da cápsula, geração do ATP, a tolerância imunológica materna e a angiogênese podem ser importantes para o desenvolvimento embrionário e o reconhecimento materno da prenhez equina.

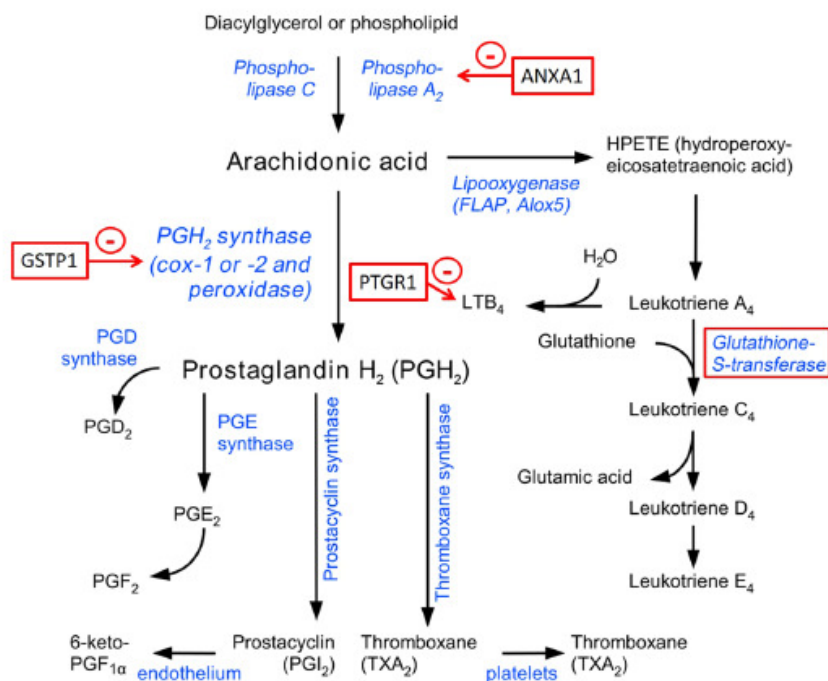


Fig. 2. Inibidores da síntese de prostaglandinas no fluido uterino de éguas prenhes. Via de eicosanoides, adaptada da Wikipédia. Proteínas encontradas para serem reguladas no fluido uterino de éguas prenhes são marcadas em vermelho (SMITS et al., 2018).

2.6. Desenvolvimento embrionário inicial na tuba uterina

Muitos aspectos do período inicial da prenhez mostram-se únicos no gênero *Equus* (ALLEN, 2000) e diferem de eventos equivalentes em outras espécies domésticas.

Como uma característica especial na égua, os oócitos fecundados e não fecundados são transportados diferentemente na tuba uterina. Enquanto na maioria dos mamíferos, os oócitos fecundados e não fecundados entram no útero em momentos semelhantes após à ovulação (DZUIK; POLGE;

ROWSON, 1964; MOOR, 1968), nos equinos, os oócitos não fecundados são retidos na região da junção istmo-ampola da tuba uterina, onde são eventualmente degenerados de maneira progressiva (VAN NIEKERK; GERNEKE, 1966; FLOOD, JONG, BETERRIDGE, 1979) No entanto, após à fecundação bem-sucedida, os embriões atravessam a junção útero-tubárica, entrando no útero entre 144 e 168 horas pós-ovulação (dia 6 - 6,5) no estágio de desenvolvimento de mórula tardia ou blastocisto inicial (BETTERIDGE et al., 1982; ALLEN, 2000; BETTERIDGE, 2000; ALLEN, 2001). Coincidindo com esse transporte seletivo de embriões, foi demonstrado por Weber et al. (1991) que o embrião equino secreta quantidades crescentes de prostaglandina E2 (PGE2) a partir do dia 5 pós-ovulação, provocando contrações locais e relaxamento das fibras musculares lisas da tuba uterina, permitindo assim, a entrada do embrião no útero (WEBER et al., 1992, 1995).

O diálogo materno- embrionário inicial na égua certamente desencadeia-se na tuba uterina (BETTERIDGE, 2000), a qual desempenha um papel fundamental no fornecimento do microambiente ideal para o desenvolvimento embrionário inicial. Conjuntamente, a presença de um embrião induz mudanças na regulação de proteínas relacionadas com a prenhez inicial em outras espécies domésticas, suportando a hipótese de que o embrião equino interage com a tuba uterina, afetando o padrão de secreção materna de proteínas envolvidas em vias relacionadas à prenhez (SMITS et al., 2016).

Certamente, as diferentes pesquisas com enfoque proteômico entorno das secreções uterinas e sua importância fisiológica na fixação, implantação, RMP, manutenção lútea; tem ganhado espaço para o estudo proteômico da dinâmica molecular uterina, assim como o seu papel na atividade uterina (KOCH, J. M.; RAMADOSS, J.; MAGNESS, R. R., 2010) porém são necessários mais análises proteômicas abrangentes das mudanças na expressão proteômica do fluido luminal uterino em resposta à interação materno-embrionária no cavalo particularmente em torno do momento do transporte do embrião para o útero.

3. ARTIGO

O artigo científico será submetido na revista Theriogenology

CERULOPLASMIN, SEROTRANSFERRIN AND ALBUMIN PRESENTED DIFFERENT ABUNDANCE IN MARES' UTERINE FLUID FIVE DAYS AFTER INSEMINATION

Johana Lancheros-Buitrago^{a*}, Paula Rodriguez-Villamil^b, Joana Gregory^a, Henrique Bastos^a, Cesar Augusto Camacho^a, Jorge Emilio Caballeros^a, Nicolas Cazales^{ac}, Edvaldo Barros^d, Maria José de Jesus Silva^d, Anita Pimentel^a, Rodrigo Costa Mattos^a

^a REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

^b Recombinetics, Inc, Minnesota, USA.

^cFacultad de Veterinaria – UDELAR, Montevideo, Uruguay

^dNuBioMol - Núcleo de Análise de Biomoléculas, UFV, Viçosa-MG, Brazil

* Corresponding author. Avenida Bento Gonçalves, 9090, REPROLAB, cep. 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: rcmattos@ufrgs.br (Johana Lancheros-Buitrago).

Highlights

- Uterine fluid proteomic profile changes at 5th day post ovulation in inseminated mares compared to cyclic ones.
- Ceruloplasmin has an increased abundance in the equine uterine fluid 5 days post insemination.
- Higher abundance of Serotransferrin and Albumin are observed in cyclic mares.

Abstract

Characterization of the uterine proteome before the entry of the conceptus to the uterus is essential to know the factors involved in the physiological events of gestation. The aim of the study was to compare proteomic profile of uterine fluid collected on day 5 post ovulation of cyclic and inseminated mares. Samples of

endometrial secretion were recovered over 2 cycles during the fifth day post ovulation. The first cycle constituted the Cyclic group (n = 10) and in the following cycle, the same mares were inseminated and considered as the Inseminated group (n = 10). All the samples were subjected to two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE). A total of 107 spots were visualized by 2D-PAGE. Three spots with differences in abundance between the inseminated and cyclic mares and with presence in at least 80% in one of the groups were selected and identified. The selected spots were extracted, digested by trypsin and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometry (MS) for protein identification. Three proteins were identified: ceruloplasmin (CP) serotransferrin (TF) and albumin (ALB). The identified proteins in this study were related to iron metabolism and immunological tolerance suggesting that changes in their abundance during the 5 days after ovulation are probably a signaling mechanism of the potential equine conceptus to the maternal immune system for its immunological recognition. Probably changes in abundance of CP, ALB and TF represent a mechanism of endometrial preparation for the maternal recognition, attachment and development of a potential equine embryo.

Keywords: mare, ovulation, proteomic, maternal recognition

1 Introduction

Continuous fetomaternal dialogue is a prerequisite of pregnancy in mares, as it is in all mammals. However, a number of features of equine pregnancy are unique to this genus and differ from equivalent events in other common large domestic animal species (ALLEN, 2001). The slow passage of the equine embryo through the oviduct and the differential transport of oocytes and embryos within the equine oviduct are some of these unusual particularities (ALLEN, 2005).

Equine conceptus passes into the uterus through the utero-tubular junction after day 5.5 post-ovulation (BATTUT et al., 1998; ALLEN, 2001; RIERA, 2009; MCCUE; SQUIRES, 2015). When the equine conceptus finally enters the uterus it moves continually throughout the uterine lumen (ALLEN,

2001), playing an important role in altering PGF₂α production (MCDOWELL; SHARP, 2013) and being integral to maternal recognition of pregnancy (MRP) (KLEIN, 2015a). The term MRP (SHORT, 1969), has been classically used to describe the conceptus signal which prevents loss of the maternal corpus luteum at about 14 days after ovulation (SHARP, 2000)

The uterine environment changes thereupon the entry of the conceptus into the uterus. Uterine blood vessels enlarge their caliber, number of ciliated cells diminishes, the superficial cells of the endometrium are more protruded, and a small amount of histotrophic material between the uterine folds is observed (KEENAN, 1991; MATTOS et al., 2015; CAMOZZATO et al., 2019).

At day 7 after ovulation, certain proteins in uterine fluid are more abundant in pregnant than in cyclic mares. These proteins are related to the transport of lipids through the conceptus capsule, uterine motility, metabolism and ATP generation, maternal immunological tolerance, cell proliferation and differentiation, angiogenesis, and could be important for conceptus development and equine MRP (BASTOS et al., 2018). In the context of MRP, prostaglandin synthesis is of special interest. For three proteins involved in this pathway, namely prostaglandin reductase 1 (PTGR1), glutathione transferase 1 (GSTP1) and annexin A1 (ANXA1) were detected in the uterine fluid of pregnant compared with cyclic mares (SMITS et al., 2018).

The difference in the protein patterns of pregnant and cyclic mares on the 7th day after ovulation (BASTOS et al., 2019) raised the hypothesis of probable protein alterations in the uterine environment before the entry of the conceptus into the uterus. Therefore, the objective of this study was to compare proteomic profile of uterine fluid collected on day 5 post ovulation of cyclic and inseminated mares.

2 Materials and Methods

2.1. Animals

The present experiment was conducted in the south of Uruguay (34°22' S, 55°36' W) during the southern breeding season (February to March). This study was carried out following an Animal Ethical Use Committee approved

protocol from Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (protocol number 27316 from April 17, 2014) and by the Bioethics Committee of the Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (CEUAFVET-PI-34/14 – protocol number 111130-001367-14).

Ten cyclic mixed-breed mares from a commercial herd were used. Mare's ages ranged from 4 to 10 years old (mean age 6.8 years old), weight ranged between 450 to 550 Kg, and mean body condition score was 3.3 (ranging from 3 to 3.5; in a scale from 1 to 5) (MALSCHITZKY et al., 2001). Mares were kept in natural pastures and supplemented with alfafa hay and oats. Animals were given free access to water and received *ad libitum* mineral supplementation. Mares did not present any history of fertility problems and were examined for reproductive soundness and reproductive status by evaluation of perineal conformation, transrectal palpation and ultrasound of the genital tract (SonoScapeV8, Shenzhen, China). Only cyclic and clinically normal mares, with endometrium classified as category I or IIA (KENNEY; DOIG, 1986) and without evidence of endometritis, were selected.

2.2. Reproductive procedures

Mares were examined daily by transrectal palpation and ultrasonographic examination. When a corpus luteum was detected, luteolysis was induced with 5 mg dinoprost tromethamine IM (Lutalyse®, Pfizer Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil).

Once mares were in estrus and a follicle > 35 mm in diameter and marked uterine edema were evidenced, mares were monitored every 24 h until ovulation was detected. Ovulation was considered day 0. Intrauterine samples were collected at day 5 after ovulation in all mares (n = 10). These samples constituted the Cyclic group.

At day 7 post-ovulation all mares were administered 5 mg dinoprost tromethamine IM to induce a new estrus. Mares were monitored twice daily by transrectal palpation and ultrasound. In this second cycle, when a pre-ovulatory follicle (> 40 mm) was observed in association with a decline in the grade of uterine edema (GINTHER, 1986), the same mares were inseminated with fresh semen from a fertile stallion, with a minimum of 800×10^6 sperm cells.

Examinations continued twice daily to confirm ovulation, considered day 0. At day 5 after ovulation intrauterine samples were collected (n = 10) and these samples constituted the Inseminated group.

No fluid accumulation was detected in the uterine lumen of the mares between ovulation and sample collection day in both experimental groups.

2.3. Sample Collection

Uterine fluid samples were collected using commercial vaginal tampons (Mini OB, Johnson & Johnson Industrial Ltda., São José dos Campos, São Paulo, Brazil). A tampon with a strand of floss of 50 cm, protected by a palpation glove (double glove technique), was placed into the uterus through the cervix. The distal part of a palpation glove was cut to form a plastic tube and the gloved hand with the tampon was inserted into the plastic tube, closing its extremity with a finger. The plastic tube was removed at the time of insertion of the tampon into the uterus, where it remained for 30 min. The tampon was then removed protected by a palpation glove, placed in a sterile plastic bag and centrifuged at 4°C (1500 X g, for 10 min) for fluid recovery. The recovered fluid (> 0.5 mL) was transferred to conical tubes and immediately centrifuged at 4°C (10,000 x g, for 1 h). The supernatant was stored in cryotubes at –80°C until further analysis (MALSCHITZKY et al., 2008). In two of the 10 samples collected in the Inseminated group, there was not enough fluid recovered to perform the two-dimensional electrophoresis. These mares were excluded from the experiment.

2.4. Electrophoresis

Protein content from the uterine samples was determined by the Bradford method (BRADFORD, 1976) employing 1 mg/mL of BSA (A7906; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) as standard. Proteins were separated using two dimensional gel electrophoresis in duplicate. In summary, samples containing 250 µg of total protein were mixed with buffer (7-M urea, 2-M thiourea), 0.5% free ampholytes (IPG buffer, pH 3–10 [GE Life Sciences, Piscataway, NJ, USA]), 2% dithiothreitol (DTT), 2% CHAPS, and traces of

bromophenol blue. Initially, the strips were rehydrated for 16 hours in 250 μ L rehydration solution at room temperature in IPG Box (GE Life Sciences). Then, samples were incubated in 13-cm IPG Strips (pH 3 – 10 linear, GE Life Sciences). Isoelectric focusing was carried out in Ettan IPGphor III System (GE Life Sciences) with the following conditions: 100 V (100 Vh), 150 V (300 Vh), 200 V (200 Vh), 500 V (500 Vh), 1,000 V (800 Vh), 8,000 V (11,300 Vh), 8,000 V (14,1500 Vh), 8,000 V (2,900 Vh). The current limit was 50 μ A per strip.

For the second dimension, strips containing endometrial proteins were incubated for 20 min in equilibration buffer I (75-mM Tris-HCl, pH 8.8, 6-M urea, 29.3% glycerol, 2% SDS, 2% DTT) and equilibrated for an additional 20 min in buffer II (similar to buffer I, but containing 2.5% iodoacetamide instead of DTT). Subsequently, the strips were placed on top of 1.5 mm thick 12.5% sds-page gels and the proteins were separated using SE 600 Ruby system (GE Life Science) at 10°C. Electrophoresis was performed with 15 mA for 15 min per plate followed by 40 mA per plate, for 4 h (Electrophoresis Power Supply 301; Amersham Pharmacia Biotech).

Gels were stained in colloidal Coomassie blue (CANDIANO et al., 2004; VAN TILBURG et al., 2013). Briefly, the gels were placed in fixation solution (2% phosphoric acid and 30% ethyl acid), 3 times (20 min each stage). Then, the gels were washed 3 times (20 min each stage) in acid solution Phosphoric acid at 2% and placed in a solution with phosphoric acid (2%), ethyl alcohol (18%) and ammonium sulfate (15%) for 60 min. At the end, the Coomassie Blue G-250 solution (2%) was added and the gels kept in agitation in the solution for 72 h at room temperature. Gels were washed for 24 h with distilled water and stored in acetic acid 5%. Gels were digitized in the ImageScanner™ III (GE Life Sciences) scanner and analyzed using the PDQuest 2D software (Bio-Rad Laboratories, Rockville, MD, USA) to determine the optical density of the spots.

2.5 Spot selection criteria

Spots were selected by (a) presence in at least 80% of gels in one of the groups (Cyclic or Inseminated) and (b) significant abundance ($P < 0.05$) of relative optical density in one of the groups (Cyclic or Inseminated)

2.6. Enzymatic digestion of spots in the gel and mass spectrometry

After the 2D-PAGE and spots cut, each spot was subjected to digestion with TPCK-treated pork pancreas (Promega Corporation, USA) and eluted, as described previously by Shevchenko et al. (2006). The resulting peptides were resuspended in 10 μ L of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution, desalinated in Pierce [™] C18 Spin Tips, (Thermo Scientific, China) and eluted in 2.5 μ L of 50% acetonitrile, acidified with 0.1% TFA. For MALDI-TOF/TOF, the α -cyano-4-hydroxycinnamic acid-HCCA matrix (Bruker Daltonics, Germany) was used. Following, 1 μ L of sample and 1 μ L of matrix were applied and homogenized in each spot of appropriate steel plate. The spectra of MS1 and MS2 were acquired in a MALDI-TOF/TOF spectrometer, Ultraflex III model (Bruker Daltonics). All data obtained were managed by Flexcontrol software, version 3.3 (Bruker Daltonics, Germany). The spectra resulting from the MS1 and MS2 analyzes were processed using the FlexAnalysis software, version 3.3 (Bruker Daltonics, Germany).

2.7. Protein identification and data validation

The proteins were identified using the MASCOT application (version 2.4.0, Matrix Science, London, UK). All mass spectra were compared with the Protein Data Bank, of the species of the Equidae family, deposited in UNIPROT. The search parameters were: enzymatic digestion by trypsin with one missed cleavage; carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and oxidation of methionine as a variable modification. The result obtained by MASCOT was validated by the application SCAFFOLD, version 3.6.4 (Proteome Software INc., Portland, OR). The identified peptides were validated by applying the Peptide Prophet algorithm (KELLER et al., 2002) and the proteins with the Protein Prophet algorithm (NESVIZHSKII et al., 2003). The identifications of peptides and proteins were accepted with a minimum of 90% probability of identification, with the presence of at least two unique peptides for each identified protein.

2.8. Gene Ontology

The information on the ontology of the proteins was recovered from the Gene Ontology data, available in the Uniprot Consortium database (<http://www.uniprot.org>). The interaction networks between the identified and validated proteins were reconstructed, obtained using the STRING database (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes, version 10.0, <http://string-db.org/>) (SZLARCZYK et al., 2015). An enrichment based on the information coming from the KEGG-Pathway databank was made, using the own STRING. The recovery of the maps referring to the identified non-KEGG pathways (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) was done through the address: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

2.9. Statistic analysis

Selected spots from at least two good resolution gels per sample were submitted to Mann-Whitney test to evaluate the relative optical density of each spot as a dependent factor, and the experimental groups (Cyclic or Inseminated) as independent variable using the software GraphPad Prism 8.0, (La Jolla, CA, USA). The presence frequency of the selected spots in the gels of both groups was analyzed with the Fisher Exact Test. Differences $P < 0.05$ were considered significant. Differences $0.05 \leq P \leq 0.1$ were considered tendency.

3. Results

A total of 107 spots with molecular weight ranging from 10 to 225 kDa and pI intervals from 3 to 10 were detected in the 36 analyzed 2D gels. Total protein content did not differ ($P = 0.428$) between Cyclic group ($1.89 \pm 0.06 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) and Inseminated group (1.89 ± 0.05). No differences ($P = 0.096$) were observed in the number of spots in the Cyclic group gels (52.8 ± 2.8) and in the Inseminated group gels (61.6 ± 4.5). The total matches in the two groups were 100 spots (Fig 3). A total of four spots with differences ($P < 0.05$) in abundance

between the Inseminated and Cyclic mares were detected. One spot was presented in 25% of the gels in both groups and did not reach the selection criteria. Three spots which reached at least 80% of presence in one of the experimental groups were selected and identified (Fig. 4). Seven spots were identified only in the gels of inseminated mares, however, they were present in 18.75% of the gels and did not reach the selection criteria.

The results of the MALDI TOF/TOF analysis of the identified spots statistically validated by Scaffold are listed in Tables 1 and 2.

Ceruloplasmin (CP/spot 7701) was more abundant ($P = 0.038$) in the Inseminated group (Fig 5A) than in the Cyclic group. CP was observed in 87.5% of the gels of the Inseminated group and tended to be more present ($P = 0.067$) than in the Cyclic group gels (55%).

Serotransferrin (TF/spot 3701) and Serum Albumin (ALB/ spot 4702) were more abundant proteins in Cyclic group ($P = 0.038$ and $P = 0.020$ respectively) than in Inseminated group (fig 5B and 5C). TF and ALB were detected in 94.7% and 100% of the gels of the Inseminated group respectively, which did not differ ($P > 0.05$) with the 85% and 100% presence of TF and ALB in the gels of the Cyclic group.

The proteome of the endometrial secretion of cyclic and inseminated mares on the 5th day after ovulation was classified into different categories based on molecular function, biological process and cellular components (PANTHER analysis). The functional classification of these proteins showed a wide distribution of activities. The main category in which the proteins were classified was "cellular iron ion homeostasis" [GO: 0006879] (22.3%) for the biological processes (Fig. 6A) and "chaperone binding" [GO: 0051087] (15.38%) for the molecular functions (Fig. 6B). The gene ontology analysis of the cellular component was mainly associated with "blood microparticle" [GO 0072562] (16.66%) and "extracellular exosome" [GO: 0070062] (16.66%) (Fig. 6C).

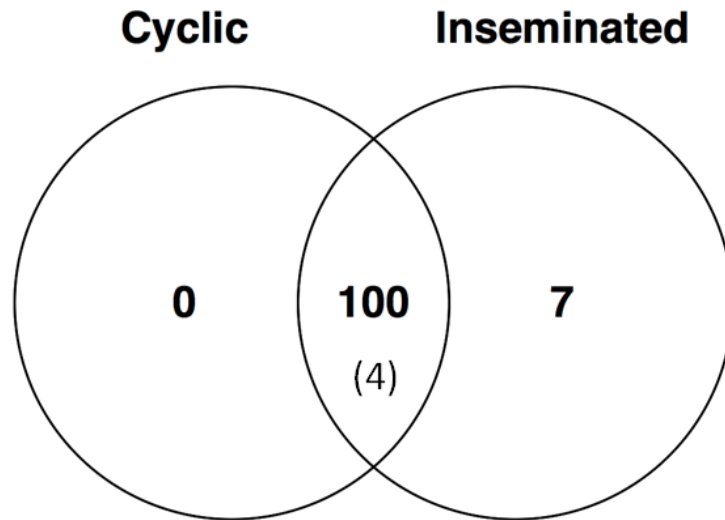


Fig. 3. Venn diagrams showing the distribution of total reproducible spots identified from 2-D gels of each group. Into brackets is the total number of significant protein spots. Created using Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> accessed December 7th, 2018)

The results of the MALDI TOF/TOF analysis of the identified spots statistically validated by Scaffold are listed in Tables 1 and 2.

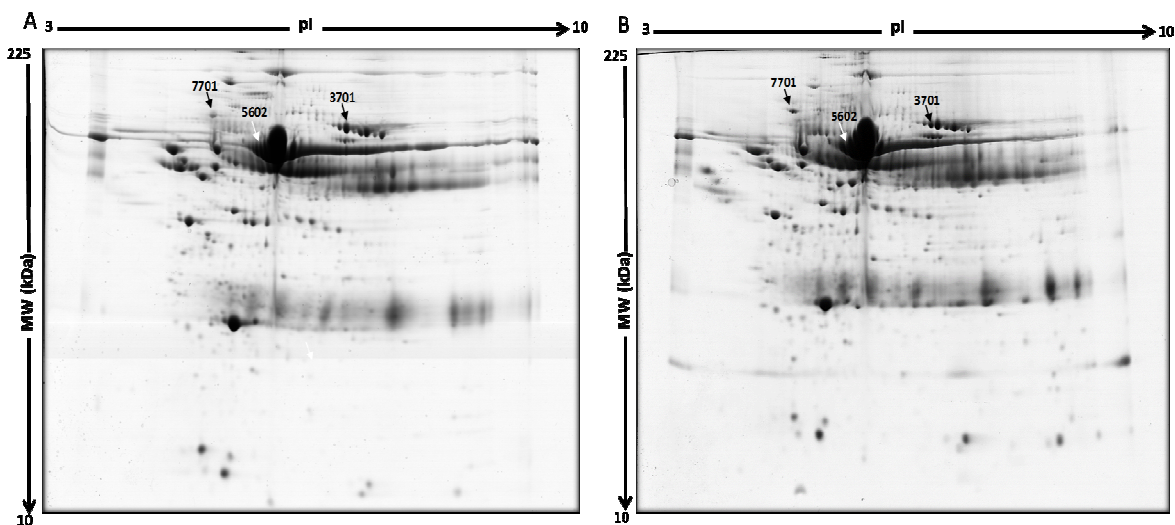


Fig 4. Comparison of proteome by two-dimensional gel electrophoresis on Cyclic (A) and inseminated (B) uterin fluid equine at day 5 post ovulation. Numbers in the figure correspond to the Spot ID shown in Table 1.

Table 1. Proteins identified in uterine fluid collected from cyclic and inseminated mares on day 5 post ovulation, by MALDI TOF/TOF algorithm and SCAFFOLD software. Spot numbers refer to those shown in the 2-D gels of Fig. 4

Spot ID ^a .	Identified protein	ABV ^b	Mascot Score ^c	Theoretical		Observed		Protein ID Probability ^d (%)	Protein coverage ^e (%)	Peptide number ^f	Protein Function
				KDa	pI	KDa	pI				
7701	<i>Ceruloplasmin</i>	CP	77	122.7	5.3	127	5,1	99	2	2	Chaperone binding, copper ion binding, ferroxidase activity
3701	<i>Serotransferrin</i>	TF	319	80.3	6.8	71	7.5	100	8	4	Ferric iron binding, ferric iron transmembrane transporter activity
5602	<i>Serum albumin</i>	ALB	484	70.3	5.7	56	5,9	100	18	7	Chaperone binding, DNA binding, drug binding, fatty acid binding, identical protein binding, oxygen binding, pyridoxal phosphate binding, toxic substance binding

a Spot ID correspond to the number shown in Fig 2.

b Protein abbreviation in accordance with gene abbreviation UniProt.

c Mascot score corresponds to $-10 \cdot \log_{10}(P)$, where P is the absolute probability.

d Probability for validation by Scaffold software of the proteins statistically identified by Mascot.

e Protein coverage calculated by Scaffold (identified amino acids / total amino acids).

f Number of peptides identified by Mascot and validated by Scaffold. The sequences of peptides are found in Table 2.

Table 2. Proteins identified in uterine fluid collected from cyclic and inseminated mares on day 5 post ovulation by MALDI TOF/TOF algorithm and SCAFFOLD software. Spot numbers refer to those shown in the 2-D gels of Fig. 4

Protein name	Spot	UniProt Accession number	Peptide Number ^(a)	Peptide sequence	Peptide probability
Ceruloplasmin	7701	F6PQ46	2	VDKENEDFLESNR	91%
				GAHPLSIEPIGVR	90%
Serotransferrin	3701	P27425	4	AVSNFFAGSCVPCADR	95%
				SVDEYKDCYLASIPSHAVVAR	95%
				CGLVPVLAENYETR	95%
				YYGYTGAFR	94%
Albumin	5602	F7BAY6	7	RHPYFYGPELLFHAEYK	95%
				CSSFQNFGER	95%
				DVFLGTFLYEYSR	95%
				RHPDYSVSLLLR	95%
				NCDLFEEVGEYDFQNALIVR	95%
				RPCFSALELDEGYVPK	95%
				AETFTFHADICTLPEDEK	95%

^a Number of peptides identified by Mascot and validated by Scaffold.

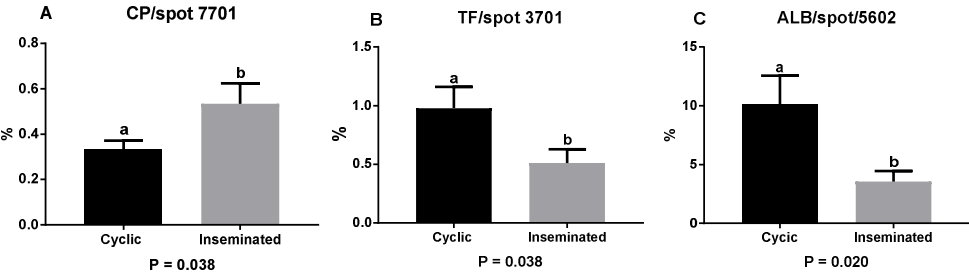


Figure 5. Mean (\pm SD) relative volume (%) of proteins with higher abundance in the uterine fluid from inseminated mares (A - Ceruloplasmin – CP), and with higher abundance in cyclic mares (B – Serotransferrin – TF; C – Albumin – ALB) on day 5 after ovulation. Different letters (a, b) represent significant differences ($P < 0.05$) between groups.

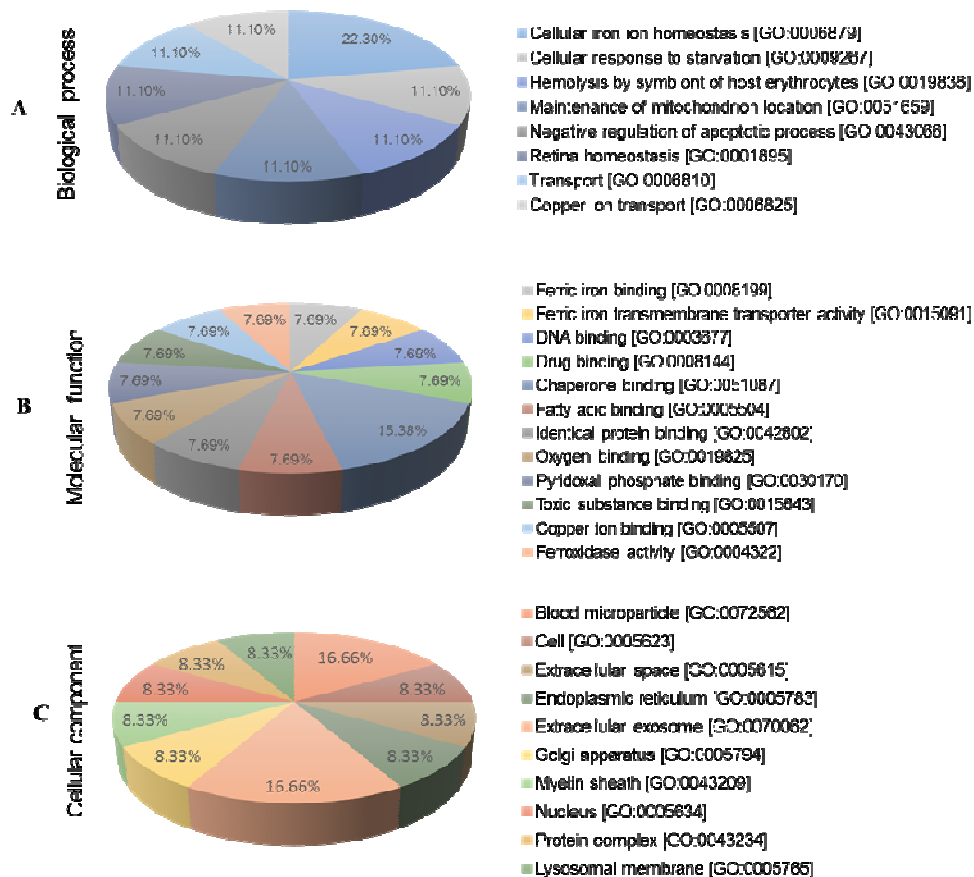


Fig 6. Gene Ontology analysis of differentially regulated endometrial proteins. Proteins are organized in pie charts according to the biological process, molecular functions and cellular component in which they are involved, using UniProt Consortium database.

4. Discussion

The equine conceptus reaches the uterus after day 5.5 post-ovulation (BATTUT et al., 1998; ALLEN, 2001; RIERA, 2009; MCCUE; SQUIRES, 2015). In this study, as uterine samples were taken, embryos could not be collected from inseminated mares to confirm pregnancy. Nevertheless, under optimal conditions (i.e., inseminating with sufficient number of spermatozoa, using fresh fertile semen) fertilization rates are very high (> 90%) in young mares and may be slightly lower (85%) in aged mares (VANDERWALL, 2008)

The analysis by 2D-PAGE revealed differences in the proteomic profile in the uterine fluid on the 5th day post-ovulation in Inseminated mares in relation to Cyclic mares. Three Acute Phase Proteins (APP) were detected. One of them was a major positive acute phase reactant (Ceruloplasmin – CP) and two were negative acute phase reactants (Serotransferrin –TF and Albumin – ALB) (GRUYS et al., 2005).

APPs are part of an evolutionarily family of proteins produced mainly in the liver in response to infection and inflammation. The varied reactions of the host to infection, inflammation, or trauma are collectively known as the acute phase response (APR). However, it is known that not only inflammation but also the systemic physiological response derived from pregnancy can have a significant effect on APP values (ECKERSALL et al., 1993; ALLEN; KOLD, 1988; ROMERO et al., 2007; DĘBSKI et al., 2016). The presence of APPs in uterine fluid was previously confirmed in pregnant mares prior to attachment at the 7th day (BASTOS et al., 2019) and at the 13th day (SMITS et al., 2018) post ovulation.

CP is the main copper transport protein in the blood and is involved in iron metabolism (EL-BAZ; MOWAFY; LOFTY, 2018). The increase in serum levels of CP is believed to protect against oxidative stress associated with pregnancy and variations in the dynamics of serum concentrations suggest a role for CP in maintaining homeostasis during the new reproductive condition (WISDOM et al., 1991; SKARŻYŃSKA et al., 2018).

In the present study, CP was higher in the uterine fluid of the Inseminated group than in the Cyclic group before the entry of the conceptus in the uterus. Our results are in agreement with a recent study (SMITS et al., 2017) in which CP was more abundant at day 4th in the oviductal fluid of pregnant mares than in non-pregnant mares. CP has also been detected during early pregnancy in women (BURROWS; PEKALA, 1971) bitches (VANUCCHI et al., 2017), giant pandas (WILLIS et al., 2011) and gilts (JALALI et al., 2015). CP is one of the major proteins involved in generating endometrial receptivity (JALALI et al., 2015).

TF is one of the best iron-carrying serum proteins, guarantees iron transport from sites of absorption to sites of storage and metabolism (MCDOWELL; ADAMS, BAKER, 1995). The lower abundance of TF in the

uterine fluid of the Inseminated group proposes an immune response signaled by the conceptus. TF is a negative APP and tends to decrease in APR (GRUYS et al., 2005). During the APR, the innate immune system induces alterations in iron homeostasis that reduces iron supplies to pathogens. Pregnancy affects the maternal metabolism, including iron homeostasis, tightly regulated by the membrane iron exporter ferroportin and its regulatory peptide hormone hepcidin (LI et al., 2016; SANGKHAE; NEMETH, 2018). Elevated hepcidin levels cause decreased iron absorption from the gastrointestinal tract and prevent the release of iron from hepatocytes and macrophages, resulting in hypoferrremia (GUIDA et al., 2015; LI et al., 2016). Given that the progestational hormone progesterone is elevated during early pregnancy (BASTOS et al., 2019), it is tempting to speculate about a physiological role for progesterone in regulating serum hepcidin levels during pregnancy (LI et al., 2016).. It has been shown that hepcidin levels are highest early in pregnancy and diminish throughout the course of pregnancy (KOENIG et al., 2014).

It is suggested that the lower abundance of TF due to the pathway of hepcidin, determines an increase in the abundance of CP. This is important for the maintenance of iron physiology and immunological tolerance. The changes in the immune status of the endometrium at day 5 post ovulation observed in this study, could indicate a mechanism of preparation of the endometrium for embryonic development (HANSEN, 2011).

The less abundance of ALB isoform in Inseminated group than in Cyclic group, is therefore a metabolic response of the changes in reproductive status. Briefly, as a result of the APR, the demand for amino acids for the synthesis of positive APPs increases significantly, causing low regulation in the synthesis of normal blood proteins, like transthyretin (formerly called prealbumin), retinol binding protein (RBP), cortisol binding globulin, TF and ALB, which represent negative APPs (GRUYS et al., 2005; JACOBSEN, 2007). Probably, and similar to humans and pigs, the modulation of ALB abundance observed in this study would have a negative feedback with α -fetoprotein (AFP), highly expressed by the conceptus during early equine gestation (STONE, 1981; SIMPSON et al., 2000). AFP is a glycoprotein detected in different animal species including equines, which has been shown to be a good indicator of fetal well-being in human medicine for decades (VINCZE et al., 2015). Although it is unlikely that

ALB, the main negative APP in horses and other animal species (ALLEN; KOLD, 1988), has a relevant role in the maternal recognition of gestation in the mare, the reduction in serum albumin levels, may, as in pigs, serve as a marker of a specific biochemical process related to the development of the fetus (STONE, 1981; STONE; CHRISTENSON, 1982)

The interaction between the cells and molecules of the maternal immune system with the equine conceptus during its presence in the oviduct would generate the adaptations in the uterine environment observed in the present study, that are necessary for early embryonic development.

In conclusion, the identified proteins in this study were related to iron metabolism and immunological tolerance, suggesting that changes in their abundance in the 5th day after ovulation are probably a signaling mechanism of the equine conceptus to the maternal immune system for its immunological recognition. Probably changes in abundance of CP, ALB and TF represent a mechanism of endometrial preparation for the maternal recognition, attachment and development of a potential equine conceptus.

The differences of the proteomic profile from the endometrium of cyclic and inseminated mares five days after ovulation, revealed a possible signaling between the conceptus in the oviduct with the uterus. This contributes to the understanding of the processes associated with conceptus-endometrium interaction during the MRP in the mare. Although our knowledge of the maternal-embryonic relationship is better now, many important questions remain unsolved and the recognition of gestation in equine continues to be an enigma today.

Acknowledgments

We are grateful to the Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) for providing the facilities for the conduction of the experiments. The authors also acknowledge the financial support by the following Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) and Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI). We are also grateful to the Uruguayan agency: Agencia Nacional de Investigación e Inovación (ANII).

Conflict of interest

None of the authors has any conflict of interest to declare.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diferença na abundância das proteínas entre as éguas cíclicas e inseminadas no 5º dia de pós-ovulação deste estudo, demonstrou alterações proteicas necessárias no ambiente uterino antes da entrada do conceito no útero. As proteínas envolvidas na resposta imunológica e no metabolismo do ferro, apresentam significativas alterações na sua abundância durante a prenhez inicial, provavelmente como rota de sinalização do embrião dentro do ambiente ovidutal para o útero e como um mecanismo de preparação endometrial para a implantação e desenvolvimento de um potencial embrião equino. Os resultados contribuem na compreensão dos processos associados às interações materno-embriônicas durante o período de reconhecimento materno da prenhez na égua.

A análise proteômica do fluido uterino revelou diferenças no perfil proteico do líquido uterino coletado no dia 5 pós-ovulação e pode continuar auxiliando nos estudos de identificação de proteínas envolvidas no diálogo contínuo do endométrio materno e do embrião equino.

REFERENCIAS

- ABABNEH, M.; ABABNEH, H.; SHIDAIFAT, F. Expression of cytosolic phospholipase A2 in equine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, n.2, p.268-274, 2011.
- ABABNEH, M.; TROEDSSON, M. Endometrial phospholipase A2 activity during the oestrous cycle and early pregnancy in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, n.1, p.46-52, 2012.
- ALLEN, W. R. The Physiology of Early Pregnancy in the Mare. In: American Association of Equine Practitioners. **AAEP Proceedings**, v. 46, p. 338-354, 2000.
- ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 513-52, 2001.
- ALLEN, W. R. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.2, n.4, p.209-223, 2005.
- ALLEN, B. V.; KOLD, S. E. Fibrinogen response to surgical tissue trauma in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.20, n.6, p.441-443, 1988.
- ATLI, M. O.; KURAR, E.; KAYIS, S. A.; ASLAN, S.; SEMACAN, A.; CELIK, S.; GUZELOGLU, A. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v.122, n.1-2, p.124-132, 2010.
- BASTOS, H. B. A.; MARTINEZ, M.N.; CAMOZZATO, G.C.; ESTRADÉ, M.J.; BARROS, E.; VITAL, C.E.; VIDIGAL, P.M.P.; MEIKLE, A.; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224–235, 2019.
- BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIENI, F.; TAINURIER, D.; BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, p. 60-62, 1998.
- BAUERSACHS, S.; WOLF, E. Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. **Animal Reproduction Science**, v.14, n.1-2, p. 84-94, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 2, n. 1–2, p. 248-254, 1976.
- BAZER, F. W.; WU, G.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment and

maintenance of pregnancy in mammals. **Molecular Human Reproduction**, v.16, n.3, p. 135-152, 2009.

BAZER, F. W.; WU, G.; JOHNSON, G. A.; KIM, J.; SONG, G. Uterine Histotroph and Conceptus Development: Select Nutrients and Secreted Phosphoprotein 1 Affect Mechanistic Target of Rapamycin Cell Signaling in Ewes. **Biology of Reproduction**, v.85, n.6, p. 1094-1107, 2011.

BEIER-HELLWIG, K.; KRENER, H.; BONN, B.; LINDER, D.; BADER, H.; BEIER, H. M. Partial sequencing and identification of three proteins from equine uterine secretion regulated by progesterone. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 30, p. 295-298, 1995.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 691-702, 2000.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P. F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy**, v. 135, p. 191-209, 1982.

BOERBOOM, D.; BROWN, K. A.; VAILLANCOURT, D.; POITRAS, P.; GOFF, A. K.; WATANABE, K.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Expression of Key Prostaglandin Synthases in Equine Endometrium During Late Diestrus and Early Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 391–399, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 2, n. 1–2, p. 248-254, 1976.

BUDIK, S. LUSSY, H.; AURICH, C. Quantification of different type I interferon transcripts in equine embryos at days 10 to 16 of gestation. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1–2, p. 307–308, 2010.

BURROWS, S.; PEKALA, B. Serum copper and ceruloplasmin in pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 109, n. 6, p. 907–909, 1971.

CAMOZZATO, G. C.; MARTINEZ, M. N.; BASTOS, H. B. A.; FIALA-RECHSTEINER, S.; MEIKLE, A.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 123, p. 1–10, 2019.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327- 1333, 2004.

CARSON, D. D.; BAGCHI, I.; DEY, S. K.; ENDERS, A. C.; FAZLEABAS, A. T. LESSEY, B.A.; YOSHINAGA, K. Embryo implantation. **Developmental Biology**, v. 223, n. 2, p. 217- 237, 2000.

CICCARELLI, M.; WAQAS, M. S.; PRU, J. K.; TIBARY, A. Oxytocin is not involved in luteolysis and early maternal recognition of pregnancy (MRP) in alpacas. **Animal Reproduction Science**, v. 187, p. 28- 36, 2017.

COCHET, M.; VAIMAN, D.; LEFÈVRE, F. Novel interferon delta genes in mammals: Cloning of one gene from the sheep, two genes expressed by the horse conceptus and discovery of related sequences in several taxa by genomic database screening. **Gene**, v. 433, n. 1-2, p. 88- 99, 2009.

CROSSETT, B.; SUIRE, S.; HERRLER, A.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. **Biology of reproduction**, v. 59, n. 3, p. 483-490, 1998.

DE RUIJTER-VILLANI, M.; STOUT, T. The Role of Conceptus-maternal Signalling in the Acquisition of Uterine Receptivity to Implantation in Mammals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n.S3, p. 7- 14, 2015.

DE RUIJTER-VILLANI, M.; VAN TOL, H. T. A.; STOUT, T. A. E. Effect of pregnancy on endometrial expression of luteolytic pathway components in the mare. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 5, p. 834 - 845, 2015.

DEFRANCO, D. B. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 16, n. 7, p. 1449 - 1455, 2002.

DĘBSKI, B.; NOWICKI, T.; ZALEWSKI, W.; OCHOTA, M.; MROWIEC, J.; TWARDOŃ, J. Evaluation of Acute Phase Proteins in Clinically Healthy Dairy Cows in Perinatal Period and during Lactation. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 3, p. 519 - 523, 2016.

DZUIK, P.J; POLGE, E.J. C; ROWSON, L.F.A. Intrauterine migration and mixing of embryos in swine following egg transfer. **Journal of Animal Science**, v. 23, p. 37–40, 1964.

EALY, A. D.; EROH, M. L.; SHARP, D. C. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explant culture. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1–2, p. 99–105, 2010.

ECKERSALL, P.D., HARVEY, M.J.A., FERGUSON, J.M., RENTON, J.P., NICKSON, D.A., BOYD, J.S. Acute phase proteins in canine pregnancy (Canis familiaris). **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 47, p. 159-164, 1993.

EL-BAZ, F.; MOWAFY, M. E.; LOTFY, A. Study of serum copper and ceruloplasmin levels in Egyptian autistic children. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**. v. 19 n. 2, p. 113 - 116, 2018.

ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, S.; LAGERCRANTZ, J.; FRIED, G.; NORDENSKJÖLD, M.; GUSTAFSSON, J.A. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 12, p.4258 -4265,1997.

FLOOD, P.F; JONG, A; BETTERIDGE, K.J. The location of eggs retained in the oviducts of mares. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 57, p.291-294, 1979.

FLOWER, D. R.; NORTH, A. C. T.; ATTWOOD, T. K. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. **Protein Science**, v. 2, n. 5, p. 753-761, 1993.

GEBHARDT, S.; MERKL, M.; HERBACH, N.; WANKE, R.; HANDLER, J.; BAUERSACHS, S. Exploration of Global Gene Expression Changes During the Estrous Cycle in Equine Endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 6, p.1 -13, 2012.

GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MOFFATT, R. J.; BLAIR, R. M.; YELLIN, T. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 40, p.293-305,1990.

GINTHER, O. J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. S3, p. 41–47, 1985.

GINTHER, O.J. Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in the Mare. Equiservices, Cross Plains, p. 176, 1986.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare. **Basic and applied aspects**. Ed. Ginther OJ. Equiservices. 2nd ed. Winsconsin, 1992.

GINTHER, O. J.; RODRIGUES, B. L. ; FERREIRA, J. C.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂alpha (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, n. 6, p. 684-693, 2008.

GINTHER, O. J. A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. **Theriogenology**, v. 72, n. 5, p. 591-598, 2009.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A. Dynamics of Circulating Progesterone Concentrations Before and During Luteolysis: A Comparison Between Cattle and Horses. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 6, p. 1–12, 2012a.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A. The hour of transition into luteolysis in horses and

cattle: A species comparison. **Theriogenology**, v. 77, p.1731-1740, 2012b.

GINTHER, O.J; HANNAN, M.A; BEG, M.A. Luteolysis and associated interrelationships among circulating PGF₂, progesterone, LH, and estradiol in mares. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41, p. 174-184, 2011.

GODKIN, J. D; BAZER, F.W; SESSION, F; ROBERTS, R. M. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at days 13-21. **Journal of reproduction and fertility**, v.71, p.57-64, 1982.

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

GOFF, A. K.; PONTBRIAND, D.; SIROIS, J. Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13,14-dihydro prostaglandin F-2 alpha during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 253–260, 1987.

GRAY, C. A; ABBEY, C.A; BEREMAND, P. D; CHOI, Y; FARMER, J. L; ADELSON D.L; THOMAS, T. L; BAZER, F. W; SPENCER, T. E. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon-tau in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v.74, p.383-394, 2006.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University. Science. B; : Biomedicine & Biotechnology**, v. 6, n. 11, p.1045 -1056, 2005.

GUIDA, C.; ALTAMURA, S.; KLEIN, F. A.; GALY, B.; BOUTROS, M.; ULMER, A. J. HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U. A novel inflammatory pathway mediating rapid hepcidin-independent hypoferremia. **Blood**, v.125, n. 14, p.2265 -2275, 2015.

HANSEN, P. J. The Immunology of Early Pregnancy in Farm Animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 3, p. 18–30, 2011.

HARTT, L. S.; CARLING, S. J.; JOYCE, M. M.; JOHNSON, G. A.; VANDERWALL, D. K.; OTT, T. L. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v.130, n.2, p.241 -250, 2005.

HAYES, M. A.; QUINN, B. A.; LILLIE, B. N.; CÔTÉ, O.; BIENZLE, D.; WAELCHLI, R. O.; BETTERIDGE, K. J. Changes in various endometrial proteins during cloprostenol-induced failure of early pregnancy in mares. **Animal Reproduction Science**, v.9, n.4, p.723 -741, 2012.

HOFFMANN, C.; BAZER, F. W.; KLUG, J.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H. A. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium Expression patterns for

mares suffering from endometriosis. **Theriogenology**, v. 71, n. 2, p. 264-74, 2009.

HONNENS, A.; WEISSER, S.; WELTER, H.; EINSPANIER, R.; BOLLWEIN, H. Relationships Between Uterine Blood Flow, Peripheral Sex Steroids, Expression of Endometrial Estrogen Receptors and Nitric Oxide Synthases During the Estrous Cycle in Mares. **Journal of Reproduction and Development**, v.57, n.1, p.43 -48, 2011.

KEITH, L.; BALL, B. A.; SCOGGIN, K.; ESTELLER-VICO, A.; WOODWARD, E. M.

TROEDSSON, M. H.T.; SQUIRES, E. L. Diestrus administration of oxytocin prolongs luteal maintenance and reduces plasma PGFM concentrations and endometrial COX-2 expression in mares. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 616–624, 2013.

JACOBSEN, S. Review of Equine Acute-Phase Proteins. **Equine Veterinary Education**, v. 53, p. 230–235, 2007.

JALALI, B. M.; BOGACKI, M.; DIETRICH, M.; LIKSZO, P.; WASIELAK, M. Proteomic analysis of porcine endometrial tissue during peri-implantation period reveals altered protein abundance. **Journal of Proteomics**, v.1, n.125, p.76 - 88, 2015.

KEENAN, L.R.; FORDE, D.; MCGREADY, T.; QUINN, P.J; ROCHE, J. F. Ultrastructure of the endometrium of mares in anoestrus, oestrus, dioestrus and early pregnancy. **Journal of Reproduction Fertility**, Suppl 44, p. 695-696, 1991.

KELLER, A.; NESVIZHSKII, A. I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS / MS and Database Search. **Analytical chemistry**, v. 74, n. 20, p. 5383–5392, 2002.

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. *In*: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders company. 2nd ed., Cap.8, 1986. p.723-729,1986.

KLEIN, C. Pregnancy Recognition and Implantation of the Conceptus in the Mare, chapter 9 in: GEISERT, R. D.; BAZER, F. W. **Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals**. Springer, Switzerland, p. 165-187, 2015a.

KLEIN, C. Novel equine conceptus-endometrial interactions on Day 16 of pregnancy based on RNA sequencing. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, n. 11, p. 1712–1720, 2015b.

KLEIN, C. Early pregnancy in the mare: old concepts revisited. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 56, p. 212–217, 2016.

- KLEIN, C.; SCOGGIN, K. E.; EALY, A. D.; TROEDSSON, M. H.T.
Transcriptional Profiling of Equine Endometrium During the Time of Maternal Recognition of Pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 102–113, 2010.
- KLEIN, C.; TROEDSSON, M. H. T. Maternal recognition of pregnancy in the horse: A mystery still to be solved. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 952–963, 2011.
- KOCH, J. M.; RAMADOSS, J.; MAGNESS, R. R. Proteomic profile of uterine luminal fluid from early pregnant ewes. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 3878–3885, 2010.
- KOENIG, M. D.; TUSSING-HUMPHREYS, L.; DAY, J.; CADWELL, B.; NEMETH, E. Hepcidin and iron homeostasis during pregnancy. **Nutrients**, v.6, n. 8, p. 3062–3083, 2014.
- LI, X.; RHEE, D. K.; MALHOTRA, R.; MAYEUR, C.; HURST, L. A.; AGER, E.; SHELTON, G.; KRAMER, Y.; MCCULLOH, D.; KEEFE, D.; BLOCH, K. D. BLOCH, D. B; PETERSON, R. T. Progesterone receptor membrane component-1 regulates hepcidin biosynthesis. **Journal of Clinical Investigation**, v.126, n. 1, p. 389–401, 2016.
- LUBAHN, D. B.; MOYER, J. S.; GOLDING, T. S.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S.; SMITHIES, O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, n. 23, p. 11162–11166, 1993.
- MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MEIRELLES, L. S.; GELPI MATTOS, A. L.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 17, n. 6, p. 565–569, 2001.
- MALSCHITZKY, E., FIALA, S. M. E; ESMERALDINO, A. M. T.; NEVES, A. P.; GARBADE, P.; JOBIM, M.I .M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion. **Pferdeheilkunde**, v. 24, n. 1, p. 74–78, 2008.
- MATSUZAKI, S.; FUKAYA, T.; SUZUKI, T.; MURAKAMI, T.; SASANO, H.; YAJIMA, A. Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**, v.5, n. 6, p. 559–564, 1999.
- MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263–324, 1999.
- MERKL, M.; ULBRICH, S.E.; OTZDORFF, C.; HERBACH, N.; WANKE, R.; WOLF, E.; HANDLER, J.; BAUERSACHS, S. Microarray Analysis of Equine

Endometrium at Days 8 and 12 of Pregnancy¹. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 5, p. 874–886, 2010.

MOOR, R. M. Effect of embryos on corpus luteum function. **Journal of Animal Science**. Supplement. v. 1, p. 97–118, 1968.

MOTE, P. A.; ARNETT-MANSFIEL, R. L.; GAVA, N.; DEFAZIO, A.; MULAC JERICEVIC, B.; CONNEELY, O.M.; CLARKE, C. L. Overlapping and distinct expression of progesterone receptors A and B in mouse uterus and mammary gland during the estrous cycle. **Endocrinology**, v, 137, n. 12, p. 5503–5512, 2006.

MULAC-JERICEVIC, B.; MULLINAX, R. A.; DEMAYO, F. J.; LYDON, J. P.; CONNEELY, O. M. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. **Science**, 2000. v. 289, n. 5485 p. 1751–1754, 2000.

MULAC-JERICEVIC, B.; LYDON, J. P.; DEMAYO, F. J.; CONNEELY, O. M. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n. 17, p. 9744–9749, 2003.

MULLEN, M. P.; ELIA, G.; HILLIARD, M.; PARR, M. H.; DISKIN, M.G.; EVANS, A. C.O.; CROWE, M. A. Proteomic characterization of histotroph during the preimplantation phase of the estrous cycle in cattle. **Journal of Proteome Research**, v.11, n.5, p. 3004-3018, 2012.

NAGLE, C. A.; MENDIZÁBAL, A. F.; LAHOZ, M. M.; PORTA, M. M.; TORRES, M. I. Transfer pathways between the ovaries and the uterus in the cebus monkeys (*Cebus apella*). **General and Comparative Endocrinology**, v.144, n.3, p. 248-256, 2005.

NESVIZHSKII, A. I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.75, n.17, p. 4646-4658, 2003.

OZEL C., GUZELOGLU A., HITIT M., ATLI M. O., KURAR E., K. S. A. 111 Expression of phospholipase a2 isoforms in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 148, 2014.

RAHEEM, K. A. An insight into maternal recognition of pregnancy in mammalian species. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 16, n.1, p. 1-6, 2017.

RAMBAGS, B. P.; VAN TOL, H. T.; VAN DEN ENG, M. M.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T. A. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptus. **Theriogenology**, v. 69, n. 3, p. 366-75, 2008.

RIERA, F. L. Equine embryo transfer *In*: SAMPER, J. C. **Equine breeding**

management and artificial insemination. 2 ed. Elsevier Health Sciences, 2009, p. 185-199.

ROMERO, R.; GOTSCH, F.; PINELES, BETH.; KUSANOVIC, J. P. Inflammation in Pregnancy: Its Roles in Reproductive Physiology, Obstetrical Complications, and Fetal Injury. **Nutrition Reviews**, v. 65, n.3, p. S194-202, 2007.

SANGKHAE, V.; NEMETH, E. Placental iron transport: the mechanism and regulatory circuits. **Free Radical Biology and Medicine**, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584918311808>. Acesso em: 07 dez. 2018.

SHARP, D. C. The early fetal life of the equine conceptus. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 679-689, 2000.

SHARP, D. C; THATCHER, M.J; SALUTE, M.E; FUCHS, A.R. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares. **Journal of reproduction and fertility**, v. 109, n. 1, p. 137-144, 1997.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J.V; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SHORT, R. V. Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In: **Ciba foundation symposium on foetal autonomy** (Eds Wolstenholme, G.E. W, O'Connor, M.) Churchill: London, 1969, p. 2–26.

SIMPSON, K.; ADAMS, M. H.; BEHRENDT-ADAM, C.Y.; BAKER, C.B.; MCDOWELL, K.J. Differential gene expression in day 12 and day 15 equine conceptuses. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 56, p. 539–47, 2000.

SKARŻYŃSKA, E.; ZBOROWSKA, H.; JAKIMIUK, A. J.; KARLIŃSKA, M.; LISOWSKA-MYJAK, B. Variations in serum concentrations of C-reactive protein, ceruloplasmin, lactoferrin and myeloperoxidase and their interactions during normal human pregnancy and postpartum period. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 46, p. 83–87, 2018.

SLAYDEN, O. D.; KEATOR, C. S. Role of progesterone in nonhuman primate implantation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 25, n.6, p. 418-430, 2007.

SMITS, K.; NELIS, H.; VAN STEENDAM, K.; GOVAERE, J.; ROELS, K.; VERVERS, C.; LEEMANS, B.; WYDOOGHE, E.; DEFORCE, D.; VAN SOOM, A. Proteome of equine oviducal fluid: Effects of ovulation and pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n.6, p. 1085-1095, 2016.

SMITS, K; WILLEMS, S; VAN STEENDAM, K; VAN DE VELDE, M; DE LANGE, V; VERVERS, C; ROELS,K; GOVAERE, J; VAN NIEUWERBURGH,F;

PEELMAN, L.; DEFORCE, D.; VAN SOOM, A. Proteins involved in embryo-maternal interaction around the signalling of maternal recognition of pregnancy in the horse. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-14, 2018.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 65-78, 2007.

STARBUCK, G. R.; STOUT, T. A.; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R.; FLINT, A. P. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 173-179, 1998.

STEWART, F.; CHARLESTON, B.; CROSSETT, B.; BARKER, P. J.; ALLEN, W. R. A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. **Journal of reproduction and fertility**, v. 105, p. 65-70, 1995.

STONE, R. T. In vitro Liver Synthesis and Serum Levels of Alpha Fetoprotein and Albumin in the Fetal Pig. **Biology of Reproduction**, v. 24, n. 3, p. 573-580, 1981.

STONE, R. T.; CHRISTENSON, R. K. The relationship of fetal weight to serum albumin and alpha-fetoprotein in swine. **Journal of animal science**, v. 55, n. 4, p. 818-825, 1982.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Oestrogens and pregnancy maintenance in the mare: For or against? **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, 2001.

STOUT, T. A.; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R. Oxytocin administration prolongs luteal function in cyclic mares. **Journal of reproduction and fertility**, v. 116, n. 2, p. 315-320, 1999.

SUIRE, S.; STEWART, F.; BEAUCHAMP, J.; KENNEDY, M. W. Uterocalin, a lipocalin provisioning the preattachment equine conceptus: fatty acid and retinol binding properties, and structural characterization. **Biochem Journal**, v. 3, n. 56, p. 369-376, 2001.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, KRISTOFFER HELLER, D.; HUERTA-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K. P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, LARS J.; VON MERING, C. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 447-452, 2015.

VAN NIEKERK, C. H., GERNEKE, W. H. Persistence and parthenogenetic cleavage of tubal ova in the mare. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v.33, p.195-232, 1966.

VAN TILBURG, M. F.; RODRIGUES, M. A. M.; MOREIRA, R. A.; MORENO, F. B.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.O.; CÂNDIDO, M. J.D.; MOURA, A. A.

Membrane-associated proteins of ejaculated sperm from Morada Nova rams. **Theriogenology**, v. 79, n. 9, p. 1247–1261, 2013.

VANDERWALL, D. K. Early embryonic loss in the mare. **Journal Equine Veterinary Science**, v, 28, p. 691-702, 2008.

VANDERWALL, D. K.; SILVIA, W. J.; FITZGERALD, B. P. Concentrations of oxytocin in the intercavernous sinus of mares during luteolysis: temporal relationship with concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α . **Journal of reproduction and fertility**, 1998.

VANDERWALL, D. K.; RASMUSSEN, D. M.; CARNAHAN, K. G.; DAVIS, T. L. Effect of Administration of Oxytocin During Diestrus on Corpus Luteum Function and Endometrial Oxytocin Receptor Concentration in Cycling Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2012.

VANDERWALL, D. K.; PARKINSON, K. C.; RIGAS, J. How to Use Oxytocin Treatment to Prolong Corpus Luteum Function for Suppressing Estrus in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2016.

VANDERWALL, D. K.; RASMUSSEN, D. M.; WOODS, G. L. Effect of repeated administration of oxytocin during diestrus on duration of function of corpora lutea in mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 2007.

VANNUCCHI, C. I.; MIRANDOLA, R. M.; OLIVEIRA, C. M. Acute-phase protein profile during gestation and diestrus: Proposal for an early pregnancy test in bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 74, n. 1-2, p. 87-99, 2002.

VINCZE, B.; GÁSPÁRDY, A.; KULCSÁR, M.; BASKA, F.; BÁLINT, Á.; HEGEDUS, G. T.; SZENCI, O. Equine alpha-fetoprotein levels in Lipizzaner mares with normal pregnancies and with pregnancy loss. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1581-1586, 2015.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.. Prostaglandin E2-specific binding to the equine oviduct. **Prostaglandins**, 1992.

WEBER, J. A.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. **Biology of reproduction**, v. 45, p. 540–543, 1991a.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos. **Biology of reproduction**, v. 45, p. 544–546, 1991b.

WEBER, J. A., WOODS, G. L., LICHTENWALNER, A. B. Relaxatory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from the equine oviductal isthmus. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 125-130, 1995.

WEIHUA, Z.; SAJI, S.; MAKINEN, S.; CHENG, G.; JENSEN, E. V.; WARNER,

M.; GUSTAFSSON, J.-A.. Estrogen receptor (ER) beta , a modulator of ERalpha in the uterus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v, 97, n. 11, p. 5936-5941, 2000.

WILLIS, E. L.; KERSEY, D. C.; DURRANT, B. S.; KOUBA, A. J. The acute phase protein ceruloplasmin as a non-invasive marker of pseudopregnancy, pregnancy, and pregnancy loss in the giant panda. **PLoS One**. v. 6, n. 7, e21159, 2011.

WILSHER, S.; CLUTTON-BROCK, A.; ALLEN, W. R. Successful transfer of day 10 horse embryos: Influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. **Reproduction**, v. 139, n. 3, p. 575–585, 2010.

WISDOM, S. J.; WILSON, R.; MCKILLOP, J. H.; WALKER, J. J. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 165, n. 6, p. 1701–1704, 1991.

ZAVY, M. T.; SHARP, D. C.; BAZER, F. W.; FAZLEABAS, A.; SESSIONS, F.; ROBERTS, R. M. Identification of stage-specific and hormonally induced polypeptides in the uterine protein secretions of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 64, n. 1, p. 199-207, 1982.

APENDICE A- Classificação funcional das proteínas identificadas pelo Gene Ontology

Access number	Protein names	Gene names	Gene ontology (biological process)	Gene ontology (molecular function)	Gene ontology (cellular component)
H9GZT5	Uncharacterized protein		B cell receptor signaling pathway [GO:0050853]; complement activation, classical pathway [GO:0006958]; defense response to bacterium [GO:0042742]; innate immune response [GO:0045087]; phagocytosis, engulfment [GO:0006911]; phagocytosis, recognition [GO:0006910]; positive regulation of B cell activation [GO:0050871]	antigen binding [GO:0003823]; immunoglobulin receptor binding [GO:0034987]	blood microparticle [GO:0072562]; external side of plasma membrane [GO:0009897]; immunoglobulin complex, circulating [GO:0042571]
P27425	Serotransferrin	TF	cellular iron ion homeostasis [GO:0006879]	ferric iron binding [GO:0008199]; ferric iron transmembrane transporter activity [GO:0015091]	cell [GO:0005623]; extracellular space [GO:0005615]
F7BAY6	Serum albumin	ALB	cellular response to starvation [GO:0009267]; hemolysis by symbiont of host erythrocytes [GO:0019836]; maintenance of mitochondrion location [GO:0051659]; negative regulation of apoptotic process [GO:0043066]; retina homeostasis [GO:0001895]; transport [GO:0006810]	chaperone binding [GO:0051087]; DNA binding [GO:0003677]; drug binding [GO:0008144]; fatty acid binding [GO:0005504]; identical protein binding [GO:0042802]; oxygen binding [GO:0019825]; pyridoxal phosphate binding [GO:0030170]; toxic substance binding [GO:0015643]	blood microparticle [GO:0072562]; endoplasmic reticulum [GO:0005783]; extracellular exosome [GO:0070062]; Golgi apparatus [GO:0005794]; myelin sheath [GO:0043209]; nucleus [GO:0005634]; protein complex [GO:0043234]
F6PQ46	Ceruloplasmin	CP	cellular iron ion homeostasis [GO:0006879]; copper ion transport [GO:0006825]	chaperone binding [GO:0051087]; copper ion binding [GO:0005507]; ferroxidase activity [GO:0004322]	blood microparticle [GO:0072562]; extracellular exosome [GO:0070062]; lysosomal membrane [GO:0005765]

APENDICE B- Representações esquemáticas das vias metabólicas pelo *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* –KEGG

Vias e mapas foram recuperados usando o aplicativo *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), onde as proteínas apresentaram algumas associações. A proteína serotransferrina (P27425) apresentou associação com a via de exportação de proteínas – ID: ecb03060 (Figura 1). A proteína Serum albumin (F7BAY6) apresentou associação com a via de síntese e transporte dos hormônios T3 e T4, produzidos pela glândula tireóide – ID: ecb04918 (Figura 02). A proteína Ceruloplasmin (F6PQ46) apresentou associação com as vias de metabolismo de clorofila e porfirina ID: ecb00860 (Figura 3) e ferroptose ID: ecb04216 (Figura 4).

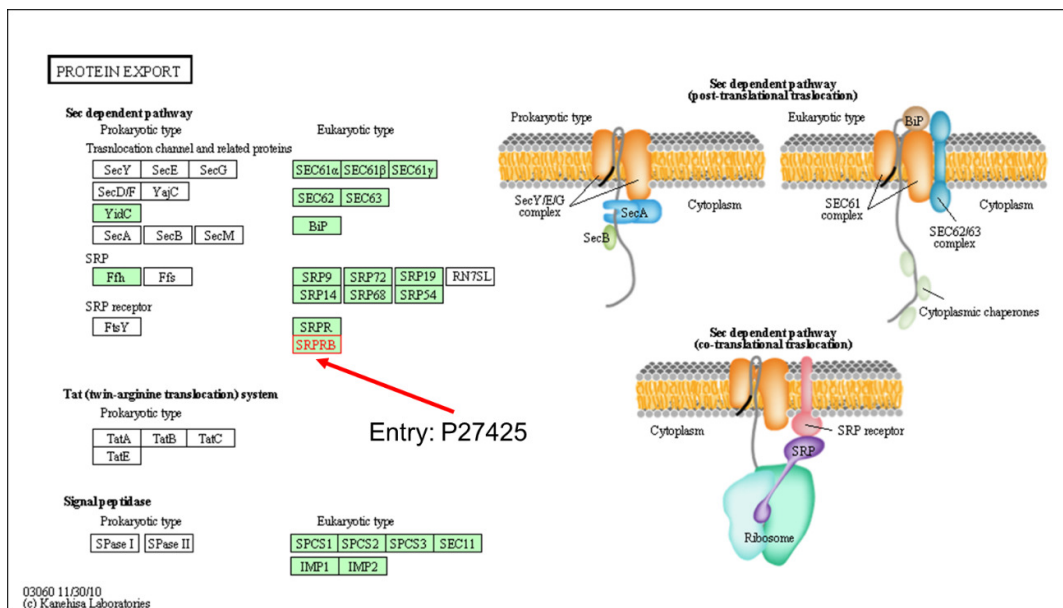


Figura 1. Representação esquemática da via de exportação de proteínas [ecb03060], com o envolvimento da proteína Serotransferrin (P27425). Fonte: KEGG.

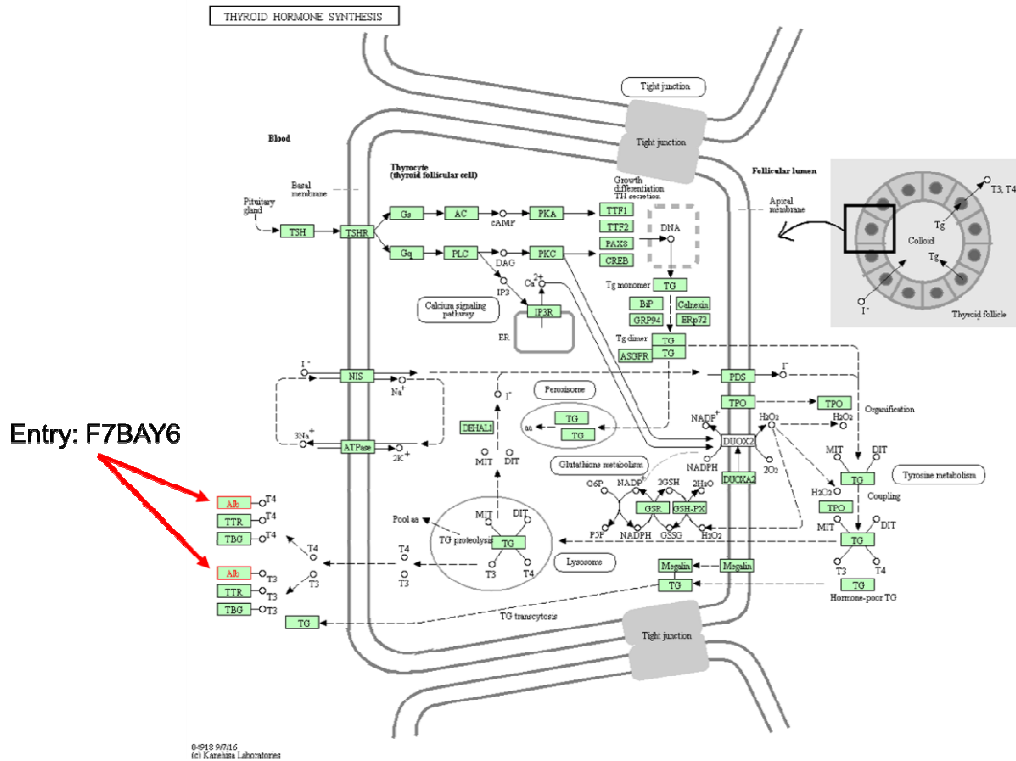


Figura 2. Representação esquemática da via de produção e transporte dos hormônios T3 e T4 sintetizados na glândula tireóide [ecb04918], com o envolvimento da proteína Serum albumin (F7BAY6). Fonte: KEGG.

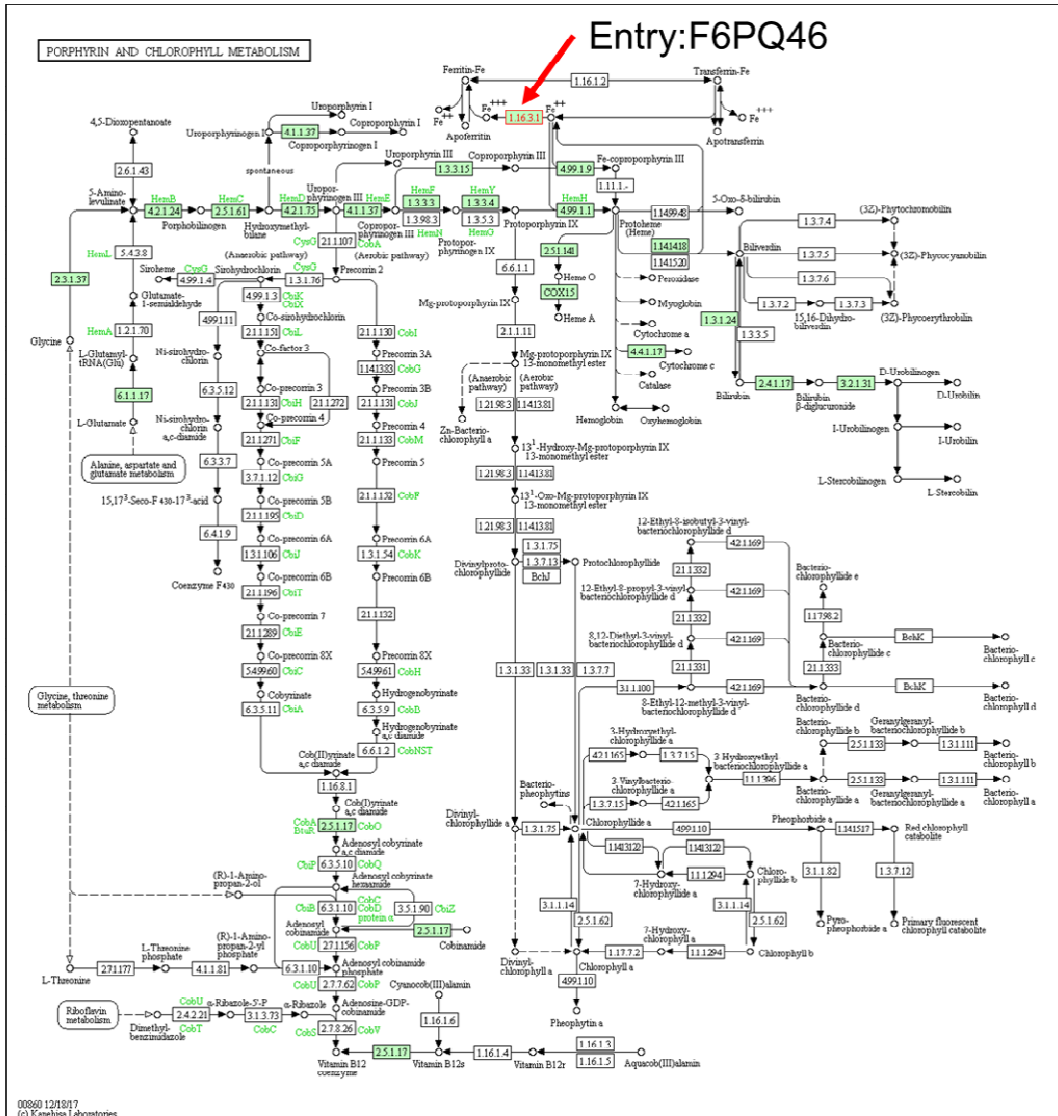


Figura 3. Representação esquemática da via de metabolismo de clorofila e porfirina [ecb00860], com o envolvimento da proteína Ceruloplasmin (F6PQ46). Fonte: KEGG.

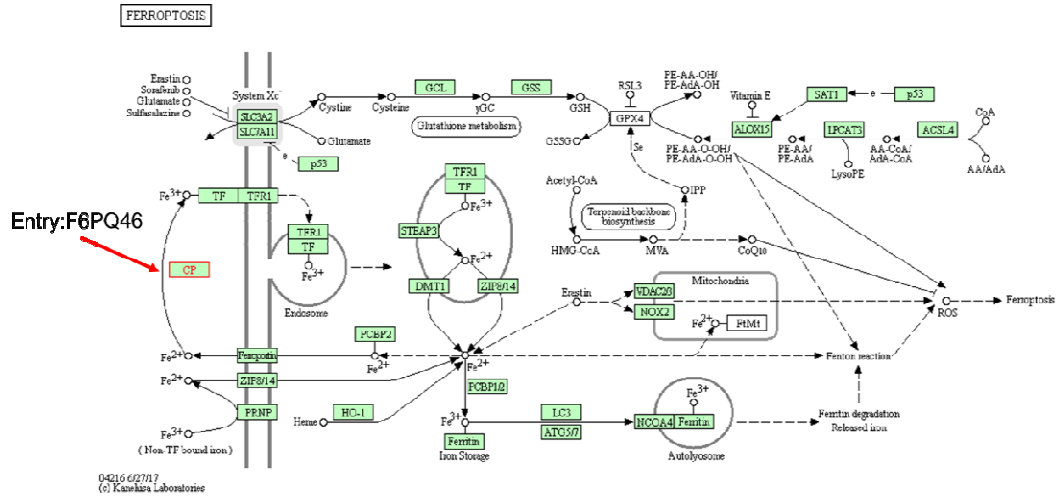


Figura 4. Representação esquemática da via de ferroptose [ecb04216], com o envolvimento da proteína Ceruloplasmin (F6PQ46). Fonte: KEGG.