

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE VIAS RELACIONADAS A
DILATAÇÃO CERVICAL DE OVELHAS**

Joedson Dantas Gonçalves
Médico Veterinário

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE VIAS RELACIONADAS A
DILATAÇÃO CERVICAL DE OVELHAS**

**Discente: Joedson Dantas Gonçalves
Orientadora: Dra. Maria Emilia Franco Oliveira
Coorientador: Dr. Ricardo Perecin Nocitti**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área: Reprodução Animal.

2022

G635i Gonçalves, Joedson Dantas
Identificação de vias relacionadas a dilatação cervical de ovelhas /
Joedson Dantas Gonçalves. -- Jaboticabal, 2022
62 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Maria Emilia Franco Oliveira
Coorientador: Ricardo Perecin Nocitti

1. Transcriptoma. 2. Cérvix. 3. Reprodução. 4. Ruminantes. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



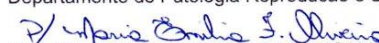
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO DE VIAS RELACIONADAS A DILATAÇÃO CERVICAL DE OVELHAS

AUTOR: JOEDSON DANTAS GONÇALVES
ORIENTADORA: MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA
COORDENADOR: RICARDO PERECIN NOCITI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:


Prof.ª. Dra. MARIA EMILIA FRANCO OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal


Prof. Dr. JULIANO RODRIGUES SANGALLI (Participação Virtual)
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / Universidade de São Paulo - USP


Prof.ª. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / FMVA / UNESP - Araçatuba/SP

Jaboticabal, 24 de fevereiro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Joedson Dantas Gonçalves, nascido na cidade de Filadélfia, Bahia - Brasil, em 16 de Janeiro de 1996. Técnico Agrícola com Habilitação em Agropecuária pela Instituto Federal de Ciência e Tecnologia Baiano em 2014. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Vale do São Francisco, *campus* Ciências Agrárias em Petrolina, Pernambuco em 2020. Foi bolsista CNPq no programa de Iniciação Científica entre 2016-2017. Monitor de Patologia Veterinária Especial em 2018. Presidente da Liga Acadêmica de Buiatria do Vale do São Francisco em 2019. Participou de projetos de extensão na mesma Universidade. Realizou estágio curricular na área de Reprodução Animal na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, sob orientação do pesquisador Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca. Em 2020, ingressou no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, pela UNESP – Câmpus de Jaboticabal, como bolsista Capes, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Emilia Franco Oliveira e coorientação do Prof. Dr. Ricardo Perecin Nocitti.

“Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina”

Cora Carolina

Dedico

Aos meus familiares por tudo que fizeram e tem
feito para que eu possa alcançar meus sonhos.
Em especial à minha mãe, Dolores Gomes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre ser guia nos meus caminhos e não me deixar desamparado nos momentos mais difíceis.

À minha mãe Dolores por sempre acreditar em mim e nunca medir esforços para que eu realizasse meus sonhos. Essa é mais uma conquista que divido com muito orgulho.

À minha tia Cléia, pelo amor e incentivo em todas as fases da minha vida. Essa conquista é nossa!

Aos meus primos Felipe, Emilly e Isabella por todo entusiasmo nas vezes que eu voltava pra casa.

Aos meus irmãos, Adilla, Júnior, Lauane, Gabriel e Vitória. Obrigado por sempre estarem na torcida por mim.

Ao meu pai Josean, meu tio Quebinho e meu avô Joel. Obrigado por todo apoio e incentivo, vocês foram essenciais nessa jornada.

À minha mãe Luciene, pelo amor, carinho e incentivo. Essa conquista também é da senhora.

À minha madrastra Suely, meus cunhados/tios Luciano e Andrea. Obrigado por todo apoio.

Aos professores que tornaram possível essa conquista. À minha orientadora da graduação, Prof.^a Mabel. A senhora foi essencial para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora Prof.^a Maria Emilia por ser exemplo professora e mulher. Obrigado pela confiança. A senhora é inspiração.

Ao meu coorientador Prof.^o Ricardo pela confiança, ensinamentos e paciência no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos que a vida científica me presenteou. Gabriel, Jenniffer e Júlia. Obrigado por compartilharem comigo suas experiências.

Aos amigos que fiz na República Antro do HV. Aloizio, Vitor, Luiz, Rafael, Taiane e Priscila. Vocês foram essenciais para que essa jornada fosse menos árdua possível.

Aos meus amigos Éder, Vitória, Chaene, Moíses e Júnior por não me abandonar mesmo com a distância. Obrigado!

Ao programa de pós-graduação da FCAV/Unesp e a Capes pela bolsa concedida.

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

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Ciclo estral de Vacas.....	2
2.2 Ciclo estral de Ovelhas.....	3
2.3 Biotecnologias reprodutivas em ruminantes.....	4
2.3 Morfofisiologia cervical de Vacas e Ovelhas.....	5
2.4 Mecanismo moleculares de dilatação cervical no estro e parto.....	7
3 REFERÊNCIAS.....	9
CAPÍTULO II – IDENTIFICAÇÃO DE VIAS RELACIONADAS A DILATAÇÃO CERVICAL EM OVELHAS.....	15
RESUMO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 RESULTADOS.....	17
3 DISCUSSÃO.....	23
4 CONCLUSÃO.....	30
5 MÉTODOS.....	30
5.1 Bioinformática para obtenção e processamento dos dados.....	30
5.2 Análise de diferença de expressão e assinaturas gênicas.....	31
5.3 Análise dos resultados.....	32
6 REFERÊNCIAS.....	32
7 Material complementar.....	42

IDENTIFICAÇÃO DE VIAS RELACIONADAS A DILATAÇÃO CERVICAL EM OVELHAS

RESUMO: O presente trabalho desenvolveu uma revisão e prospecção de dados em repositório públicos e já validados. O objetivo principal é identificar as vias envolvidas na dilatação cervical, que são conservadas entre bovinos e ovinos na fase folicular e luteal do ciclo reprodutivo. Em bovinos foram encontrados 1961 genes mais expressos na fase folicular e 1560 na fase luteal. 24 genes foram considerados exclusivos, desses, 18 genes na fase folicular e 6 genes na fase luteal. Em ovinos, 4595 genes foram diferentemente expressos de um total de 19581 genes. Sendo 2126 mais expressos na fase folicular e 2469 genes mais expressos na fase luteal. 4 genes exclusivos foram encontrados na fase folicular. O *TFF1* (trefoil factor 1), é um dos genes de destaque na fase folicular de bovinos. Na fase luteal, o *TDGF1* (teratocarcinoma-derived growth factor 1) foi diferentemente expresso. Nos achados de ovinos, o *DRD2* (dopamine Receptor D2) foi diferentemente expresso na fase folicular. Na fase luteal, o *ADAM7* (ADAM metallopeptidase domain 7) foi o gene de destaque. Os genes *Hoxb* foram identificados em ambas as espécies e parecem estar correlacionados com a via PI3K/Akt, podendo modular essa via ou serem modulados. A PI3K/Akt também foi encontrada tanto em bovinos e ovinos, aparecendo em destaque na fase folicular e na fase luteal de ambas as espécies. Nossas análises têm apontado que a via PI3K/Akt e os genes *Hoxb* aparecem em destaque, podendo modular e serem modulados em mecanismos que envolvam alterações na cérvix. A PI3K/Akt parece ser uma importante via no processo de relaxamento cervical.

Palavras-chave: transcriptoma, cérvix, reprodução, ruminantes.

IDENTIFICATION OF THE PATHWAYS RELATED TO CERVICAL DILATATION IN EWES

ABSTRACT: The present study developed a review and data mining in public and already validated repository. The main objective is to identify the pathways involved in cervical dilatation, which are conserved between cattle and sheep in the follicular and luteal phases of the reproductive cycle. In cattle, 1961 genes were found to be more expressed in the follicular phase and 1560 in the luteal phase. 24 genes were considered exclusive of these, 18 genes in the follicular phase and 6 genes in the luteal phase. In sheep, 4595 genes were differently expressed from a total of 19581 genes. Being 2126 more expressed in the follicular phase and 2469 genes more expressed in the luteal phase. 4 unique genes were found in the follicular phase. *TFF1* (trefoil factor 1) is one of the prominent genes in the follicular phase of cattle. In the luteal phase, *TDGF1* (teratocarcinoma-derived growth factor 1) was differently expressed. In sheep findings, *DRD2* (dopamine Receptor D2) was differently expressed in the follicular phase. In the luteal phase, *ADAM7* (ADAM metalloproteinase domain 7) was the prominent gene. *Hoxb* genes were identified in both species and appear to be correlated with the PI3K/Akt pathway and may modulate this pathway or be modulated. PI3K/Akt was also found in both cattle and sheep, appearing prominently in the follicular and luteal phases of both species. Our analyzes have pointed out that the PI3K/Akt pathway and the *Hoxb* genes appear in prominence, being able to modulate and be modulated in mechanisms that involve alterations in the cervix. PI3K/Akt appears to be an important pathway in the cervical relaxation process.

Keywords: transcriptome, cervix, reproduction, ruminants.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é uma biotécnica de suma importância para o aumento da rentabilidade do agronegócio de pequenos ruminantes, obtendo-se animais geneticamente superiores quanto à produtividade, fertilidade e à resistência a doenças (Casali et al., 2017). Da mesma forma, a transferência de embriões tem sido amplamente implementada a fim proporcionar um rápido aumento na qualidade genética de rebanhos e em programas de conservação (Bartlewski et al., 2015). Ambas as biotécnicas seriam mais difundidas se realizadas pela via transcervical, não requerendo submeter as fêmeas a procedimentos cirúrgicos (Fonseca et al., 2019).

A anatomia da cérvix é um dos principais limitantes a transposição cervical em ovinos, devido ao número, diâmetro interno e distribuição dos anéis cervicais (Kershaw et al., 2005), mesmo com a remodelação da cérvix durante a fase de estro (Candappa e Bartlewski, 2012; Fonseca et al., 2016). O desafio é ainda maior durante a fase luteal quando a colheita de embriões é realizada (Fonseca et al., 2019). Uma série de estudos tentam desenvolver protocolos com respostas satisfatórias de relaxamento cervical, para melhor aplicação das biotécnicas reprodutivas (Fonseca et al., 2016). Na espécie ovina, têm-se utilizado vários fármacos isoladamente ou em combinações para dilatar a cérvix para inseminação artificial transcervical (Candappa e Bartlewski, 2011), ou mesmo para a colheita não cirúrgica de embriões (Fonseca et al., 2019). Entre as drogas utilizadas estão: prostaglandinas sintéticas, ocitocina, misoprostol, dinoprostona, hormônio folículo estimulante (FSH), benzoato de estradiol e relaxina (Fonseca et al., 2019; Falchi et al., 2012; Bartlewski e Candappa, 2015; Masoudi et al., 2017; Leite et al., 2018). Os resultados ainda são variáveis e indicam a necessidade de melhor entendimento dos mecanismos envolvidos a dilatação cervical.

O mecanismo de dilatação cervical em ovinos é complexo, com envolvimento de várias substâncias, proteínas, enzimas e hormônios (Fonseca et al., 2019). Em ruminantes, tanto no parto quanto no estro, o aumento da concentração de estrógeno parece iniciar uma cascata de eventos que culminam com o relaxamento cervical (Landim-Alvarenga, 2012).

O estradiol folicular leva a um aumento na concentração de receptores de ocitocina na cérvix (Falchi e Scaramuzzi, 2015). Essa ligação promove a produção de PGE₂, essa, atuará tecido conjuntivo e nas células musculares lisas, promovendo a dilatação cervical (Koets et al., 1998).

A dilatação cervical é um mecanismo natural que ocorre entre as espécies em diferentes momentos do ciclo estral ou menstrual, e diversos estudos vem buscando compreender esses processos fisiológicos envolvidos. Wagner et al. (2017) sugerem que mecanismos envolvidos na dilatação ou amadurecimento cervical, possuem divergências entre as espécies, ocorrendo até em animais que possuam ancestralidade comum. No caso da enzima 5- α -esteróide redutase (SRD5A1) que é essencial na regulação e remodelação cervical é encontrada em camundongos e não encontrada em porquinhos da Índia, que pertence a uma linhagem de roedores com ramificação basal (Lin et al., 2002). A enzima HSD17B1 que possui função de converter a estrona (E1) em 17beta-estradiol (E2), não é expressa na cérvix do gambá e do rato, pouco expressa na cérvix do tatu, altamente expressa em cobaia em todas as etapas ciclo reprodutivo, e em coelhos ao final da gestação, mesmo esses animais possuindo ancestralidade comum (Wagner et al., 2017).

Desta forma, é sugerido que entre bovinos e ovinos que possuem ancestrais comuns pode-se ter a conservação dos mecanismos de dilatação cervical, como também variação desses mecanismos entre essas espécies. Como as informações nesta temática são bastante restritas em ovinos. A espécie bovina, possivelmente pode ser uma boa fonte de informações para identificar mecanismos envolvidos na dilatação cervical que possam ser conservados em ovinos. Na espécie bovina há uma maior quantidade de dados de expressão gênica e esta espécie tem proximidade ancestral com ovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo estral de Vacas

O ciclo estral é caracterizado como um evento que desencadeia alterações hormonais e comportamentais na fêmea para a reprodução (Revisado por Forde et al., 2011). As fêmeas bovinas após a puberdade apresentam o ciclo estral com duração de 18 a 24 dias, com média de 21 dias (Neves et al., 2010).

A sua regulação ocorre através de mecanismos endócrinos e neuroendócrinos controlado pelo eixo-hipotálamo-hipofisário através de hormônios com diferentes funções fisiológicas.

Os hormônios que controlam o ciclo, são produzidos pelo hipotálamo (GnRH), pela hipófise anterior (FSH e LH), pelos ovários (estrógeno e progesterona) e no útero (PGF2a) (Frandsen et al., 2005). De forma simplista, segundo Ginther et al. (1989) o GnRH promove a liberação do FSH e LH. O FSH atuará na maturação de oócitos e e promoção do crescimento das células foliculares até o estágio de folículo pré-ovulatório, em seguida o LH fica responsável pela ovulação. O estradiol (E2) e a Progesterona (P4) produzidas no ovário também estão envolvidas no ciclo estral. O E2 produzido pelos folículos será responsável por sinais de receptividade, já a P4 produzida pelo corpo lúteo, será responsável pela manutenção da prenhez.

O ciclo estral é caracterizado em duas fases distintas. A primeira fase é a folicular, também conhecida como estrogênica, possui como eventos principais o desenvolvimento dos folículos e a alta concentração de estrógeno (Revisado por Forde et al., 2011). A segunda fase é a luteal ou progesterônica (Hafez e Hafez, 2004), possui como característica principal o desenvolvimento do corpo lúteo e as altas concentrações de P4 (Revisado por Mapletoft et al., 2009). Na fase luteal também pode ocorrer a regressão do corpo lúteo, promovendo o início de um novo ciclo estral. (Revisado por Forde et al., 2011).

Uma característica das vacas é que possuem de duas a três ondas foliculares dentro do ciclo estral (Frandsen et al., 2005). O ciclo estral de bovinos possui 4 fases dentro de 21 dias, são esses, proestro, estro, metaestro e diestro (Rathbone et al., 2001). O proestro possui duração média de 2 a 3 dias, sendo a fase que caracterizada pela queda nos níveis de progesterona e aumento e dos níveis de estradiol (Oliveira, 2006). O estro possui média de duração de 8 a 24 horas, sendo caracterizado quando há receptividade sexual (González et al., 2002). O metaestro, possui duração média de 2 a 3 dias, sendo uma fase característica de bovinos pois é a fase que ocorre a ovulação (Oliveira, 2006). Já o diestro possui uma duração média de 14 dias, com altas concentrações de P4 para a manutenção da prenhez ou queda das concentrações de P4 para início de um novo ciclo (Martin, 2008).

2.2. Ciclo estral de Ovelhas

As ovelhas como são consideradas poliéstricas estacionais, possuem uma estação de monta variando de 1 a 20 ciclos estrais consecutivos, concentrados em uma época do ano devido ao fotoperíodo (Fails e Magee, 2019). O ciclo estral dos ovinos possui duração média de 17 dias, também possuindo a fase luteínica (13 dias) e a fase folicular (4 dias) (Oliveira et al., 2013).

Como em bovinos, os ovinos também possuem o proestro, estro, metaestro e diestro. O proestro possui duração média de 24 horas, sendo a primeira fase do ciclo estral, compreendendo a fase de início da produção de muco vaginal, devido ao aumento crescente de estrógeno (Lobato et al., 2013). Devido serem animais poliéstricos, o proestro começa após a regressão do CL 1 ou 2 dias depois do ciclo estral anterior (Oliveira et al., 2013).

O estro possui média de 30 a 32 horas, e é caracterizado pela observação dos sinais externos, apresentando micção constante, cauda erguida e a baixa ingestão de alimentos com a fêmea receptiva ao macho (Lobato et al., 2013). Essas características estão relacionadas com o alto teor de estrógeno produzido pelas células foliculares (Fails e Magee, 2019). Diferente dos bovinos, a ovulação das ovelhas ocorre no terço final do estro (Oliveira et al., 2013).

Já o metaestro possui duração de 12 a 36 horas, período que não há mais receptividade da fêmea, pela diminuição dos níveis séricos de estrógeno e altos níveis de progesterona pós ovulação (Lobato et al., 2013). O diestro, com duração média de 14 dias, possui altas concentrações de progesterona produzida pelo corpo lúteo, pois caso haja fecundação, ocorre a fixação do embrião no útero e posterior seguimento da gestação, caso não ocorra penhez, começa um novo ciclo (Lobato et al., 2013).

2.3. Biotecnologias reprodutivas em ruminantes

A pecuária nacional vem cada vez mais procurando estabelecer e aderir estratégias tecnológicas para garantir maior retorno econômico e atender ao máximo as exigências do mercado por produtos com segurança e qualidade (Júnior et al., 2016). Além disso, alto ganho econômico através do potencial aumento do número de descendentes de animais geneticamente superiores (Bertolini e Bertolini, 2019). Em bovinos, as biotecnologias da reprodução estão

totalmente atreladas aos altos níveis de produtividade e conseqüentemente o sucesso da criação de bovinos no Brasil (Rodrigues e Rodrigues, 2009). Em ovinos, as biotécnicas reprodutivas durante a estação reprodutiva ou não reprodutiva, tem como uma das finalidades, obter concentrações de partos durante essas estações (Alvaro-Espino et al., 2019).

A utilização dessas biotecnologias também visa aumentar a produção de alimentos, eficiência dos sistemas de produção e a qualidade dos produtos de origem animal (Coutinho et al., 2010). Além disso, o aumento da eficiência na seleção genética (Rodrigues e Rodrigues, 2009).

As biotecnologias mais utilizadas são: a inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões; superovulação e transferência de embriões; sexagem embrionária e espermática; recuperação de oócitos; fertilização in vitro; clonagem, a transgenia e a biologia das células-tronco (Bertolini e Bertolini, 2009).

No caso de ovinos, como biotécnica de destaque temos a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (Bertolini e Bertolini, 2009). No entanto, ainda há dificuldades na implantação dessas biotécnicas devido a variabilidade da resposta aos protocolos hormonais e na implementação de técnicas que precisam de transposição via cervical.

2.4. Morfofisiologia Cervical de Vacas e Ovelhas

A cérvix é um órgão que desempenha um importante papel de barreira protetora do útero, assegurando contra afecções externas, além de ser meio de transporte e seleção de espermatozoides (Hafez e Hafez, 2004). Em ovelhas, os anéis cervicais adaptam-se um ao outro, ocluindo a cérvix que permanece firmemente fechada até a chegada do estro, quando ocorre dilatação para a passagem dos espermatozoides (Evans e Maxwell, 1990). A dilatação também ocorre no parto para a passagem do feto (Jainudeen e Hafez, 2004).

No caso de ruminantes, a cérvix é caracterizada como um órgão transversal ou espiralado, possuindo anéis fixos, com números e diâmetros variando de acordo com a raça, idade, estação, fase do ciclo estral e número de partos (El Khalil et al., 2018). Os bovinos possuem menor quantidade de anéis cervicais (média de 3), já em ovinos (média 5) (Kershaw et al., 2005).

As ovelhas possuem particularidades em relação as outras espécies,

tendo como característica principal, uma cérvix longa, tubular e fibrosa, altamente tortuosa e anéis desalinhados (Kershaw et al., 2005). Essas características da cérvix ovina, implicam a transposição do órgão, o que acaba limitando a implementação de biotécnicas reprodutivas via transcervical na espécie.

Histologicamente, a cérvix possui uma organização complexa, com diferentes camadas, sendo elas, mucosa, muscular e serosa, organizadas transversalmente (Moré, 1984). Ainda, segundo Schmitz et al. (2006) diferentes tipos de células se comunicam de maneira autócrina ou parácrina para modificar a composição da matriz extracelular.

A cérvix também possui na sua composição o colágeno, elastina e reticullina, sendo o colágeno o principal componente da estrutura cervical, responsável pela elasticidade (Robinson et al., 2011). O colágeno é composto por vários aminoácidos, e está presente em abundância na matriz extracelular, encontrando-se no tecido conectivo, musculatura lisa e vascular (Hafez e Hafez, 2004). No parto, a dissociação das fibras colágenas, que se separam acentuadamente umas das outras, provoca o afrouxamento dos tecidos cervicais, promovendo a dilatação (Jainudeen e Hafez, 2004).

Outros componentes são os proteoglicanos, ácido hialurônico, sulfato de condroitina-4-6, sulfato dermatânico, sulfato de heparina e sulfato de queratina, na qual compõem a substância básica do estroma cervical (Hafez e Hafez, 2004). Também possuem na composição da matriz, glicoproteínas, proteinases e células inflamatórias, todos esses envolvidos na remodelação extracelular durante o relaxamento cervical (Uldbjerg e Ulmsten, 1990). Ainda, células inflamatórias (IL-1 e IL-8) e células do sistema imunológico (macrófagos, leucócitos e eosinófilos), esses, presentes na remodelação celular e relaxamento da cérvix (Chwalisz et al., 1994). Um exemplo seria o aumento de até 8 vezes da cérvix durante a prenhez, devido a uma diminuição dos componentes da matriz, que pode ser influenciada pelo aumento da vascularização junto a um influxo de células inflamatórias (Hafez e Hafez, 2004). Além disso, segundo Westerhausen-Larson (1996), ocorre destruição das fibras de colágeno por collagenases que são recrutadas por neutrófilos.

Outro componente importante presente na cérvix, é o muco, constituído de uma mistura heterogênea de mucinas, proteínas, água e íons (Gipson, 2001).

As suas características mudam de acordo com a fase do ciclo estral, sendo na fase folicular, uma consistência mais aquosa, para facilitar a passagem dos espermatozoides e complementar a composição do sêmen e na fase lútea, um muco mais espesso e viscoso, formando uma barreira antimicrobiana (Eriksen et al., 1998).

2.5. Mecanismos moleculares da dilatação cervical no estro e parto

O relaxamento cervical possui variações entre as espécies devido conformações anatômicas ou fisiológicas. O mecanismo de dilatação cervical em ovinos é complexo, com envolvimento de várias substâncias, proteínas, enzimas e hormônios (Fonseca et al, 2019). Em ruminantes, tanto no parto quanto no estro, o aumento da concentração de estrógeno parece iniciar uma cascata de eventos que culminam com o relaxamento cervical (Landim-Alvarenga, 2012).

No estro, há uma facilidade de penetração pela cérvix em consequência de um mecanismo natural de relaxamento cervical (Kershaw et al., 2005). O estradiol folicular leva a um aumento na concentração de receptores de ocitocina nas células epiteliais da camada da mucosa cervical (Falchi e Scaramuzzi, 2015). A ligação da ocitocina a seus receptores, promove a liberação de ácido araquidônico, esse convertido pela ciclooxigenase 2 em prostaglandina H, precursora da síntese de prostaglandina E2 (PGE2) (Falchi e Scaramuzzi, 2015). Com isso, a PGE2 atuará tecido conjuntivo e nas células musculares lisas, promovendo a dilatação cervical para facilitar o transporte de espermatozoides (Fuchs et al., 2002).

A PGE2 promove alterações nas fibras de colágeno através de receptores específicos (EP2 e EP4), alterando a tensão e favorecendo a capacidade de distensão da cérvix (Feltovich et al., 2005; Kershaw-Young et al., 2009). Essa distensão também é estimulada por glicosaminoglicanos, como é o caso do ácido hialurônico, que tem sua síntese estimulada pela PGE2, na qual possui características hidrofílicas que separam as fibras de colágeno por meio de uma maior hidratação da matriz extracelular (Kershaw-Young et al., 2009).

O muco cervical também é importante no processo de dilatação, pois possui uma interação indireta com o colágeno (Fair et al., 2005). Isso ocorre devido a presença de metaloproteinases de matriz presentes no muco, essas, causam degradação da matriz, promovendo a distensão da cérvix (Becher et al.,

2004). No estro, quando se atinge o pico de estradiol, ocorre maior estímulo para a secreção do muco cervical, com consistência menos viscosa, lubrificando todo o epitélio cervical (Hawk, 1983).

No parto, é necessário anteriormente um amadurecimento cervical por meio da transformação da matriz celular, para que ocorra a distensão da cérvix para a passagem do feto (Word et al., 2007; Mahendroo, 2012). O relaxamento cervical durante o parto é resultado principalmente por conta das dispersões das ligações de colágeno da matriz extracelular cervical (Gahlot et al., 2017). Os hormônios participantes do parto são: progesterona, estradiol, prostaglandinas (principalmente a Prostaglandina E2 e a Prostaglandina F2 α) e relaxina. Outros compostos como ácido hialurônico, citocinas (interleucinas 1 e 8 e fator de necrose tumoral) e células inflamatórias (macrófagos e monócitos) também fazem parte do mecanismo de expulsão do feto (Uldbjerg e Ulmsten, 1990).

O relaxamento cervical em ruminantes é resultado de uma colagenólise e recrutamento de leucócitos, onde o início desse evento se dá ao aumento da pressão que o feto faz sobre a cérvix (Owiny et al., 1995). Mas antes de acontecer o relaxamento, a cérvix passa por uma alteração de composição bioquímica no pré-parto, devido a modificação dos glicosaminoglicanos, com consequente dispersão das fibras de colágeno (Taverne, 1992). Posteriormente, a cérvix fica mais maleável, pois ocorre a reorganização das fibrilas de colágeno (Gahlot et al., 2017).

As alterações bioquímicas também ajudam nesse processo, pois devido ao aumento da concentração de ácido hialurônico na cérvix no final da gestação, ocorre o recrutamento das moléculas de água e aumento da hidratação da matriz, o que também leva a dispersão das fibras de colágeno (Takemura et al., 2005). Além disso, o ácido hialurônico induz o da produção de citocinas inflamatórias, que irão estimular a migração de células inflamatórias, como neutrófilos e eosinófilos, para o estroma, promovendo um processo inflamatório e consequente dilatação cervical (Junqueira et al., 1980).

Associado a diferenciação do colágeno e processos bioquímicos, ocorre também as mudanças hormonais. Já próximo ao parto, ocorre aumento da produção do hormônio adrenocorticotrófico e do cortisol fetal, esses estimulam o útero a produzir prostaglandina (Riley e Challis, 1991). Essa prostaglandina induz a queda de progesterona pela placenta com consequente queda de

concentração de progesterona (Challis et al., 2000). Como no estro, a PGE2 se liga aos seus receptores e estimulando principalmente os receptores EP2 e EP4 promovendo o relaxamento da musculatura lisa (Kershaw-Young et al., 2009).

Outro hormônio envolvido é a relaxina, onde através do remodelamento do tecido conectivo, promove o relaxamento cervical, pois durante a ação da relaxina, não só ocorre uma quiescência do miométrio, como também aumentam a concentração de precursores de prostaglandina que reflete em aumento na produção uterina de PGF2 α e da produção cervical de PGE2 (Koets et al., 1998).

Já o estradiol promove desencadeamento da dilatação cervical através da indução de atividade da collagenase e promoção da remodelação do colágeno (Rajabi et al., 1991). Ainda, estimula a expressão dos receptores de oxitocina no útero e liberação de prostaglandina, estando associado ao aumento da concentração de prostaglandinas do miométrio (Gahlot et al., 2017).

A ocitocina aumenta a frequência de contrações uterinas para expulsão do feto (Hirst et al., 1993). A PGF2 α está associada com o aumento dos receptores de ocitocina cervical (Weems; Weems; Randel et al., 2006). Assim, para promover a expulsão do feto, a ocitocina estimula as contrações uterinas e estimula a liberação de prostaglandina no útero e em outros tecidos (Blanks e Thornton, 2003). Esse evento tem mais intensidade próximo ao parto e ocorre até a expulsão do feto.

3. Referências

Alvarado-Espino AS, Menchaca A, Meza-Herrera CA, Arellano MMF, Veliz F, (2019) Use of injectable progesterone and hCG for fixed-time artificial insemination during the non-breeding season in goats. **Theriogenology**, 127: 21-25.

Bartlewski PM, Candappa IBR, (2015) Assessing the usefulness of prostaglandina E2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. **Theriogenology**, 84:1594-1602.

Becher N, Hein M, Danielsen CC, Ulbjerg N, (2004). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the cervical mucus plug at term of pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 191: 1232–1239.

Bertolini M, Bertolini LR, (2009) Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, 56: 184–194.

Blanks AM, Thornton S, (2003) The role of oxytocin in parturition. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 10: 46–51.

Candapp IBR, Bartlewski PM, (2012) A Review of Advances in Artificial Insemination (AI) and Embryo Transfer (ET) in Sheep, with the Special Reference to Hormonal Induction of Cervical Dilatation and its Implications for Controlled Animal Reproduction and Surgical Techniques. *The Open Reproductive Science Journal*, 3: 162–175.

Casali R, Pinczak A, Cuadro F, Guillen-Muñoz JM, Mezzalira A, Menchaca A. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. *Theriogenology*, 103: 30-35.

Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ, (2000) Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocrine Reviews*, 21: 514–550.

Chwalisz K, Benzon M, Schol P, Daum J, Beier HM, Hegele-Hartung C, (1994) Cervical ripening with the cytokines interleukin 8, interleukin 1 β and tumour necrosis factor α in guinea-pigs. *Human Reproduction*, 9: 2173–2181.

Coutinho LL, Rosário MF, Jorge EC, (2010) Animal Biotechnology. *Estudos Avançados*, 24: 219–250.

El khalil K, Allai L, Fatet A, Benmoula A, Hamidallah N, Badi A, Moussafir Z, Ibelbachyr M, El Amiri B, (2018). Morphometry and depth of inseminating catheter penetration in prolific and non- prolific ewes at different ages: A post mortem study. *Animal Reproduction Science*, 196: 43–47.

Eriksen GV, Carlstedt I, Ulbjerg N, Ernst E, (1998) Cervical mucins affect the motility of human spermatozoa in vitro. *Fertil Steril*, 70: 350–354.

Evans G, Maxwell WMC, (1990) Inseminación artificial de ovejas y cabras. España: **Zaragoza**, 192.

Fails AD, Magee C. (Eds.) (2019) Fradson – Anatomia e Fisiologia dos Animais de Produção. Guanabara Koogan, 354p.

Fair S, Hanrahan JP, O'Meara CM, Duffy P, Rizos D, Wade M, Donovan A, Boland MP, Lonergan P, Evans ACO, (2005) Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. *Theriogenology*, 63:1995–2005.

Falchi L, Scaramuzzi RJ, (2015) An invitro investigation of the actions of reproductive hormones on the cervix of the ewe in the follicular stage: The effects of 17 β -estradiol, oxytocin, FSH, and arachidonic acid on the cervical pathway for the synthesis of prostaglandin E2. *Theriogenology*, 83: 1007–1014.

Falchi L, Taema M, La Clanche S, Scaramuzzi RJ, (2012) The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and

oxytocin on the depth of cervical penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. **Theriogenology**, 78: 376-384.

Feltovich H, Ji H, Janowski JW, Delance NC, Moran CC, Chien EK, (2005) Effects of selective and nonselective PGE2 receptor agonists on cervical tensile strength and collagen organization and microstructure in the pregnant rat at term. **Am J Obstet Gynecol**, 192: 753-760.

Fonseca JF, Zambrini FN, Guimarães JD, Silva MR, Oliveira MEF, Brandão FZ, Bartlewski PM, SouzaFabjan JMG, (2019) Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. **Reprod Domest Anim**, 54: 118-125.

Fonseca JF, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, Leite CR, Nascimentopenido P MP, Brandão FZ, Lehloenya KC, (2016) Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, 86: 144-151.

Forde N, Beltman ME, Lonergan P, Diskin M, Roche JF, Nc Crowe MA, (2011) Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, 124: 163–169.

Frandsen RD, Wilke WL, Fails AD, (eds.) (2005) Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 381-389p.

Fuchs AR, Graddy LG, Kowaski AA, Fields MJ, (2002) Oxytocin induces PGE2 release from bovine cervical mucosa in vivo. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, 70: 119–129.

Gahlot SC, Kumaresan A, Kumar S, Yadav S, Saraf KK, Karan P, Verma K, (2017) Incomplete Cervical Dilatation in Animals – an Update. **International Journal of Science Environment**, 6: 1036–1048.

Ginther OJ, Kastelic JP, Knopf L, (1989) Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, 20: 187–200.

Gipson IK, (2001) Mucins of the human endocervix. **Front Biosci**, 6: 1245–1255.

González FHD. Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 83 p.

Hafez ESE, Hafez B. Ciclos Reprodutivos. In: Hafez ESE, Hafez B. Reprodução Animal, 7. ed. Barueri, SP: Ed. Manole, 2004. cap. 4, p. 55-67.

Hawk HW, (1983) Sperm Survival and Transport in the Female Reproductive Tract. **Journal of Dairy Science**, 66: 2645–2660.

Hirst JJ, Haluska GJ, Cook MJ, Novy MJ, (1993) Plasma oxytocin and nocturnal uterine activity: Maternal but not fetal concentrations increase progressively

during late pregnancy and delivery in rhesus monkeys. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 169: 415–422.

Jainudeen MR, Hafez ESE. Ciclos Reprodutivos. In: Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução Animal*, 7. ed. Barueri, SP: Ed. Manole, 2004. cap. 10, p. 141-156.

Júnior CPB, Borges LS, Sousa PHAA, Oliveira MRA, Cavalcante DH, Andrade TV, Barros CD, Júnior SCS, (2016) Melhoramento Genético em Bovinos de Corte (*Bos indicus*). **Nutritime Revista Eletrônica**, 13: 4558-4564.

Junqueira LCU, Zugaib M, Montes GS, Toledo OMS, Krisztán RM, Shigihara KM, (1980) Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, 138: 273–281.

Kershaw-Young CM, Khalid M, MCGowan MR, Pitsillides AA, Scaramuzzi RJ, (2009) The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. **Theriogenology**, 72: 251-261.

Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ, (2005) The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, 64: 1225-1235.

Koets AP, Schwartz N, Tooten P, Kankofer M, Broekhuijsen-Davies JM, Rutten VPMG, van Leengoed LAMG, Taverne MAM, Gruys E, (1998) Release of proinflammatory cytokines related to luteolysis and the periparturient acute phase response in prostaglandin-induced parturition in cows. **Theriogenology**, 49: 797–812.

Landim-Alvarenga FC. (Eds.) (2012) Parto Normal. *Obstetrícia Veterinária*. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 83-96p.

Leite CR, Fonseca JF, Fernandes DAM, Souza- Fabjan JMG, Ascoli FO, Brandão FZ, (2018) Cervical relaxation for non-surgical uterus access in Santa Inês ewes. **Arq Bras Med Vet Zootec**, 70: 1671-1679.

Lin, YH, McLenachan PA, Gore AR, Phillips MJ, Ota R, Hendy MD, Penny D, (2002) Four new mitochondrial genomes and the increased stability of evolutionary trees of mammals from improved taxon sampling. **Mol Biol Evol**. 19:2060–2070.

Lobato E, Ferro RAC, Santos KJG, Costa, MA, Ferro DA, Santos APP, (2013) Fisiologia reprodutiva de ovinos. **PUBVET**, 7: 1573.

Mahendroo M, (2012) Cervical remodeling in term and preterm birth: insights from an animal model. **Reproduction**, 143: 429–438.

Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS, (2009) Control of Ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, 6: 114– 124.

Masoudi R, Shahneh AZ, Towhidi A, Kohram H, Akbarisharif A, Sharafi M, Zhandi M, Shahab-El-Deen MAM, (2017) Cervical dilation and improvement of reproductive performance in fat-tailed ewes via cervical dilator treatments. **Asian Pac J Reprod**, 6: 93-96.

Moré J, (1984) Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. **Acta Anat (Basel)** 120:156–9.

Martin I, Gioso MM, Tavares RZ, Bittercourt RF, Miranda LB, Wechsler FS, Oba E, Ferreira JCP, (2008) Características ultrasonográficas do útero de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) ao longo do ciclo estral. **Veterinária e Zootecnia, Botucatu**, 15: 349-359.

Neves, JP, Miranda KL, Tortorella RD, (2010) Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39: 414-421.

Oliveira MEF, Cordeiro MF, Feliciano MAR, Oliveira LG. Fisiologia do ciclo estral. In: Oliveira MEF, Teixeira PPM, Vicente WRR. (Ed.). Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos. São Paulo: MedVet, 2013. p. 17-24.

Owiny JR, Gilbert RO, Wahl CH, Nathanielsz PW, (1995) Leukocytic Invasion of the Ovine Cervix at Parturition. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, 2: 593–596.

Taverne MAM (1992) Physiology of Parturition. **Animal Reproduction Science**, 28: 433–440.

Rajabi M, Solomon S, Robin Poole A, (1991) Hormonal regulation of interstitial collagenase in the uterine cervix of the pregnant guinea pig. **Endocrinology**, 128: 863–871.

Rathobone MJ, Kinder JE, Fike K, (2001) Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Adv. Drug Deliv. Ver**, 50: 277-320.

Riley SC, Challis JRG, (1991) Corticotrophin-releasing hormone production by the placenta and fetal membranes. **Placenta**, 12: 105–119.

Robinson JJ, McKelvey WAC, King ME, Mitchell SE, Mylne MJA, McEvoy TG, Dingwall WS, Williams LM, (2011) Traversing the ovine cervix – a challenge for cryopreserved semen and creative science. **Animal**, 5: 1791–1804.

Rodrigues JL, Rodrigues BA, (2009) Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético. **Revista Ceres**, 56: 428–436.

Schmitz T, Levine BA, Nathanielsz PW, (2006) Localization and steroid regulation of prostaglandin E2 receptor protein expression in ovine cervix. **Reproduction**, 131:743–50.

Takemura M, Itoh H, Sagawa N, Yura S, Korita D, Kakui K, Kawamura M, Hirota N, Maeda H, Fujii S, (2005) Cyclic mechanical stretch augments hyaluronan production in cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Molecular Human Reproduction*, 11: 659–665.

Taverne MAM, (1992) Physiology of Parturition. **Animal Reproduction Science**, 28: 433–440.

Uuldbjerg N, Ulmsten ULF, (1990) The physiology of cervical ripening and cervical dilatation and the effect of abortifacient drugs. **Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 4: 263–282.

Wagner GP, Nnamani MC, Chavan AR, Maziarz J, Protopapas S, Condon J, Romero R, (2017) Evolution of Gene Expression in the Uterine Cervix related to Steroid Signaling: Conserved features in the regulation of cervical ripening. **Scientific Reports**, 7: 4439.

Weems CW, Weems YS, Randel RD, (2006) Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Veterinary Journal**, 171: 206–228.

Word RA, Li XH, Hnat M, Carrick K, (2007) Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts. **Semin Reprod Med**, 25: 69–79.

CAPÍTULO 2 - Identificação de vias relacionadas a dilatação cervical em ovelhas

RESUMO:

Introdução: O presente trabalho desenvolveu uma revisão e prospecção de dados em repositório públicos e já validados. O objetivo principal é identificar as vias envolvidas na dilatação cervical, que são conservadas entre bovinos e ovinos na fase folicular e luteal do ciclo reprodutivo.

Resultados: Em bovinos foram encontrados 1961 genes mais expressos na fase folicular e 1560 na fase luteal. 24 genes foram considerados exclusivos, desses, 18 genes na fase folicular e 6 genes na fase luteal. Em ovinos, 4595 genes foram diferentemente expressos de um total de 19581 genes. Sendo 2126 mais expressos na fase folicular e 2469 genes mais expressos na fase luteal. 4 genes exclusivos foram encontrados na fase folicular. O *TFF1* (trefoil factor 1), é um dos genes de destaque na fase folicular de bovinos. Na fase luteal, o *TDGF1* (teratocarcinoma-derived growth factor 1) foi diferentemente expresso. Nos achados de ovinos, o *DRD2* (dopamine Receptor D2) foi diferentemente expresso na fase folicular. Na fase luteal, o *ADAM7* (ADAM metallopeptidase domain 7) foi o gene de destaque. Os genes *Hoxb* foram identificados em ambas as espécies e parecem estar correlacionados com a via PI3K/Akt, podendo modular essa via ou serem modulados. A PI3K/Akt também foi encontrada tanto em bovinos e ovinos, aparecendo em destaque na fase folicular e na fase luteal de ambas as espécies.

Conclusão: Nossas análises têm apontado que a via PI3K/Akt e os genes *Hoxb* aparecem em destaque, podendo modular e serem modulados em mecanismos que envolvam alterações na cérvix. A PI3K/Akt parece ser uma importante via no processo de relaxamento cervical.

Palavras-chaves: transcriptoma, cérvix, reprodução, ruminantes.

1. INTRODUÇÃO

A anatomia da cérvix ovina é um dos principais limitantes a transposição cervical em ovinos, devido ao número, diâmetro interno e distribuição dos anéis cervicais (1). Mesmo com a remodelação cervical durante a fase de estro, a penetração cervical para procedimentos de inseminação artificial em ovelhas permanece problemática (2,3). O desafio é ainda maior durante a fase luteal quando a colheita de embriões é realizada (4). Uma série de estudos tentam desenvolver protocolos com respostas satisfatórias de relaxamento cervical, para melhor aplicação das biotécnicas reprodutivas (3). O mecanismo de dilatação cervical em ovinos é complexo, com envolvimento de várias substâncias, proteínas, enzimas e hormônios (4). Em ruminantes, tanto no parto quanto no estro, o aumento da concentração de estrógeno parece iniciar uma cascata de eventos que culminam com o relaxamento cervical (5). Há um grande obstáculo para desvendar os mecanismos do amadurecimento cervical, pois os mecanismos em mamíferos são altamente variáveis no parto que é o momento de maior dilatação. Um exemplo prático seria que em humanos e primatas a placenta produz grandes quantidades de progesterona durante a gravidez e o parto. Já a maioria dos outros mamíferos placentários, como ovelha, camundongo, coelho e rato, tem uma abstinência sistêmica de progesterona, na qual a concentração sérica de progesterona diminui antes do início do trabalho de parto (6).

A enzima 5- α -esteróide redutase (SRD5A1) é essencial na regulação e remodelação cervical e já foi observado que a expressão de mRNA de SRD5A1 é encontrada apenas em camundongos, sugerindo que esse mecanismo bem documentado de amadurecimento cervical é específico para murinos, não encontrado em porquinhos da Índia, que pertence a uma linhagem de roedores com ramificação basal (7). Também já foi relatado que a enzima HSD17B1, conhecida principalmente por seu papel na síntese de estradiol, não é expressa na cérvix do gambá e do rato, pouco expressa na cérvix do tatu, altamente expressa em cobaia em todas as etapas do ciclo reprodutivo, e em coelhos ao final da gestação (8). Desta forma, é sugerido que em espécies com ancestrais comuns pode-se ter a conservação dos mecanismos de dilatação cervical, como também variação desses

mecanismos entre as espécies.

Foi desenvolvido uma revisão e prospecção de dados em repositório públicos e já validados. Formulamos a hipótese de que genes expressos diferencialmente e processos biológicos divergentes indicariam diferenças e semelhanças relacionadas ao relaxamento cervical de vacas e ovelhas. O objetivo principal é identificar as vias envolvidas na dilatação cervical, que são conservadas entre bovinos e ovinos na fase folicular e estral do ciclo reprodutivo. Tais resultados serão importantes para entendermos melhor o mecanismo de dilatação cervical em ovelhas, podendo indicar as vias de sinalização, que possivelmente, venham ajudar a entender e melhorar a eficiência dos protocolos de relaxamento cervical. Assim, conseqüentemente melhorar a aplicação de biotécnicas reprodutivas na espécie.

2. RESULTADOS

Em bovinos foram encontrados 1961 genes mais expressos ($p_{adj} < 0.1$ e $|\log_2 \text{foldchange}| > 0,6$) na fase folicular e 1560 na fase luteal. 24 genes foram considerados exclusivos, desses, 18 genes na fase folicular e 6 genes na fase luteal. Em ovinos, 4595 genes foram diferentemente expressos ($p_{adj} < 0.1$ e $|\log_2 \text{foldchange}| > 0,6$) de um total de 19581 genes. Sendo 2126 mais expressos na fase folicular e 2469 genes mais expressos na fase luteal. 4 genes exclusivos foram encontrados na fase folicular.

As vias de sinalização encontradas têm funções e intensidades de expressão diferentes de acordo com a fase do ciclo estral. As vias de sinalização estão ligadas a genes de diferentes categorias: receptores adrenérgicos, dopaminérgicos, purinérgicos, fatores de crescimento, tumorigênese, hematopoiese, regulação e condensação da cromatina, regulação da transcrição, mucinas, ligantes hormonais, cartilagem e genes envolvidos na

vasoconstrição, vasodilatação e contração muscular.

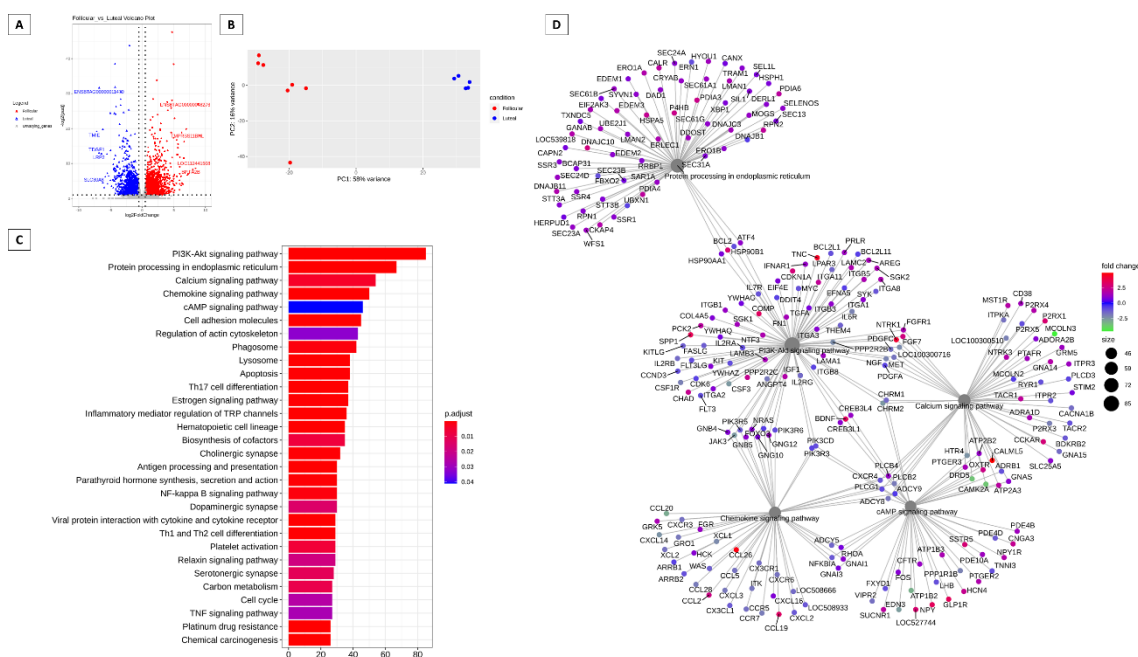


Figura 1 . Resumo da análise de diferença de expressão gênica da cervix bovina na fase folicular e estral. (A) Volcano do sequenciamento de RNA (RNAseq) comparando a fase folicular e estral. (B) Análise de PCA. (C) Análise de redes com base no enriquecimento da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto [KEGG] de genes diferencialmente expressos (D) Rede enriquecida de vias e genes expressos na fase folicular e luteal da cervix bovina.

Na figura 1 são apresentadas um resumo das análises de diferença de expressão gênica em bovinos na fase folicular e luteal. Os genes diferencialmente expressos podem ser visualizados em volcano plot na Figura 1A, sendo os genes em vermelhos na fase folicular e os genes em azul na fase luteal. Na fase folicular, ENSBTAG00000048276 (trefoil factor 1), TMPRSS11B N terminal-like (*TMPRSS11BNL*), LOC112441508 e BPI fold containing family A, member 2B (*BPIFA2B*) foram mais expressos. Na fase luteal, os genes diferencialmente mais expressos foram ENSBTAG00000011470, transmembrane inner ear (*TMIE*), teratocarcinoma-derived growth factor 1 (*TDGF1*), LDL receptor related protein 2 (LRP2), solute carrier family 30 member 8 (*SLC30A8*). Na Figura 1B temos os resultados da análise de PCA, demonstrando a clusterização dos dados. Na Figura 1C são mostradas 30 vias diferentes que são moduladas por esses genes, sendo a via PI3K/Akt com maior número de genes expressos. Na Figura 1D temos a rede de genes com diferentes expressões na qual pode ser observado a interpelação dos genes com as demais vias. Podemos observar a via PI3K/Akt

no centro da rede.

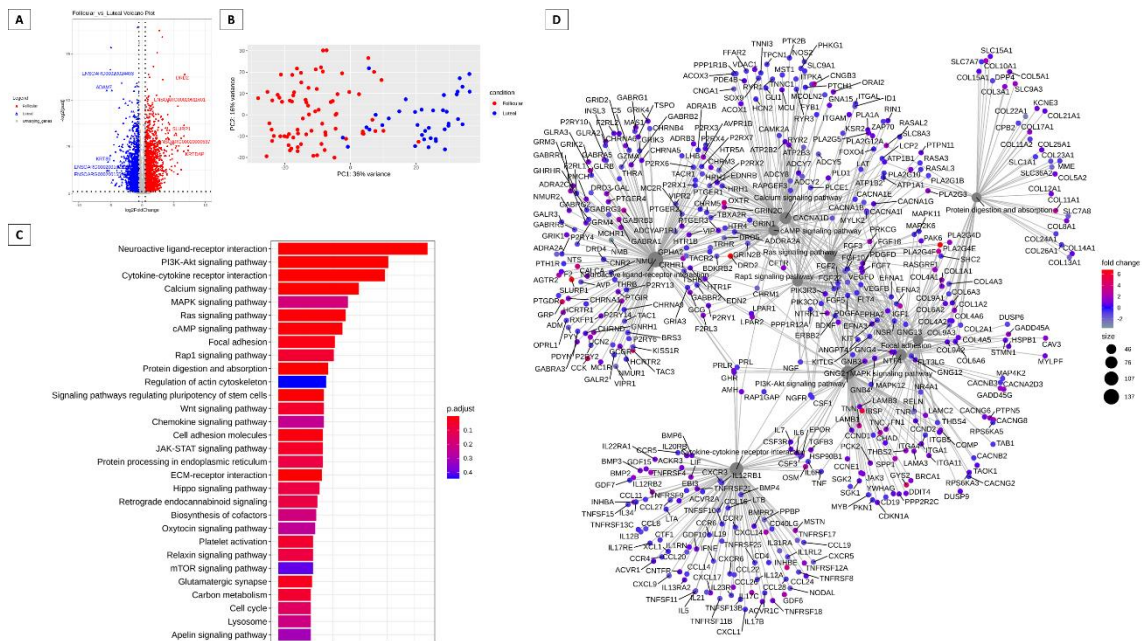


Figura 2 . Resumo da análise de diferença de expressão gênica da cérvix ovina na fase folicular versus luteal. (A) Volcano plot do sequenciamento de RNA (RNAseq) comparando a fase folicular e estral. (B) Análise de PCA. (C) Análise de redes com base no enriquecimento da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto [KEGG] de genes diferencialmente expressos (D) Rede enriquecida de vias e genes expressos na fase folicular e luteal da cérvix ovina.

Na figura 2 são apresentadas as Análises de diferença de expressão gênica em ovinos na fase folicular e luteal. Os genes diferentemente expressos podem ser visualizados no volcano plot na Figura 2A, sendo os genes em vermelhos na fase folicular e os genes em azul na fase luteal. Na fase folicular, Dopamine Receptor D2 (*DRD2*), ENSOARG00020011601, Secreted LY6/PLAUR domain containing 1 (*SLURP1*), ENSOARG00020000537, Keratinocyte differentiation associated protein (*KRTDAP*) foram os diferentemente expressos. Na fase luteal os genes mais expressos foram, ENSOARG00020024493, ADAM metallopeptidase domain 7 (*ADAM7*), keratin, type II microfibrillar, component 5-like (*KRT85*), ENSOARG00020010220, ENSOARG00020015599. Na Figura 2B temos os resultados da análise de PCA, demonstrando a clusterização dos dados. Na Figura 2C são mostradas 30 vias diferentes que são moduladas por esses genes, sendo a via Neuroactive ligand-receptor interaction com maior número de genes expressos, seguido da via PI3K/Akt. Na Figura 1D temos a rede de genes com diferentes expressões na

qual pode ser observado a inter-relação dos genes com as demais vias. Também podemos observar a via PI3K/Akt próximo centro da rede e perifericamente as vias de sinalização da Ras e da RAP1.

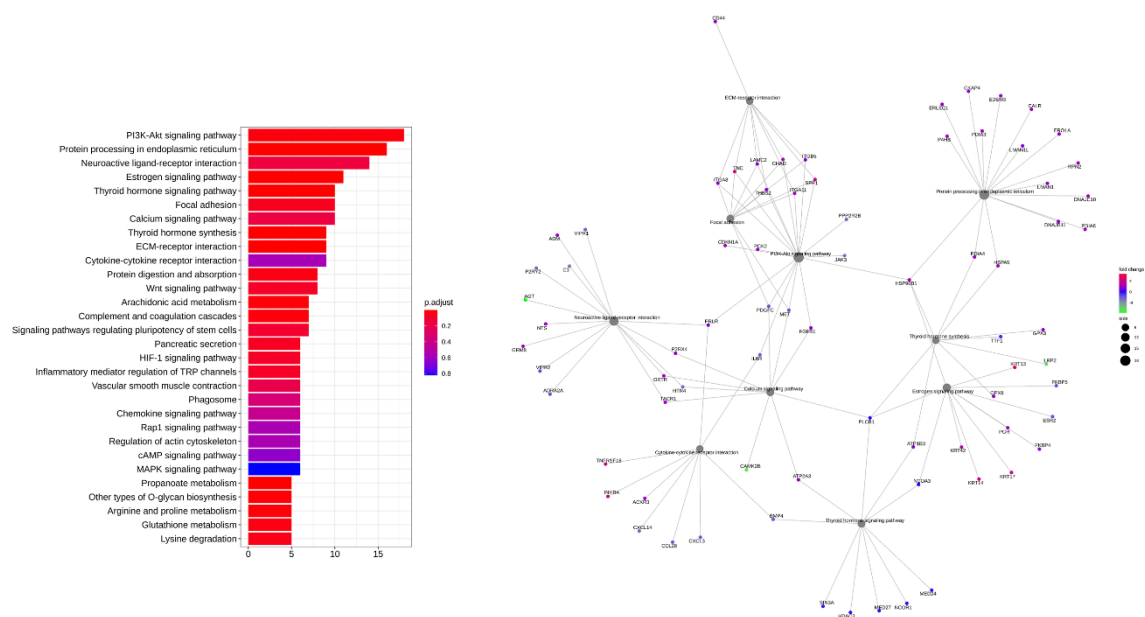


Figura 3 - Análise de enriquecimento de vias KEGG que podem ser reguladas pelos fatores de transcrição chave em bovinos. (A) Principais vias gênicas com interação com os genes chaves (B) Análise de redes gênicas com interação com os genes chaves.

Na Figura 3 são mostradas o resumo da modulação dos genes chaves e seus possíveis alvos na cêrvix bovina (Figura 3 A). Essas vias podem estar sendo moduladas pelos genes chaves. O gene chave é considerado o maior grau de conectividade aos demais genes para promoção de um evento molecular (8). Na rede de interação Figura 3B, novamente a via PI3K/Akt aparece novamente sendo modulada. Na Figura 4 temos as vias relacionadas com os genes chaves em ovinos. Na Figura 4 A temos as principais vias relacionadas aos genes chaves e a rede de vias com a PI3K/Akt no centro, também modulada por esses genes chaves (Figura 4 B).

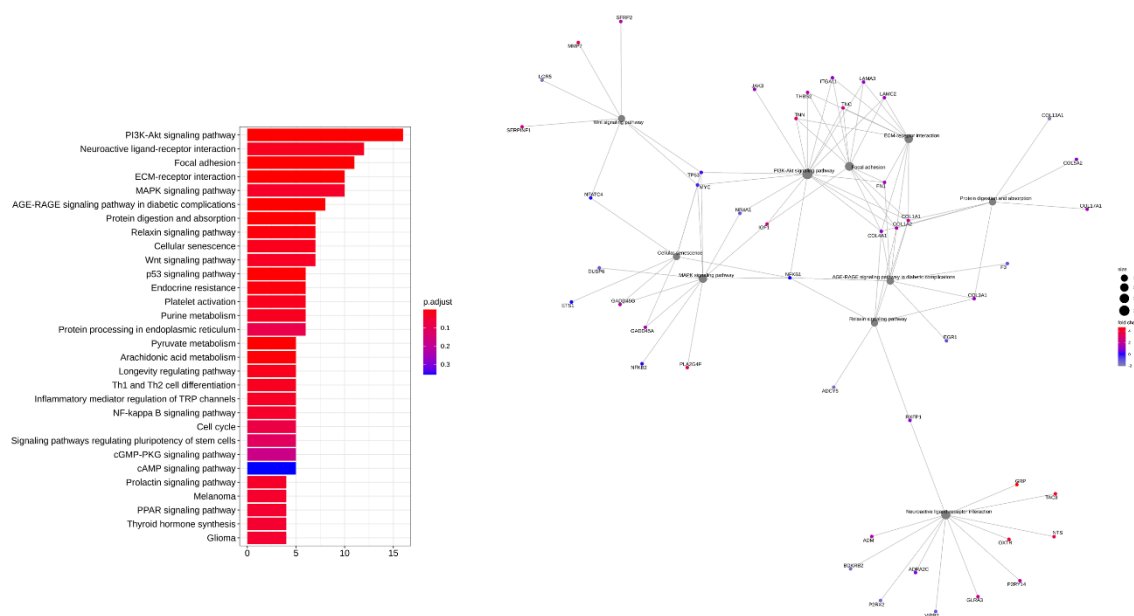


Figura 4 - Análise de enriquecimento de vias KEGG que podem ser reguladas pelos fatores de transcrição chave em ovinos(A) Principais vias gênicas com interação com os genes chaves(B) Análise de redes gênicas com interação com os genes chaves.

Na Figura 5 são apresentados vias e genes que podem ser modulados pelos genes *Hoxb* em bovinos (Figura 5) e ovinos (Figura 6). Os genes *Hox* são essenciais no direcionamento para posterior desenvolvimento dos tecidos na fase embrionária (9). Pode-se observar que a via PI3K/akt aparece sendo modulada por esses genes *Hox*, tanto na fase folicular como na luteal, aparecendo em destaque nas redes de interação. Também é observado nas redes de interação, que vários outros genes também podem estar sendo modulados pelos *Hoxb* genes. Esses resultados foram obtidos utilizando a correlação de Spearman com o valor de $P < 0.05$ e o valor de R absoluto maior que 0.5.

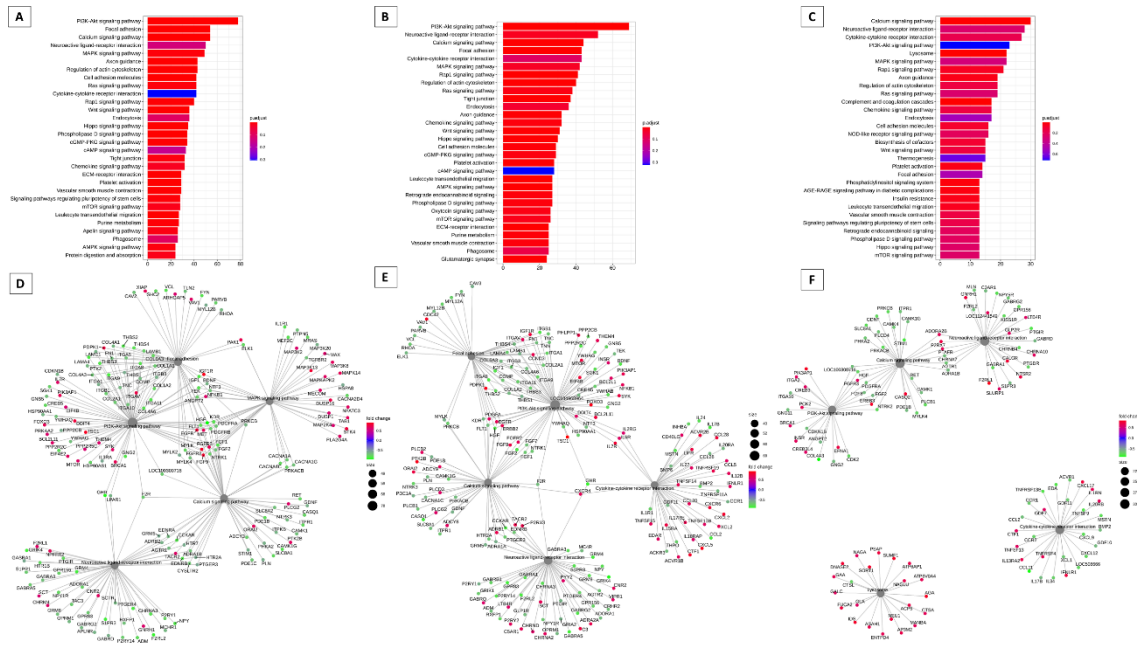


Figura 5 - Análise de enriquecimento de vias KEGG que podem ser reguladas pelos *Hox* genes em bovinos. (A)-*Hoxb3*, (B)-*Hoxb8*, (C)-*Hoxb9*, (D)-*Hoxb3*, (E)-*Hoxb8*, (F)- *Hoxb9*.

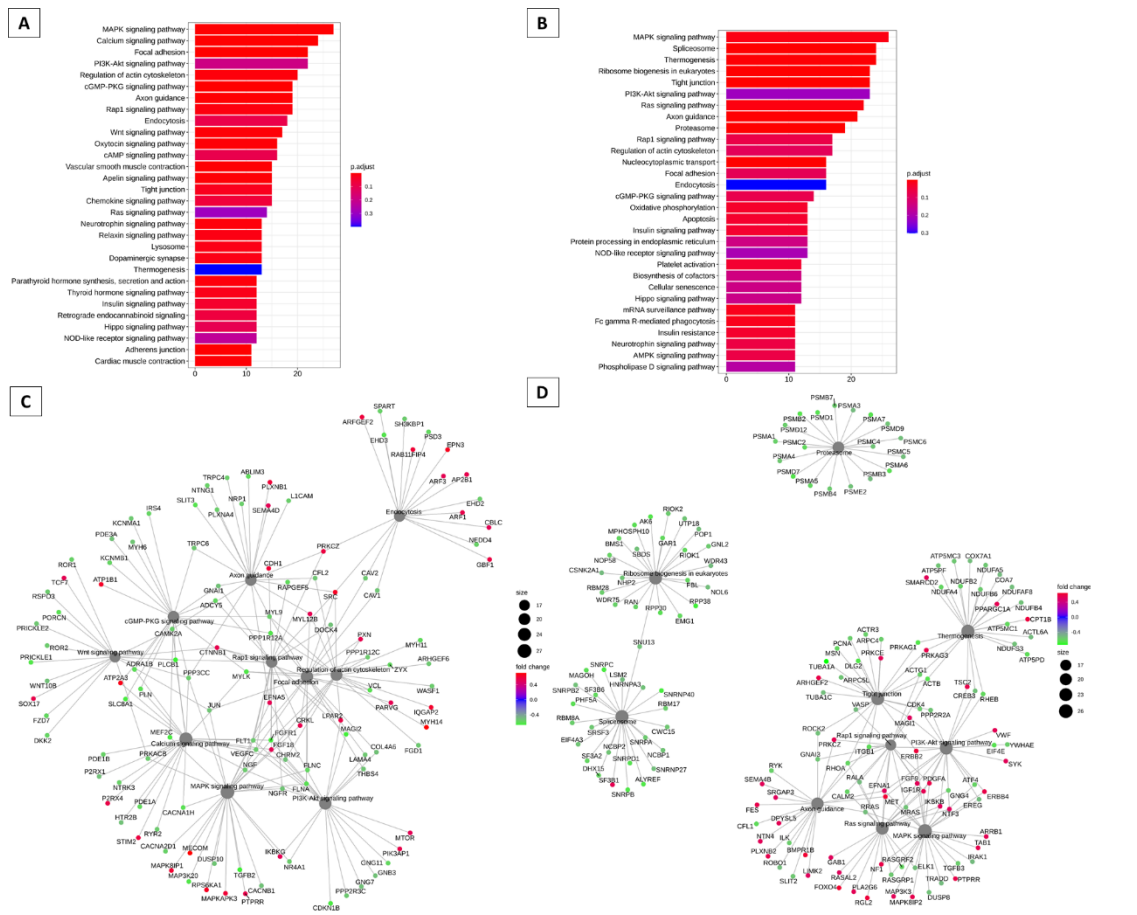


Figura 6- Análise de enriquecimento de vias KEGG que podem ser reguladas

pelos *Hox* genes em ovinos. (A)-*Hoxb2*, (B)-*Hoxb3*, (C)-*Hoxb2*, (D)-*Hoxb3*.

No material suplementar, são demonstrados os genes chaves mais expressos em bovinos (tabela 1) e ovinos (tabela2). Na fase folicular (Log Fold Change Positivo) e luteal (Log Fold Change Negativo). Como gene chave mais expresso na fase folicular em bovinos, o mucin 1 (*MUC1*) (Log Fold Change 1.5759491672159) possui papel fundamental no mecanismo cervical. Para ovinos, os genes chaves mais expressos na cérvix de ovelhas na fase folicular e luteal, são demonstrados na Tabela 2. O gene chave mais expresso na fase folicular de ovelhas foi o Estrogen receptor 1 (*ESR1*) (Log Fold Change de 1.01079315236001) e o Estrogen receptor 1 (*ESR2*) foi altamente expresso na fase luteal (Log Fold Change de -1.10402057614656).

Na Tabela 3 são demonstrados os 100 genes mais expressos na fase folicular e luteal de bovinos encontrados na avaliação. O BPI fold containing family A, member 2^a (*BPIFA2A*) foi altamente expresso (Log Fold Change de 10.4876703575293) na fase folicular. Bem expresso na fase luteal em bovinos Tabela 3, o angiotensinogênio (*AGT*) (Log Fold Change de -7.72323486386274), participante do sistema renina-angiotensina (SRA). Os 100 genes mais expressos na fase folicular e luteal da cérvix de ovelhas são demonstradas na Tabela 4. Encontrado na fase folicular, o Trefoil factor 1 (*TFF1*) (Log Fold Change 5.31535865509055), já na fase luteal, o ADAM metallopeptidase domain 7 (*ADAM7*) foi o gene mais expresso (Log Fold Change de 5.58250234721926).

Os genes considerados exclusivos na cérvix bovina na fase folicular e luteal são apresentados na Tabela 5. Foram encontrados 23 genes, sendo 17 genes na fase folicular (Log Fold Change Positivo) e 6 genes na fase luteal (Log Fold Change Negativo). O BPI (*BPIFA2B*) foi o mais expresso na fase folicular da cérvix bovina (Log Fold Change de 8.01169488659356) e o Retinol dehydrogenase 16 (*RDH16*) (Log Fold Change de -5.30278893747946) mais expresso na fase luteal.

3. DISCUSSÃO

A cérvix é uma estrutura fibrosa complexa que sofre modificações estruturais de acordo com a fase do ciclo estral. Na fase folicular a cérvix fica mais aberta

para a recepção e transporte de espermatozoides (1). Já na fase luteal o canal cervical fica totalmente fechado para proteção contra microrganismos patogênicos (10). Existe um interesse biotécnico na dilatação cervical durante a fase luteal em ovelhas devido à dificuldade de transposição da cérvix. Existe na literatura mais informações relacionadas a bovinos. Assim, uma comparação dos mecanismos entre ovinos e bovinos pode ser uma alternativa para melhor entendimento do evento relaxamento cervical. Nossos achados apontam para diferenças moleculares na fisiologia cervical de bovinos e ovinos.

Na fase folicular de bovinos foram encontrados 4 genes diferentemente expressos: *TFF1*, *TMPRSS11BNL*, *LOC112441508* e *BPIFA2B*. O *TFF1* é codificado por um gene responsivo ao estrogênio (11,12). Há relatos de que síntese de mucinas secretoras é tipicamente acompanhada por co-secreção de peptídeos de TTF (13). Os peptídeos TFF ajudam a manter a integridade da superfície de epitélios mucosos. A expressão de *TFF1* já foi relatada em pequenas quantidades na endocérvice humana (14). Esses peptídeos trifílicos estão envolvidos na proteção e restaurações de epitélios (15) além de se ligarem a mucinas (16,17) e proteínas associadas à mucina (18). Na fase folicular tem grande quantidade de produção de muco cervical. Esse muco cervical ajuda na dilatação cervical, devido a liberação de substâncias que se ligam ao colágeno e causam distensão das fibras. A *TMPRSS11B* também encontrada na fase folicular, é um membro da serina protease tipo tripsina tipo II (19), expressa na superfície celular (20). Há relatos de dados da análise de imuno-histoquímica que mostram que *TMPRSS11B* é expressa em tecidos de alguns tipos de câncer (20). As serinas proteases estão relacionadas expressão de citocinas pró-inflamatórias (21). O processo inflamatório é importante no mecanismo de dilatação, pois recruta células de defesas. O neutrófilo por exemplo, parece ser um importante componente para o amolecimento cervical, pois a colagenase liberada por neutrófilos é muito importante para o rompimento das fibras colágenas, que são os principais elementos estruturais da cérvix. Esse rompimento causa distensão do órgão (22).

O *BPIFA2B*, altamente expresso na fase folicular da cérvix bovina, é encontrado nos grânulos secretores dos neutrófilos e é secretado em resposta à ativação da sinalização mediada pelo receptor Toll-like (TLR), em que atua como uma proteína efetora imune inata permeabilizando a membrana plasmática de

bactérias Gram negativas (23)(24,25). No estro a cérvix fica aberta sob o efeito do estrógeno, com isso o canal aberto permite a entrada de bactérias da microbiota normal da vagina para o interior do lúmen uterino. Assim, o *BPIFA2B* pode ter seu papel relacionado a atividade antimicrobiana. Esse gene também é considerado exclusivo na cérvix bovina na fase estral (Tabela 5).

Na fase luteal em bovinos, os 5 genes diferentemente expressos foram *ENSBTAG00000011470*, *TMIE*, *TDGF1*, *LRP2*, *SLC30A8*. O *TMIE* já relatado em camundongos e ratos adultos é expresso em vários tecidos (26). No entanto, ainda é incerto o papel do *TMIE*, apenas há conclusões de alterações em camundongos com déficit de *TMIE* no ouvido interno, pois este gene está envolvido mecanotransdução sensorial nas células ciliadas da cóclea (27). Em outros tecidos, seja em humanos, ratos ou outros mamíferos, não há relatos das funções de *TMIE*. Já foi identificado o inibidor de proteína de STAT3 como um potencial parceiro de ligação (28). O STAT3 já é relatado na remodelação do estroma e epitélio uterino na fase luteal, principalmente durante a implantação embrionária (29). Com isso, o *TMIE* pode estar envolvido na mecanotransdução de sinais que envolvam modificações estruturais na cérvix.

O *TDGF1* é um membro da família do fator de crescimento epidérmico (EGF) - Cripto-1 / ligante relacionado ao fator de crescimento fibroblástico (FRL1) e atua como ligante para ativação da via src-Akt (30) e está envolvido na embriogênese e tumorigênese (31,32). (33) Sua participação é essencial para o desenvolvimento embrionário inicial e mantém a pluripotência das células-tronco embrionárias em camundongos e em bovinos (34,35). Formas solúveis secretadas de *TDGF1* também podem ativar a via PI3K/Akt (36). Semelhante a outros membros da família EGF, pode estimular a proliferação celular, migração, angiogênese, invasão, sobrevivência celular e transição epitelial-mesenquimal (37,38). A cérvix sofre mudanças físicas e estruturais ao decorrer das fases do ciclo estral, assim, como esse gene está totalmente relacionado com a estimulação, crescimento e a diferenciação celular, sua ação pode estar ligada a essas mudanças físicas no órgão. Outro gene altamente expresso na fase luteal em bovinos é o *LEP2*, um receptor endocítico e fortemente expresso em tipos de células epiteliais e de tecidos responsivos a esteroides, particularmente nos órgãos reprodutivos masculinos e femininos, como epidídimo, próstata, ovários e útero (39). A sua ação nos sistemas reprodutivos femininos está

relacionada à alteração da arquitetura uterina sendo regulados positivamente por P4 (40). Assim, é um gene que também pode ter efeitos sobre as características mecânicas cervicais.

Em ovinos, fase folicular os 5 genes foram diferentemente expressos, *DRD2*, *ENSOARG00020011601*, *SLURP1*, *ENSOARG00020000537*, *KRTDAP*. O *DRD2* que é considerado um receptor de dopamina com função no controle motor e atividades neuroendócrinas (41). Nos órgãos reprodutivos masculinos, o *DRD2* tem sido relacionado a estimulação da ereção peniana, mediada pela via da ocitocina. (42,43). Em fêmeas, a ocitocina é uma das responsáveis pela excitabilidade e contratilidade do útero, desta forma, *DRD2* como receptor dopaminérgico, pode atuar direto ou indiretamente para que ocorra esses estímulos. O *SLURP1* facilita o desenvolvimento funcional de células T e suprime a produção de TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) por células T, secreção de IL-1 b e IL-6 por macrófagos, e em humanos a secreção de IL-8 pelo intestino (44). Essa afinidade pelas interleucinas e pelo fator de necrose tumoral, pode ter ligação ao mecanismo de dilatação cervical, pois essas interleucinas atuam ativamente sob a remodelação celular da cérvix e, conseqüentemente, sob o relaxamento cervical (45,46). Esses dois genes também estão em destaque entre os 100 genes mais expressos na fase folicular de ovelhas (Tabela 4).

Na fase luteal os genes mais diferentemente expressos foram, *ENSOARG00020024493*, *ADAM7*, *KRT85*, *ENSOARG00020010220*, *ENSOARG00020015599*. O *ADAM7* já é relatado como predominantemente expresso no epidídimo e na pituitária anterior masculina e feminina (47). Mais recentemente, foi relatado que a superexpressão de *ADAM7* promoveu fortemente a proliferação, migração e invasão celular e inibiu a apoptose celular em células trofoblásticas (48). Ainda, há relatos de que metaloproteinases de matriz, como é o caso do *ADAM7*, promovem a degradação do colágeno, na intenção regular a sobrevivência, o crescimento, a migração e a invasão das células cancerígenas (49,50). Como o colágeno é um dos componentes da cérvix, é sugerido que esse gene também atue nesse órgão, causando modificações. Durante a dilatação cervical, ocorre a separação dos feixes de colágeno por meio de uma maior perfusão hídrica na membrana extracelular cervical e uma degradação do colágeno por metaloproteinases de matriz (51). Kershaw et al. (2007) e Rodríguez-Piñón et al. (2015) (52,53) sugerem que a

desagregação das fibras de colágeno ocorre desde a fase lútea tardia até a ovulação, seguida pela degradação enzimática do colágeno. Esse gene também está em destaque entre os 100 genes mais expressos na fase luteal de ovelhas (Tabela 4).

Nas nossas análises os *Hoxb* genes foram encontrados tanto em bovinos quanto em ovinos e a sua regulação pode estar envolvida na via PI3K/Akt. Os genes *Hox* são considerados membros da família de fatores de transcrição homeóticos, são eles que vão especificar e direcionar a formação dos tecidos no embrião (9). Os genes *Hox* codificam uma classe de fatores de transcrição que desempenham um papel importante na padronização do desenvolvimento axial dos vertebrados (54,55). O *Hoxb2* parece estar envolvido especificamente no desenvolvimento de neurônios motores (56). O *Hoxb9*, controla a especificação dos elementos esqueléticos torácicos e o desenvolvimento da glândula mamária e na regulação de vários cânceres humanos (54,55,56,57). *Hoxb8*, já foi relatado que a sua superexpressão em células progenitoras hematopoiéticas, na presença de altas concentrações de IL-3, permite a geração de linhagens de células mieloides dependentes de fator de crescimento capazes de autorrenovação (61–63). (64) forneceu evidências de que a expressão diferencial de alguns genes *Hox*, como os *Hoxb2*, *Hoxb4*, *Hoxb9* podem estar envolvidos na diferenciação de músculos, onde esses genes parecem modular o destino muscular das células satélites durante a miogênese. Mas no geral, o papel dessas proteínas *Hox* no epitélio cervical ainda não são esclarecidas (65).

Esses *Hoxb* genes parecem estar envolvidos em diversos processos biológicos, como na formação de órgãos e músculos (66). Como a cervix passa por diferenças estruturais, químicas e biológicas ao longo do ciclo estral (1), esses *Hox* genes podem modular alguns mecanismos de transformação dos tecidos cervical.

A via de sinalização PI3K/Akt foi encontrada tanto em bovinos e ovinos podendo ser regulada de forma diferente em ambas as espécies (Figura 1 e 2). A PI3K/Akt está envolvida em diferentes processos de sinalização, que vão desde a apoptose até processos de metabolismo celular. A via PI3K/Akt aparece com destaque em ambas as espécies e pode estar envolvida nos mecanismos de transdução de sinais em diferentes sistemas e órgãos. Para que ocorra a comunicação entre as células, são necessárias vias de sinalização para

comandar e mediar diversas funções, sejam, migrações, diferenciações, proliferações ou morte (67). A PI3K/Akt desempenha papéis importantes no controle e equilíbrio nos organismos multicelulares. Alguns estudos já documentaram a cascata de sinalização da via PI3K/Akt e seu envolvimento na regulação da sobrevivência celular e inibição apoptótica (68), bem como, atuação na captação de glicose e consequente envolvimento no metabolismo (69,70). A via PI3K/Akt tem sido relatada como um importante caminho de sobrevivência de células eucarióticas, sendo a serina de Akt/treonina quinase considerada o ponto chave da sinalização. Além disso, a Akt ativada direciona um sinal antiapoptótico, protegendo assim até células cancerosas (71). Seu envolvimento também está relacionado a regulação da atividade funcional de diversas proteínas, o que vem a desencadear diferentes respostas biológicas. Assim, a fosforilação ou desfosforilação pode controlar ou regular processos biológicos específicos, catalizando enzimas, regulando canais iônicos, fatores de transcrição, localização intracelular de proteínas, regulação do citoesqueleto e atividade de receptores (72).

Alguns genes encontrados no nosso estudo já têm sido relatados com envolvimento com a via PI3K/Akt. Como o *TDGF1*, *DRD2*, *HOXB2* (33, 57, 70) No entanto, mostramos que o PI3K/Akt pode estar modulando a maioria dos genes apresentados, pois aparece nas análises como uma das vias mais expressas tanto em ovinos como em bovinos. Os *HOXB* genes também estão modulando ou são modulados pela via PI3K/Akt nas duas espécies (Figura 5 e 6). Como essa via está relacionada a diversos processos biológicos, ela pode ser uma via interessante na regulação dos mecanismos de relaxamento cervical. O seu estímulo ou bloqueio podem desencadear alterações cervicais, já que existe a sua relação com diversos genes que supostamente participam do processo de dilatação da cérvix.

O gene chave mais expresso na fase folicular em bovinos foi o *MUC1* (Tabela 1). Esse gene possui papel fundamental no mecanismo cervical, pois há uma interação do muco cervical com as células de colágeno, pois nesse muco contém glicoproteínas e enzimas específicas que podem atuar direta ou indiretamente no colágeno. (Fair et al., 2005). Além disso, esse gene codifica uma proteína ligada à membrana que é membro da família das mucinas, essas desempenham um papel essencial na formação de barreiras mucosas protetoras

nas superfícies epiteliais (74). O muco cervical pode variar em relação suas propriedades de acordo com a fase estral, atribuindo a necessidade fisiológica para transporte de espermatozoides, atuar como agente antimicrobiano e também sendo barreira natural na fase luteal do ciclo e durante a prenhez (75). Já é relatado que os genes da mucina mostram forte correlação com o aumento dos níveis de estradiol (76) e que alta expressão cervical de *MUC1* durante a dominância de estrogênio intensifica o seu papel conhecido como barreira antimicrobiana (77,78) principalmente quando a cérvix está aberta.

O gene chave mais expresso na fase folicular de ovelhas foi o *ESR1*, já na fase luteal foi o *ESR2* (Tabela 2). A presença de *ESR1* é o principal determinante da regulação do gene *OXTR* no epitélio endometrial (79). Esses envolvidos no relaxamento e contração muscular. *ESR2* já foi relatada em todos os compartimentos dos tecidos uterino e útero-placentário, sendo a expressão constante ao longo do início da gravidez (80). Esses receptores possuem papel fundamental para a dilatação, pois o estradiol está totalmente envolvido no mecanismo de relaxamento cervical, pois induz indiretamente o relaxamento da musculatura lisa e o remodelamento da matriz extracelular (51). Além disso, o incremento de estrogênios durante a fase folicular de ovelhas em ciclo estral está associado ao relaxamento cervical natural no estro (1).

Mais expressa na fase folicular em bovinos (Tabela 3) a *BPIFA2A* é uma proteína catiônica armazenada em leucócitos com potente atividade anti-endotoxina e efeitos bactericidas altamente seletivos em bactérias Gram-negativas (81,82). Como essa proteína é considerada bactericida (83), seu papel pode estar relacionada a atividade antimicrobiana no canal cervical. Já na fase luteal, o *AGT* (Tabela 3) é um participante do sistema renina-angiotensina (SRA) e bem conhecido por seu papel regulador da pressão arterial e da homeostase dos fluidos corporais (84). Seu papel parece estar envolvido no efeito vasoconstritor, apoptose, angiogênese e proliferação celular em diversos tipos celulares (84). Em ovinos, o *AGT* codifica um produto da angiotensina II, descrito como um vasoconstritor e regulador da angiogênese fetoplacentária na placenta (85). Na cérvix, seu papel ainda não foi elucidado. Mas já é relado que existe efeito da angiotensina com a produção de estradiol, no entanto esse mecanismo ainda não é totalmente conhecido (86,87). Segundo Giani et al. (2007) e Sampaio et al. (2007) (88,89) a angiotensina pode desempenhar um papel na

produção de estradiol através de sinalização da PI3K/Akt.

Nossas análises indicam vias e genes que podem atuar diretamente no relaxamento cervical. A via PI3/Akt e os genes *Hoxb* aparecem em destaque, podendo modular e serem modulados em mecanismos que envolvam alterações na cérvix. Um estudo mais detalhado com bloqueio ou estimulação dessa via e desses genes na cérvix devem ser realizados para avaliar a dilatação cervical durante a fase luteal.

4. CONCLUSÃO

Os genes diferencialmente expressos e os processos biológicos divergentes indicam diferenças relacionadas ao relaxamento cervical de vacas e ovelhas. A PI3K/Akt parece ser uma importante via no processo de relaxamento cervical. Estudos *in vivo* de bloqueio ou estimulação dessa via devem ser realizados para avaliação do relaxamento cervical na fase estral de ovelhas.

5. MÉTODOS

5.1 Bioinformática para obtenção e processamento dos dados

Os dados transcriptômicos da cérvix bovina na fase folicular e luteal foram disponibilizados por Pluta et al. (2012) (76) e de ovinos por Abril-Parreño et al. (2021) (90), com os conjuntos de dados gerados e/ou analisados disponíveis no NCBI Gene Expression Omnibus <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> sob o número de acesso GSE38225 para bovinos e GSE179486 para ovinos.

Os arquivos contendo os dados de expressão gênica global (transcriptoma) por RNA-seq de cérvix na fase folicular e luteal foram obtidos no Gene Expression Omnibus do NCBI (GEO). Como critério para seleção dos dados foi adotado como critério apenas amostras de estudos que continham as informações relativas à plataforma de sequenciamento utilizada, dando preferência para estudos que os disponibilizaram na forma “brutos”, contendo informações fisiológicas relativas as amostras e pôr fim a qualidade dos dados disponibilizados.

Foi feito o “download” dos arquivos em formato SRA diretamente do GEO para o cluster do Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia da

FZEA-USP. Todos os dados tiveram a qualidade de sequenciamento verificada pelo software FASTQC, seguido da remoção das reads de acordo com a qualidade dos dados (“trimagem”) com o software TRIM GALORE, ambos softwares do instituto Brabahan (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/index.html>).

Após feita a seleção por qualidade das “reads” verificamos a qualidade com o pacote do R fastqcr (Kassambra et al., 2019). As amostras que passaram pelo teste de qualidade foram então alinhadas com o genoma de referência da espécie disponível no ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>), com o software RSUBREAD (Liao et al., 2019), utilizando os parâmetros padrões do software adequados para cada tipo de biblioteca das amostras. A qualidade do alinhamento foi então verificada e um relatório final será gerado usando o software MULTIQC (Ewels et al., 2016).

5.2 Análise de diferença de expressão e assinaturas gênicas

A análise de diferença de expressão gênica foi realizada com o pacote DESEQ2 (Love; Huber; Anders, 2014) do software R (R Core Team, 2020), foi realizada a análise exploratória dos dados através da análise de componentes principais (PCA) para os contrastes entre as situações fisiológicas da cérvix e entre espécies.

Para um gene ser considerado diferentemente expresso foi adotado um valor de p ajustado menor que 0,1 ($p_{adj} < 0,1$), pelo método de Benjamini-Hochberg (“BH”) e um valor absoluto de “log₂ fold change” maior que 2. Para a representação dos valores de expressão gênica foi utilizada a transformação de normalização da variância (função “varianceStabilizingTransformation” do pacote DESEQ2) que também servirá de “input” para os dados para a análise de co-expressão gênica.

As análises de co-expressão gênica serão utilizadas para se buscar perfis transcricionais, “assinaturas gênicas”, nas amostras nas diversas fases fisiológicas das cérvix e espécies. Nesta fase utilizamos o algoritmo SOTA (“Self-organizing Tree

Algorithm”) do pacote cIValid (Brock et. al.; 2008) do R, o pacote CEMiTool (Russo et al., 2018) e o pacote CeTF (De Biagi Junior et al., 2020).

Após a seleção dos genes, foi feita a análise de ontologia gênica e enriquecimento de vias com o pacote ClusterProfiler (Yu et. Al.; 2012) do software R. A princípio investigamos as funções biológica, moleculares e os componentes celulares envolvidos, complementarmente investigamos as vias curadas no KEGG (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”) e REACTOME. Para visualização dos resultados foram construídas redes de interação gênica e de vias utilizando o ClusterProfiler e o Cytoscape (Shannon et al., 2003).

5.3 Análise dos resultados

As análises exploratórias e estatísticas foram realizadas com o software R[®], os dados serão sempre estudados quanto a suas propriedades, levando sempre em consideração o tipo de distribuição encontrada e o teste mais apropriado para cada situação. Assim, a estrutura multivariada dos dados contida no conjunto de dados foi explorada por técnicas de agrupamento, discriminação e redução de dimensões. Brevemente para análises comparativas após a confirmação da homoscedasticidade dos dados pelo teste de Levene e normalidade dos dados pelo teste de Cramér-Von Mises foi feita a análise de variância (ANOVA) dos dados quantitativos para avaliar as respostas, a comparação de médias dos pares será feita usando o teste de Tukey, com valor de $p < 0,05$. Quando a natureza dos dados não permitiu a utilização de teste paramétricos foi utilizado os testes não paramétricos que melhor se ajustarem a situação. A análise de possíveis relações entre variáveis foi feita por análise correlação de Spearman.

6. REFERÊNCIAS

1. Kershaw, C.M.; Khalid, M.; MCGowan, M.R.; Ingram K., Leethongdee, S.; Wax, G.; Scaramuzzi RJ. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*. 2005;64:1225–1235.
2. Candapp, I.B.R., Bartlewski PM. Induction of cervical dilation for

- transcervical embryo transfer in ewes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12:8.
3. Fonseca, J.F.; Souza-Fabjan, J.M.G.; Oliveira, M.E.F.; Leite CR., Nascimento-Penido, P.M.P.; Brandão, F.Z.; Lehloenya KC. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 2016;86:144–151.
 4. Fonseca, J.F.; Zambrini, F. N.; Guimarães, J. D.; Silva, M. R.; Oliveira, M.E.F.; Brandão, F.Z.; Bartlwowski, P.M.; Souza-Fabjan JMG. Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. *Reprod Domest Anim*. 2019;54:118–125.
 5. LANDIM-ALVARENGA FC. Parto Normal. In: Prestes NC, LANDIM-ALVARENGA, F.C. (Ed.1). *Obstetrícia Veterinária*. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan LTDA,. 2021. 83–96 p.
 6. Wagner GP, Nnamani MC, Chavan AR, Maziarz J, Protopapas S, Condon J, et al. Evolution of Gene Expression in the Uterine Cervix related to Steroid Signaling: Conserved features in the regulation of cervical ripening. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
 7. Lin, Y.-H., McLenachan, P. A., Gore, A. R., Phillips, M. J., Ota, R., Hendy, M. D., & Penny D. Four new mitochondrial genomes and the increased stability of evolutionary trees of mammals from improved taxon sampling. *Mol Biol Evol*. 2002;19:2060–2070.
 8. Liu, Y.; Chen, T, Y.; Yang, Z.Y.; Fang, W.; Wu, Q.; Zhang C. Identification of hub genes in papillary thyroid carcinoma: robust rank aggregation and weighted gene co-expression network analysis. *J Transl Med*. 2020;18:170.
 9. Lappin, T.R.J.; Grier, D.G.; Thompson A. HHL. HOX GENES: Seductive Science, Mysterious Mechanisms. *Ulster Med J*. 2006;75:23–31.
 10. Evans, G.; Maxwell WMC. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza. 1990;192.
 11. Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, F., Krust, A., Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(24):7895–903.
 12. May FEB, Westley BR. Identification and characterization of estrogen-

- regulated RNAs in human breast cancer cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1988;263(26):12901–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)37646-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37646-4)
13. Wright NA, Hoffmann W, Otto WR, Rio MC, Thim L. Rolling in the clover: Trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* [Internet]. 1997;408(2):121–3. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00424-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00424-9)
 14. Wiede A, Hinz M, Canzler E, Franke K, Quednow C, Hoffmann W. Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res*. 2001;303(1):109–15.
 15. Taupin D PD. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:721–732.
 16. Ruchaud-Sparagano MH, Westley B MF. The trefoil protein TFF1 is bound to MUC5AC in humangastric mucosa. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:1946–1954.
 17. Tomasetto C, Masson R, Linares J, Wendling C, Lefebvre O, Chenard MP, et al. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. *Gastroenterology*. 2000;118(1):70–80.
 18. Albert TK, Laubinger W, Müller S, Hanisch FG, Kalinski T MF, W. H. Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide. *J Proteome Res*. 2010;9:3108–3117.
 19. Bugge TH, Antalis TM, Wu Q. Type II transmembrane serine proteases. *J Biol Chem*. 2009;284(35):23177–81.
 20. Miller, G.S.; Zoratti, G.L.; Murray, A.S.; Bergum, C.; Tanabe, L.M.; List K. HATL5: A cell surface serine protease differentially expressed in epithelial cancers. *PLoS One*. 2014;9:87675.
 21. Sales, K.U.; Friis, S.; Abusleme, L.; Moutsopoulos, N.M.; Bugge TH. Matriptase promotes inflammatory cell accumulation and progression of established epidermal tumors. *Oncogene*. 2015;34:4664–4672.
 22. Gusmão AL. State-of-the-art in the transcervical embryo collection in goats and sheep. *Acta Sci Vet*. 2011;39:37–42.
 23. Bingle CD, Seal RL, Craven CJ. Systematic nomenclature for the PLUNC/PSP/BSP30/SMGB proteins as a subfamily of the BPI fold-

- containing superfamily. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(4):977–83.
24. Weiss J, Elsbach P, Olsson I, Odeberg H. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* [Internet]. 1978;253(8):2664–72. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40872-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40872-6)
 25. Rajan GH, Morris CA, Carruthers VR, Wilkins RJ, Wheeler TT. The relative abundance of a salivary protein, bSP30, is correlated with susceptibility to bloat in cattle herds selected for high or low bloat susceptibility. *Anim Genet.* 1996;27(6):407–14.
 26. Kyoung In Cho, Jun-Gyo Suh, Jeong Woong Lee, Sung Hwa Hong, Tae-Cheon Kang, Yang-Seok Oh ZYR. The circling mouse (C57BL/6J-cir) has a 40-kilobase genomic deletion that includes the transmembrane inner ear (tmie) gene. *Comp Med.* 2006;56(6):476–81.
 27. Shin MJ, Lee JH, Yu DH, Kim HJ, Bae KB, Yuh HS, et al. Spatiotemporal expression of tmie in the inner ear of rats during postnatal development. *Comp Med.* 2010;60(4):288–94.
 28. Gleason, M. R.; Nagiel, A.; Jamet, S.; Vologodskaya, M.; Lopez-Schier, H.; Hudspeth AJ. The transmembrane inner ear (Tmie) protein is essential for normal hearing and balance in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106:21347–21352.
 29. Takehiro, H.; Yasushi, H.; Yamato, F.; Mona, G.; Tetsuaki, K.; Shizu, A.; Tomoyuki, H.; Shun, A.; Mitsunori, M.; Hirofumi, H.; Mayuko, S.K.; Ryoko, S.H.; Norihiko, T.; Osamu, Y.; Tomoyuki, F.; Yutaka O. Differential roles of uterine epithelial and stromal STAT3 coordinate uterine receptivity and embryo attachment. *Sci Rep.* 2020;10:10.1038/s41598-020-72640-0.
 30. Skinner, M. K.; Schmidt, M.; Savenkova, M. I.; Sadler-Riggelman, I.; Nilsson EE. Regulation of granulosa and theca cell transcriptomes during ovarian antral follicle development. *Mol Reprod Dev.* 2008;75:1457–1472.
 31. Kenney, N.J.; Adkins.; H.B.; Sanicola M. Nodal and Cripto-1: Embryonic pattern formation genes involved in mammary gland development and tumorigenesis. *Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2004;9:133–144.
 32. Strizzi, L.; Bianco, C.; Normanno, N.; Salomon D. Cripto-1: A multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis.

- Oncogene. 2005;24:5731–5741.
33. Gershon E, Hadas R, Elbaz M, Booker E, Muchnik M, Kleinjan-Elazary A, et al. Identification of Trophectoderm-Derived Cripto as an Essential Mediator of Embryo Implantation. *Endocrinology*. 2018;159(4):1793–807.
 34. Fiorenzano, A.; Pascale, E.; D’Aniello, C.; Acampora, D.; Bassalert, C.; Russo, F.; Andolfi, G.; Biffoni, M.; Francescangeli, F.; Zeuner, A.; Angelini, C.; Chazaud C. Cripto is essential to capture mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell pluripotency. *Nat Commun*. 2016;7:12589.
 35. Wei, Q.; Zhong, L.; Zhang, S.; Mu, H.; Xiang, J.; Yue, L.; Han J. Bovine lineage specification revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst†. *Biol Reprod*. 2007;97:5–17.
 36. Gray PC, Vale W. Cripto/GRP78 modulation of the TGF- β pathway in development and oncogenesis. *FEBS Lett [Internet]*. 2012;586(14):1836–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.01.051>
 37. Bianco C, Rangel MC, Castro NP, Nagaoka T, Rollman K, Gonzales M, et al. Role of Cripto-1 in stem cell maintenance and malignant progression. *Am J Pathol [Internet]*. 2010;177(2):532–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.100102>
 38. Rangel, M.C.; Karasawa, H.; Castro, N.P.; Nagaoka, T.; Salomon, D.S.; Bianco C. Role of Cripto-1 during epithelial-to-mesenchymal transition in development and cancer. *Am J Pathol*. 2012;189:2188–2200.
 39. Zeng, X.; Goetz, J. A.; Suber, L. M.; Scott, W. J.; Schreiner, C. M.; Robbins DJ. A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature*. 2001;411:716–720.
 40. Oh, S. J.; Kim, T. H.; Lim, J. M.; Jeong JW. Progesterone induces expression of Lrp2 in the murine uterus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441:175–179.
 41. Seeman, P.; Van Tol HH. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmac Sci*. 1994;15:264–270.
 42. Hellstrom J-SHTJBMRBD-YYSLAA-MK-DKWJG. Localization of peripheral dopamine D1 and D2 receptors in rat corpus cavernosum. *BJU Int*. 2002;90:105–112.
 43. Melis, M.R.; Stancampiano, R.; Argiolas A. Hippocampal oxytocin

- mediates apomorphine-induced penile erection and yawning. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992;42:61–66.
44. Lyukmanova, N.E.; Shulepko, M.A.; Kudryavtsev, D.; Bychkov, M.L.; Kulbatskii, D.S.; Kasheverov, I.E.; Astapova, M.V.; Feofanov, A.V.; Thomsen, M.S.; Mikkelsen, J.D.; Shenkarev, Z.O.; Tsetlin, V.I.; Dolgikh, D.A.; Kirpichnikov MP. Human secreted Ly-6/uPAR related protein-1 (SLURP-1) is a selective allosteric antagonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor,. *PLoS One.* 2016;11:0149733.
 45. Leppert PC. Cervical softening, effacement, and dilatation: A complex biochemical cascade. *J Matern Neonatal Med.* 1992;1:213–223.
 46. Chwalisz, K.; Benson, M.; Scholz, P.; Daum J.; Beier, M.; Hegele-Hartung C. Cervical ripening with the cytokines interleukin 8, interleukin 1 β and tumour necrosis factor α in guinea-pigs. *Hum Reprod.* 1994;9:2173–2181.
 47. Cornwall, Gail A.; Hsia N. A Member of the ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) Gene Family Is Specifically Expressed in the Mouse Anterior Pituitary and Epididymis ¹. *Endocrinology.* 1997;138(10):4262–4272.
 48. Li, Y., Li, J., & Yang D. ADAM7 promotes the proliferation and invasion in trophoblast cells. *Exp Mol Pathol.* 2021;121:1046–59.
 49. De Rensis F, Valentini R, Gorrieri F, Bottarelli E, Lopez-Gatius F. Inducing ovulation with hCG improves the fertility of dairy cows during the warm season. *Theriogenology.* 2008;69(9):1077–82.
 50. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:422–433.
 51. Kershaw-Young, C.M.; Khalid, M.; McGowan, M.R.; Pitsillides, A.A.; Scaramuzzi RJ. The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology.* 2009;72:251–261.
 52. Kershaw, C.M.; Scaramuzzi, R.J.; McGowan, M.R.; Wheeler-Jones, C.P.; Khalid M. The expression of prostaglandin endoperoxide synthase 2 messenger RNA and the proportion of smooth muscle and collagen in the sheep cervix during the estrous cycle. *Biol Reprod.* 2007;76:124–129.
 53. Rodríguez-Piñón, M.; Tasende, C.; Casuriaga, D.; Bielli, A.; Genovese, P.; Garófalo EG. Collagen and matrix metalloproteinase-2 and -9 in the

- ewe cervix during the estrous cycle. *Theriogenology*. 2015;84:818-826.
54. Mallo, M.; Wellik, D.M.; Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev Biol*. 2010;244(1):7-15.
 55. Wellik DM. Hox genes and vertebrate axial pattern. *Curr Top Dev Biol*. 2009;88:257–278.
 56. Davenne, M.; Maconochie, M.K.; Neun, R.; Pattyn, A.; Chambon, P.; Krumlauf, P; Rijli FM. Hoxa2 and Hoxb2 control dorsoventral patterns of neuronal development in the rostral hindbrain. *Neuron*,. 1999;4:22.
 57. Chen, F.; Capecchi MR. Paralogous mouse Hox genes, Hoxa9, Hoxb9, and Hoxd9, function together to control development of the mammary gland in response to pregnancy. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:541–546.
 58. Sakiyama, J.; Yokouchi, Y.; Kuroiwa A. Coordinated expression of Hoxb genes and signaling molecules during development of the chick respiratory tract. *Dev Biol*. 2000;227:12–27.
 59. Zhan, J.; Wang, P.; Niu, M.; Wang, Y.; Zhu, X.; Guo, Y.; Zhang H. High expression of transcriptional factor HoxB9 predicts poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Histopathology*. 2015;66:955–965.
 60. Sha, S.; Gu, Y.; Xu, B.; Hu, H.; Yang, Y.; Kong, X.; Wu K. Decreased expression of HOXB9 is related to poor overall survival in patients with gastric carcinoma. *Dig Liver Dis*. 2013;45:422–429.
 61. Perkins, A.C.; Cory C. Conditional immortalization of mouse myelomonocytic, megakaryocytic and mast cell progenitors by the Hox-2.4 homeobox gene. *EMBO J*. 1993;12:3835–3846.
 62. Ekert, P.G.; Read, S.H.; Silke, J.; Marsden, V.S.; Kaufmann, H.; Hawkins, C.J.; Gerl, R.; Kumar, S.; Vaux DL. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol*. 2004;165:835–842.
 63. Ekert, P.G.; Jabbour, A.M.; Manoharan, A.; Heraud, J.E.; Yu, J.; Pakusch, M.; Ewa, M.; Priscilla, N.; Bernard Callus, K.; Kiefer, T.; Verhagen, A.; Silke, J.; Strasser, A.; Borner, C.; Vaux DL. Cell death provoked by loss of interleukin-3 signaling is independent of Bad, Bim and PI3 kinase, but depends in part on Puma. *Blood*. 2006;108:1461.
 64. De las Heras-Saldana, S.; Chung, K. Y.; Lee, S. H.; Gondro C. Gene expression of Hanwoo satellite cell differentiation in longissimus dorsi and

- semimembranosus. *BMC Genomics*. 2019;20.
65. Gonzalez-Herrera, A.L.; Salgado-Bernabe, M.; Velazquez-Velazquez, C.K.; Salcedo-Vargas, M.; Andrade-Manzano, A.; Avila-Moreno, F.; Pina-Sanchez P. Increased Expression of HOXB2 and HOXB13 Proteins is Associated with HPV Infection and Cervical Cancer Progression. *Asian Pac J Cancer Prev*,. 2015;16:1349–53.
 66. Houghton, L.; Rosenthal N. Regulation of a muscle-specific transgene by persistent expression of hox genes in postnatal murine limb muscle. *Dev Dyn*. 1999;216:385–97.
 67. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103(2):239–52.
 68. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: A play in three acts. *Genes Dev*. 1999;13(22):2905–27.
 69. Kohn AD, Kovacina KS, Roth RA. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J*. 1995;14(17):4288–95.
 70. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*. 1996;271(49):31372–8.
 71. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261–74.
 72. Geengard P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* (80-). 2001;294:1024–30.
 73. Ramírez, A.R.; Castro, M.A.; Ramio, C.A.L., Rivera, M.M.; Torres, M.; Rigau, T.; Rodríguez-Gil, J.E.; Concha II. The Presence and Function of Dopamine Type 2 Receptors in Boar Sperm: A Possible Role for Dopamine in Viability, Capacitation, and Modulation of Sperm Motility¹. *Biol Reprod*. 2009;80:753–761.
 74. Fahy JV DB. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med*. 2010;363:2233–2247.
 75. Eriksen G V., Carlstedt I, Uldbjerg N, Ernst E. Cervical mucins affect the motility of human spermatozoa in vitro. *Fertil Steril*. 1998;70(2):350–4.
 76. Pluta, K.; McGettigan, P. A.; Reid, C. J.; Browne, J. A.; Irwin, J. A.;

- Tharmalingam, T.; Corfield, A.; Baird, A.; Loftus, B. J.; Evans, A. C. O.; Carrington SD. Molecular aspects of mucin biosynthesis and mucus formation in the bovine cervix during the peri-estrous period. *Physiol Genomics*. 2012;44:1165–1178.
77. Brayman M, Thathiah A CD. MUC1: a multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:4.
 78. McAuley JL, Linden SK, Png CW, King RM, Pennington HL G, SJ, Florin TH, Hill GR, Korolik V MM. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J Clin Invest*. 2007;117:: 2313–2324.
 79. Osteen, K.G.; Rodgers, W.H.; Gaire, M.; Hargrove, J.T.; Gorstein, F.; Matrisian LM. Stromal511 epithelial interaction mediates steroidal regulation of metalloproteinase expression in 512 human endometrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:10129–33.
 80. Bairagi, Soumi; Grazul-Bilska, Anna T.; Borowicz, Pawel P.; Reyaz, Arshi; Valkov, Veselina; Reynolds LP. Placental development during early pregnancy in sheep: Progesterone and estrogen receptor protein expression. *Theriogenology*. 2018;114:273–84.
 81. Weiss, J.; Elsbach, P.; Shu, C.; Castillo, J.; Grinna, L.; Horwitz, A.; Theofan G. Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria. *J Clin Invest*. 1992;90(3):1122–30.
 82. Elsbach P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol*. 1998;64(1):14–8.
 83. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril* [Internet]. 2013;100(5):1261-1269.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.1991>
 84. Kool MJ, Van De Bree JE, Bodde HE, Elgersma Y, Van Woerden GM. The molecular, temporal and region-specific requirements of the beta isoform of Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase type 2 (CAMK2B) in mouse locomotion. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(March):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26989>

85. Zheng J, Bird IM, Chen DB, Magness RR. Angiotensin II regulation of ovine fetoplacental artery endothelial functions: Interactions with nitric oxide. *J Physiol*. 2005;565(1):59–69.
86. Brosnihan, K.B.; Neves, L.A.A.; Anton, L.; Joyner, J.; Valdes, G.; Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1255–62.
87. Costa, A.S.; Junior, A.S.; Viana, G.E.N.; Muratori, M.C.S.; Costa APR. Inhibition of angiotensin-converting enzyme increases oestradiol production in ewes submitted to oestrous synchronization protocol. *Reprod Domest Anim*. 2014;49:53–5.
88. Giani, J.F.; Gironacci, M.M.; Muñoz, M.C.; Peña, C.; Turun, D.; Dominici FP. Angiotensin-(1 7) stimulates the phosphorylation of JAK2, IRS-1 and Akt in rat heart in vivo: role of the AT1 and Mas receptors. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2007;293:1154–1163.
89. Sampaio, W.O.; Souza Dos Santos, R.A.; Faria-Silva, R.; Da Mata Machado, L.T.; Schiffrin, E.L.; Touyz RM. Angiotensin-(1–7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 2007;49:185–192.
90. Abril-Parreño, L.; Meade KG., Krogenæs, A.K.; Druart, X.; Fair, S.; Cormican P. Conserved and breed-specific differences in the cervical transcriptome of sheep with divergent fertility at the follicular phase of a natural oestrus cycle. *BMC Genomics*. 2021;22(1):1–11.

Tabela 1. Genes chaves na cérvix **bovina** na fase folicular e luteal.

Gene	ID	Log Fold Change	Dif Means	gini_1	gini_2	Mean1	Mean2
ENSBTAG00000046878	ENSBTAG00000046878	0.323090905795746	0.0974687086131434	0.235706990262491	0.150256817634492	2.12500164212631	2.02753293351317
HMG20A	ENSBTAG00000020441	-0.097811620375919	-35.6041149551268	0.150758398078968	0.055365825614059	223.899762583899	259.503877539026
ZNF419	ENSBTAG00000017613	-0.554027692420169	-4.47580907197521	0.194980575222539	0.0806871481349731	7.82256686356427	12.2983759355395
KDM2A	ENSBTAG00000044032	-0.278163633888021	-28.8356191176694	0.0676107738152934	0.0164675188247649	70.3885376362167	99.224156753886
MLF1	ENSBTAG00000004126	-0.325266641627905	-0.232716529183624	0.293391867988911	0.125574877185134	0.829843253362801	1.06255978254643
EAF1	ENSBTAG00000019202	0.153662877986998	-0.68872834124987	0.0755208628590565	0.0598917016902881	17.4318724379855	18.1206007792354
ATXN1L	ENSBTAG00000046255	-0.386820917363827	-58.7855538815191	0.129073736081567	0.0708260078213465	105.67588459104	164.461438472559
PLCB1	ENSBTAG00000008338	0.0263776314191702	0.25523379759435	0.3722674457735	0.225286511119357	11.4034538041402	11.1482200065458
MTA3	ENSBTAG00000004073	-0.737863953960057	-1.02136351434001	0.166499515235935	0.0333845024301732	1.30144418349839	2.3228076978384
CHD4	ENSBTAG00000014734	-0.130782859183929	-6.78320930715659	0.0832530342936934	0.0334759724568583	24.6016587547516	31.3848680619082
SERTAD3	ENSBTAG00000010502	0.137178762257812	-3.30498776424935	0.119601097591744	0.0620024387453041	41.5836528288874	44.8886405931367
PAXIP1	ENSBTAG00000017505	-0.402946136882788	-2.80396781033697	0.0995477836732697	0.0366688036738553	4.9062910235212	7.71025883385816
CNOT11	ENSBTAG00000008267	-0.241937023687223	-3.47670020759057	0.061492036316046	0.0804970145539508	8.41602899555025	11.8927292031408
HDAC3	ENSBTAG00000017360	0.224215468342189	-0.0142271687011091	0.0659028887210294	0.0560509519930072	4.01614752448022	4.03037469318133
PPP1R13L	ENSBTAG00000020689	-0.0700090234373506	-4.54311978602093	0.148848115499664	0.0762984316276214	17.9724270886137	22.5155468746347
MED24	ENSBTAG00000021468	-0.286137172499933	-11.3832112785057	0.174332595167555	0.0953427522916272	25.4681736958781	36.8513849743838
MAPK13	ENSBTAG00000010007	0.660204589458536	4.16958148725283	0.241961568190942	0.0805168388596126	15.887714391138	11.7181329038852
DNM2	ENSBTAG00000013362	-0.284789014273538	-56.6815812569633	0.117254565300117	0.0497941096933369	132.8287126338	189.510293890764
POLR2G	ENSBTAG00000009483	-0.187446185805971	-25.7066726820744	0.0910016855977341	0.0702135471573257	78.314586446408	104.021259128482
HDFG	ENSBTAG00000039793	0.320506261786834	5.48429561132043	0.182160554072257	0.0155602034016393	104.905183948395	99.4208883370741
NCOA7	ENSBTAG00000046503	0.15382574209718	0.173062698618675	0.271179627708595	0.0973093319484125	2.000303035604	1.82724033698532
POLR1A	ENSBTAG00000006481	-0.251278069173389	-2.41805053225654	0.154504542773181	0.0313159547267263	5.85852213794489	8.27657267020144
PCBD1	ENSBTAG00000011866	-1.00054718470556	-55.2553850397195	0.0998312648474659	0.162383011750733	40.7776929514488	96.0330779911683
FHL2	ENSBTAG00000001086	0.485372105894402	1.94472104627881	0.136606376657373	0.086493415258272	11.2951894937647	9.35046844748589
PARP1	ENSBTAG00000000837	-0.363783527108227	-15.4769191237788	0.0398020461504979	0.0849686302412875	32.177613854876	47.6545329786548
CTNND1	ENSBTAG00000002411	-0.248202512839939	-32.9118857998668	0.0413229709870337	0.0641898744322226	87.4259484940269	120.337834293894
HMGB2	ENSBTAG00000015101	0.0951912890051601	0.00753577861681576	0.259541951499165	0.0716464616677119	1.7657280372761	1.75819225865928
GTF2IRD1	ENSBTAG00000006212	0.151755402219555	0.0407206459938303	0.105740675175251	0.0323560133039303	6.29552455959678	6.25480391360295
NCOR1	ENSBTAG00000013271	-0.244658789238636	-27.0169447226311	0.021559098048567	0.0720353525779446	72.102492583073	99.1194373057041
PSMD9	ENSBTAG00000004179	-0.0370806282632892	-18.7471768141625	0.110027436113434	0.07130251572394	82.0294603913207	100.776637205483
AJUBA	ENSBTAG00000012724	-0.529155495055643	-1.61279835853387	0.208629847040172	0.0818242218433426	2.18200704736216	3.79480540589603
CBX8	ENSBTAG00000009107	-0.210447734296982	-1.46510266876569	0.172042185294599	0.079220029624588	3.70213479634887	5.16723746511456
UXT	ENSBTAG00000015820	0.827741369211141	0.548291658019708	0.0934388038067035	0.0479168121332011	1.54252077195433	0.994229113934617
DNMT3A	ENSBTAG00000021143	-0.434134133243991	-8.14509367130768	0.0567895353290105	0.0780697518952753	14.0972897830828	22.2423834543905
MUC1	ENSBTAG00000017104	1.5759491672159	42.8763687088901	0.223296975494568	0.121048657094685	69.9981017066941	27.1217329978039
CASZ1	ENSBTAG00000019818	-0.476760960310648	-13.6617530505828	0.179112085831366	0.0539784354556604	21.6177863357526	35.2795393863354
AKAP8L	ENSBTAG00000010439	-0.830693748870828	-15.8819429664438	0.0754461648341227	0.0822111796622625	14.4085390060616	30.2904819725054
TERF2IP	ENSBTAG00000015686	0.318015273128463	24.8849738754909	0.155105751275222	0.0616124817431729	192.18388228105	167.298908405559
ERBB2	ENSBTAG00000021798	-0.292809880067697	-10.6401816776785	0.175583223517799	0.0542535757904137	24.4191302538498	35.0593119315283
HOXB5	ENSBTAG00000045835	0.00864829046434397	-1.04952052333382	0.225358852349498	0.067074862889544	6.37975612024244	7.42927664357627
MRTFB	ENSBTAG00000008728	-0.624873241342757	-190.379788029047	0.0992043214792029	0.0742666803137045	265.581270076209	455.961058105256

PRR13	ENSBTAG00000026916	0.415231450983471	3.46838948028413	0.0976592569056149	0.0665391345487741	24.3860100653748	20.9176205850907
TAF5L	ENSBTAG00000034225	0.00685040867780777	-1.56754730946581	0.06988154813711179	0.0262408554417917	8.90813267844142	10.4756799879072
LBH	ENSBTAG00000026111	1.62876889195243	68.3472801677114	0.195756522893946	0.206335254191895	111.832884919684	43.4856047519724
KDM5B	ENSBTAG00000006175	-0.0384307613041076	-93.2508657006142	0.0526802723220755	0.0472437077893247	522.471897421563	615.722763122177
HIPK2	ENSBTAG00000017860	-0.517739699942934	-0.687623003232602	0.200709874829096	0.154832128115389	0.961722414598122	1.64934541783072
RBPMS	ENSBTAG00000033727	-0.0821872535967167	-3.3341276480752	0.181214002198717	0.0477743446953832	17.2679523423757	20.6020799904509
SUFU	ENSBTAG00000021068	-0.430880083902824	-48.333046361498	0.152733752122834	0.0565977788653143	82.2086505893704	130.541696950868
DDIT3	ENSBTAG00000031544	0.16505738512273	-0.0151195362049265	0.0897820366710559	0.0710138370339491	0.570553272993806	0.585672809198732
SIN3A	ENSBTAG00000009985	-0.330965972069626	-199.903782856967	0.0237860262980164	0.0423392114721217	438.465354755268	638.369137612235
TTF2	ENSBTAG00000015392	0.0335898096923506	-0.184857914906793	0.0783349867149877	0.0942793689211042	1.45788406468644	1.64274197959323
GLI3	ENSBTAG00000010671	-0.489594438274782	-1.10526185431398	0.112982120825763	0.206483303510563	2.16201057768916	3.26727243200314
WWTR1	ENSBTAG00000007814	0.336308362701791	2.32037189128911	0.15467211358249	0.130324703370644	15.9233777818065	13.6030058905174
MED27	ENSBTAG00000000382	-0.219793153551425	-1.2610014618665	0.0864156924314682	0.0700801254637184	3.29738598755132	4.55838744941782
NIF3L1	ENSBTAG00000018282	0.0452452934566299	-0.253769631446751	0.097878942781277	0.0746797978984681	1.97507604923806	2.22884568068481
ZMYND8	ENSBTAG00000013114	0.0407214186397831	-4.79767537392712	0.103737274353588	0.0880773620047245	37.4699268041671	42.2676021780943
AKAP8	ENSBTAG00000001807	-0.739349226986793	-27.0594230934803	0.0360170729294317	0.116894580925637	28.9289675219679	55.9883906154482
PIR	ENSBTAG00000009477	-0.769558551092231	-1.97221922120661	0.146186261809711	0.274238516276698	1.8700384879575	3.84225770916411
CBX5	ENSBTAG00000006246	-0.200690663869542	-1.26864230591765	0.234335433665849	0.275105125962369	3.13939720403573	4.40803950995339
CHCHD2	ENSBTAG00000004295	0.198797918675193	0.111341607413301	0.0273742790011501	0.0231861619172467	16.7999379301479	16.6885963227346
EYA3	ENSBTAG00000043989	-0.781036767689086	-4.17243304911453	0.108507282862601	0.188914797769056	4.23290512769502	8.40533817680956
ERCC3	ENSBTAG00000020777	-0.301128827259608	-2.23947701494021	0.0584551881090467	0.0616981470877299	5.37139029961986	7.61086731456008
TTF1	ENSBTAG00000018710	-0.640128183027747	-2.85342180007701	0.165523813941282	0.143836730900824	3.51149834479708	6.36492014487409
CTBP2	ENSBTAG00000003397	-0.302457620831959	-24.7988961520473	0.0257536836489903	0.118241347030093	56.7611236001937	81.560019752241
ELOA	ENSBTAG00000026585	-0.190045863234437	-1.17622664833641	0.073625795492223	0.127380982139692	3.43279096938085	4.60901761771726
NSD3	ENSBTAG00000001529	-0.40020208685063	-2.72480938395963	0.120820044907004	0.191095218161158	5.12458954288114	7.84939892684077
SETDB1	ENSBTAG00000000098	-0.137270406082548	-2.54274015267468	0.0630142898147256	0.0464996484970122	10.3896364685647	12.9323766212394
XRCC6	ENSBTAG00000006103	-0.0622779066596389	-3.09018777209705	0.0565803523281743	0.0696450581495576	15.0992560366452	18.1894438087423
EYA2	ENSBTAG00000013336	-0.526791657200815	-33.2314654534435	0.221314203650821	0.194058006897459	48.5464792331013	81.7779446865448
KMT2C	ENSBTAG00000024199	-0.454799322092206	-4.78000998816025	0.138748417396087	0.167401441851236	7.82611348466135	12.6061234728216
ADNP2	ENSBTAG00000005916	-0.116163759756263	-10.3260474111518	0.0413737094312209	0.0824022806520881	41.0894510663885	51.4154984775403
PHF8	ENSBTAG00000013289	-0.278043931329241	-0.560352132539939	0.0819503481526139	0.0691964908899573	1.37728642021192	1.93763855275186
CHD7	ENSBTAG00000021841	0.138016988592552	-1.11585011467081	0.0574049388056796	0.118062717809342	16.1083784498887	17.2242285645595
PRMT2	ENSBTAG00000005503	0.223498490763962	0.477582624873879	0.0661436292350077	0.165762403066505	10.9413196563231	10.4637370314492
ANP32A	ENSBTAG00000012365	-0.545482901740455	-12.360971099161	0.049446597918387	0.0820583915000928	18.4424967002574	30.8034677994184
TLE4	ENSBTAG00000003532	-0.372693879438917	-3.30437445747314	0.134462867061302	0.1435660025412	7.82102573885292	11.1254001963261
TAF9B	ENSBTAG00000000895	0.620916141230957	2.54431516417144	0.116160062199806	0.0617225979069945	9.38427087439089	6.83995571021944

Tabela 2. Genes chaves na cérvix ovina na fase folicular e luteal.

Gene	ID	Log Fold Change	Dif Means	gini_1	gini_2	Mean1	Mean2
HOXB3	ENSG00000120093	-0.0444430789760876	-0.314671750814491	0.151961424329116	0.0935109779778038	3.47504846716703	3.78972021798152
ZNF34	ENSG00000196378	-0.675857205978606	-8.6660830579716	0.162368238741957	0.127249655493742	12.6954084135128	21.3614914714844
ESRRA	ENSG00000173153	0.359070099652815	1.62194048171043	0.153013490022434	0.104512468758234	9.55126023190595	7.92931975019552
PREB	ENSG00000138073	0.0444018064928695	-54.2517992481799	0.114569552788885	0.0607799165187727	1456.45163360534	1510.70343285352

NFIL3	ENSG00000165030	-0.0169807492978161	-0.249525902434344	0.152315853464092	0.16227380802779	2.93097132679661	3.18049722923096
ERF	ENSG00000105722	-0.0257949519021511	-1.33169227757189	0.0732487953125763	0.0756843804643073	16.7055796454344	18.0372719230063
ZFP69	ENSG00000187815	-0.0163665173166672	-0.465628586900626	0.108476231114715	0.110361484286911	6.39583826781362	6.86146685471425
NFATC4	ENSG00000285485	-0.0613435394215662	-0.052688596466541	0.190533197525829	0.187300817469598	0.473455585261797	0.526144181728338
HOXB2	ENSG00000173917	0.12631164230233	0.0212668761551627	0.124500139406979	0.0872380906881615	0.858067660572667	0.836800784417504
MEIS3	ENSG00000105419	-0.193128262018687	-0.885761589655636	0.176077876350497	0.189835438101973	4.06396677084364	4.94972836049927
EHF	ENSG00000135373	0.0551965703476608	-1.67338329120975	0.196017368527114	0.215629831212362	66.8751223503233	68.548505641533
CIZ1	ENSG00000148337	-0.131516997169159	-14.9721076043833	0.0593695173976606	0.0521777490981299	93.0444150402619	108.016522644645
ZNF750	ENSG00000141579	0.0594469909348513	-0.0322659848142932	0.220586172762167	0.257569746526407	1.54308108925488	1.57534707406917
SPDEF	ENSG00000124664	0.0480488621999171	-0.159760552038249	0.279871408616987	0.296337915564375	4.20658317236293	4.36634372440118
SIX1	ENSG00000126778	-0.254342448908673	-0.941013987856023	0.199799343567225	0.175946570997883	3.51375109242425	4.45476508028027
MAF	ENSG00000178573	0.549186451698951	0.372364257677024	0.244690329596164	0.226006961680613	1.33099585461996	0.958631596942931
NFX1	ENSG00000086102	-0.548530206406819	-0.189164549938	0.0701254664301291	0.072639897843982	0.345328133745948	0.534492683683947
ZNF276	ENSG00000158805	-0.121635166801796	-2.87300000942937	0.0582528997995442	0.0606613116519825	18.5651606480843	21.4381606575137
SMARCE1	ENSG00000073584	0.196547198465193	0.193985480805279	0.0589504960384857	0.0466811287881742	2.67820622279822	2.48422074199294
ZNF652	ENSG00000198740	-0.155346848428834	-3.85356440022137	0.12897091404807	0.18332601432775	21.0685773436668	24.9221417438882
GLIS3	ENSG00000107249	-0.749938080238254	-0.0820176207717817	0.160327753176676	0.234603031391278	0.104947898379246	0.186965519151028
ZNF710	ENSG00000140548	-0.275250488787159	-0.449058234688207	0.120555352842691	0.0637561280594882	1.59255599435058	2.04161422903879
NFKB2	ENSG00000077150	0.0739894498970104	-0.0609063251642361	0.154318775631769	0.16045039234085	13.8668550230431	13.9277613482074
MYC	ENSG00000136997	-0.220300417128693	-207.15784306916	0.135040985351753	0.130502425908539	866.605574159048	1073.76341722821
ESR1	ENSG00000091831	1.01079315236001	60.3619813538215	0.173406092548588	0.188435638047441	128.045272456939	67.6832911031179
PRDM2	ENSG00000116731	-0.442546886518727	-40.3011041728139	0.115748330406608	0.228262116953901	91.2567397626774	131.557843935491
STAT6	ENSG00000166888	0.00992095296381899	-0.780117575573508	0.0835705175230118	0.0855312731787687	15.5401156278796	16.3202332034531
PKNOX2	ENSG00000165495	0.340110364637196	0.537233345695989	0.186571725957367	0.269787541268671	3.35377204074548	2.81653869504949
ESR2	ENSG00000140009	-1.10402057614656	-4.06063822919675	0.449806144012118	0.49348544621593	3.19638564515389	7.25702387435064
NFKB1	ENSG00000109320	0.0149791993426645	-44.1303882919558	0.110342446846259	0.0973525054412114	1005.12136278387	1049.25175107582
TP53	ENSG00000141510	0.199871045564648	0.350397278968463	0.107219555382859	0.108659714239451	4.66407760591478	4.31368032694632
MEF2D	ENSG00000116604	0.209997237112109	0.292505529228725	0.0710573153580517	0.0850085171579094	3.46446678143662	3.1719612522079
ETS1	ENSG00000134954	0.018217625848141	-0.0500412714152569	0.138495376636028	0.181634901701882	1.01989553583063	1.06993680724589

Tabela 3. 100 genes mais expressos na fase folicular e estral da cervix bovina.

Gene	ID	Log Fold Change	Dif Means	gini_1	gini_2	Mean1	Mean2
BPIFA2A	ENSBTAG00000009144	10.4876703575293	1.33314666767432	0.536551689835304	0.8	1.33379545013532	0.000648782460996904
TMPRSS11BNL	ENSBTAG00000048377	9.13963845167615	44.6748103458901	0.492638564074233	0.416231380534227	44.7637138270306	0.0889034811405015
ENSBTAG00000048276	ENSBTAG00000048276	8.83451158367456	11.0798911087455	0.260716716149161	0.368647838134362	11.1076696230359	0.0277785142904404
LOC112441508	ENSBTAG00000031375	8.43389967371738	1.48923886546534	0.528562019526543	0.623714018536848	1.49442237481876	0.00518350935341578
BPIFA2B	ENSBTAG00000019752	8.01169488659356	0.627058853372568	0.495585367076419	NA	0.627058853372568	0
AGT	ENSBTAG00000012393	-7.72323486386274	-2.83968274534543	0.391639105233969	0.769482777513028	0.0107830276558119	2.85046577300124
TMPRSS11D	ENSBTAG00000001925	7.2661091230698	5.64468362774846	0.535834114542948	0.401650565146232	5.68581144313726	0.0411278153887952
CAMK2B	ENSBTAG00000012653	-7.19841629076593	-36.6400263143898	0.481605736403381	0.775229010285204	0.209178053159811	36.8492043675496
TMIE	ENSBTAG00000052515	-7.14496785402895	-32.2320531948505	0.746704300909962	0.271334587578201	0.166251472053501	32.398304666904
NCCRP1	ENSBTAG00000014296	7.11259157979939	1.28225291262756	0.486041477498022	0.615406405211467	1.29406602372885	0.0118131111012905
OLFM4	ENSBTAG00000022779	6.98174767844643	13.837555827811	0.308109841450442	0.689536041445065	13.9525652777417	0.11500944993065

TDGF1	ENSBTAG00000021119	-6.80310364038778	-201.057849100285	0.310916583251406	0.631884126277704	1.65549732489853	202.713346425183
ENSBTAG00000011470	ENSBTAG00000011470	-6.77458040455884	-10.1650175378062	0.446871761062352	0.140478886939971	0.0729406735126094	10.2379582113188
PAD11	ENSBTAG00000002138	6.65159901658234	25.1419413304667	0.412782797072968	0.355129926047248	25.4312967007317	0.289355370265031
KRT13	ENSBTAG00000050581	6.60455651689265	48.8673317699611	0.47304553549609	0.518094262785813	49.4588326497406	0.591500879779518
SCG2	ENSBTAG00000021588	6.46281630849971	0.828607699462793	0.713710958282025	0.8	0.834794095323741	0.00618639586094831
LRP2	ENSBTAG00000004555	-6.4320396209309	-9.73441966584519	0.336120178665147	0.563394511740939	0.0974085128359711	9.83182817868116
ENSBTAG00000053748	ENSBTAG00000053748	6.30191233312157	53.7587482952646	0.556960222428914	0.39367890594909	54.5359006047368	0.777152309472178
KRT4	ENSBTAG00000012034	6.30006056405355	2.8479905970231	0.557329403416542	0.39367890594909	2.88921883625239	0.0412282392292932
GAL	ENSBTAG00000009393	6.25065974277691	332.298429497016	0.250359346249565	0.442329997859117	337.161000271159	4.86257077414229
SLC30A8	ENSBTAG00000052098	-6.20793360598155	-11.1683475480057	0.576497311585583	0.616842353894826	0.116853247037114	11.2852007950428
MGC138914	ENSBTAG00000014328	-6.20252448589179	-131.701416485042	0.511629942801625	0.290781077446007	1.53555954194665	133.236976026989
UPK2	ENSBTAG00000012750	6.17135102341042	0.509952115161376	0.590019242974515	0.635711877517133	0.51822726966561	0.00827515450423429
LOC522479	ENSBTAG00000050427	6.13045929224964	154.713158413611	0.434115962813147	0.319281627009887	156.990223838749	2.27706542513746
ENSBTAG00000055199	ENSBTAG00000055199	-6.11874699133316	-1.21966498637771	0.671609886916306	0.780052974541294	0.0130108581114812	1.23267584448919
IHH	ENSBTAG00000008452	-6.06063859427148	-6.41313863037376	0.50762878188206	0.790167344499239	0.0823521556816896	6.49549078605545
F10	ENSBTAG00000016385	-5.97778670464108	-1.82341483696047	0.722329456151623	0.631340237387627	0.0227455913127713	1.84616042827325
REG4	ENSBTAG00000032193	5.97254369580806	2.76426651309394	0.457878650885152	0.494784534101104	2.81112852797451	0.046862014880569
LOC112446672	ENSBTAG00000052798	5.97028153990243	0.422175917456848	0.568501932138137	NA	0.422175917456848	0
SPINK1	ENSBTAG00000015558	5.97021056305912	2.92933404999975	0.427337973985977	0.23488985350991	2.98042556807162	0.0510915180718691
SLURP1	ENSBTAG00000016209	5.96628107842237	2.13890518318835	0.462899263017627	0.468517291928679	2.17925251219645	0.0403473290080999
MSMB	ENSBTAG00000011660	5.9172246051464	11.559692840123	0.57438559357943	0.420535691388361	11.7680586379666	0.208365797843637
MMP3	ENSBTAG00000037768	5.90784242672446	0.300619796967037	0.575586118756744	0.687145987100115	0.305441167173454	0.0048213702064169
LOC101906048	ENSBTAG00000046283	-5.81406656406624	-112.22982739435	0.532964803569153	0.640889438458854	1.6756578031257	113.905485197476
TAAR1	ENSBTAG00000037718	5.69125738448153	5.30173948963706	0.350309420495675	0.338114887682562	5.41421185107781	0.112472361440749
BPIFA2C	ENSBTAG00000031376	5.66134798079537	6.93276385461759	0.439228909687748	0.198886695611993	7.08485654903631	0.152092694418717
EXD1	ENSBTAG00000008363	5.64090424776476	3.62173406094445	0.442225725513415	0.223980633222556	3.70258022965377	0.0808461687093241
KCNF1	ENSBTAG00000021280	-5.56880608077551	-0.733886478768648	0.588670714403363	0.3056205133675	0.0120916607764349	0.745978139545083
TMPRSS3	ENSBTAG00000048816	5.50926031435089	233.547919228969	0.296184512776969	0.523349310076629	238.835256077509	5.28733684853941
ENSBTAG00000048816	ENSBTAG00000020512	5.49427315123949	4.03539223846517	0.438178638298546	0.604198292230674	4.13164007802351	0.0962478395583349
GJB1	ENSBTAG00000008161	-5.46737867462709	-7.7516972071287	0.513730635930614	0.573761494647608	0.147320164154682	7.89901737128338
CLCA1	ENSBTAG00000052224	5.46220414840613	216.918610691352	0.348520323717683	0.220911275830118	222.367665187114	5.44905449576143
ENSBTAG00000052224	ENSBTAG00000046768	-5.44645341710979	-0.141385399020172	0.732679109278405	0.592853116464926	0.00158103991329466	0.142966438933466
IGFBP1	ENSBTAG00000031532	5.41407486190766	0.232438603880333	0.398708784245792	0.687781598208397	0.237886522437604	0.00544791855727039
ENSBTAG00000031532	ENSBTAG0000001392	-5.30610654888893	-9.21065752901083	0.392048787077624	0.729561457520693	0.198741578938214	9.40939910794904
RDH16	ENSBTAG00000014683	-5.30278893747946	-0.211260754246596	NA	0.22153142686123	0	0.211260754246596
APOBEC1	ENSBTAG00000038835	5.14904004851144	1.7300673491015	0.529195805451826	0.620588665099255	1.78304759578754	0.0529802466860465
LOC509961	ENSBTAG00000004588	5.125849712773	0.51405456520375	0.670915502609821	0.413939241131895	0.533021604361805	0.018967039158055
KCNN4	ENSBTAG00000022246	5.11845131628365	9.31715085297592	0.271822638609792	0.122277235259634	9.63955600286589	0.322405149889969
C29H11orf86	ENSBTAG00000018703	5.11490131443356	0.901634401094783	0.466235913936583	NA	0.901634401094783	0
OSTN	ENSBTAG00000039237	5.10472743361731	2.13381832461088	0.493917195234149	0.619924271681624	2.1905700177357	0.0567516931248251
ENSBTAG00000039237	ENSBTAG00000050026	-5.0899259170152	-0.466797520303263	0.857142857142857	0.748126166762856	0.00991140105104993	0.476708921354313

ENSBTAG00000050026	ENSBTAG00000047155	5.08257740147134	0.10570344761818	0.366920338844249	0.8	0.108275364342786	0.00257191672460578
C28H10orf71	ENSBTAG00000012621	5.05666166554248	0.623191000853263	0.430556596569112	0.608384191973237	0.643170830812637	0.0199798299593742
RTN4RL2	ENSBTAG00000039967	-5.02169556579284	-4.52817025221992	0.372114164867171	0.191777165832691	0.112258073916326	4.64042832613624
KRT78	ENSBTAG00000021240	5.01230629889222	5.32986970531806	0.543476717946431	0.33561895102292	5.5235494764874	0.193679771169345
DCSTAMP	ENSBTAG00000019636	-4.99771198991172	-1.75079853951409	0.595687858980708	0.370993004192074	0.0303553412939253	1.78115388080802
SCARA5	ENSBTAG00000039289	-4.99333979615527	-175.992664251122	0.34694681929318	0.376336987526026	5.40145840614963	181.394122657272
LOC527068	ENSBTAG00000053443	4.9914602241738	4.2131051169979	0.557702964942814	0.243677868243968	4.36668800060571	0.153582883607807
RUM1	ENSBTAG00000021280	4.98204833007017	9.74751598331487	0.150582097847591	0.262393338886956	10.0955034837624	0.347987500447485
IVL	ENSBTAG00000017827	4.98047792619673	3.53860191933584	0.56752775113844	0.635711877517133	3.6725988335046	0.133996914168757
ENSBTAG00000054600	ENSBTAG00000054600	4.97711136426043	10.2692488853657	0.326277886234182	0.345770984835542	10.6364735005654	0.367224615199633
CALML5	ENSBTAG00000013854	4.91059617065609	0.46970608591465	0.244710652791082	0.684360546693485	0.488532537211412	0.0188264512967618
LOC538679	ENSBTAG00000046482	4.90470651814782	0.397143436621251	0.263156523890617	0.615406405211467	0.415176626600994	0.0180331899797425
PENK	ENSBTAG00000004924	-4.82018704800901	-0.501637147293282	0.575389941722831	0.623033246461788	0.0142549202220615	0.515892067515344
TH	ENSBTAG00000026768	4.81970880567878	13.392416503268	0.761638079877615	0.190218988191608	14.0002827140149	0.607866210746869
A4GNT	ENSBTAG0000001451	4.80713439336761	0.300594879286845	0.435646804527321	0.258528707326984	0.314254997453264	0.0136601181664187
ENSBTAG00000048830	ENSBTAG00000048830	4.80228490133332	0.0270053431419432	0.423799663506785	NA	0.0270053431419432	0
BCAN	ENSBTAG00000015789	4.75558678325738	1.39685057289354	0.293854499177153	0.212551789148209	1.46213645276024	0.0652858798666992
CCL26	ENSBTAG00000052510	4.74406346202816	10.5467762364544	0.166608731000911	0.149745425037113	11.0033532317772	0.456576995322828
AGR2	ENSBTAG00000024406	4.74106289947718	4060.3690683971	0.188915372048269	0.211978516408433	4235.21089557	174.841827172901
ASPG	ENSBTAG00000017194	-4.68688328813046	-1.51479249813694	0.417312971349325	0.77426485970263	0.0486697215946323	1.56346221973158
RADIL	ENSBTAG00000021913	-4.67776436525556	-7.40588386577895	0.266722263387651	0.767587755940789	0.251688861121091	7.65757272690004
TMEM229A	ENSBTAG00000049382	4.66450793972288	0.192363626559942	0.441941247442293	NA	0.192363626559942	0
KRT6A	ENSBTAG00000039425	4.65937157668344	4.52392082311196	0.525127285425684	0.529879305124812	4.73351117031102	0.209590347199066
GJB5	ENSBTAG00000005717	-4.61265825636491	-5.08705466735846	0.514698079451125	0.700279354678321	0.186697989645475	5.27375265700394
ADM2	ENSBTAG00000054072	4.61120314060221	14.0931763721036	0.226673923658365	0.192053192614435	14.7995669229185	0.70639055081487
MCOLN3	ENSBTAG00000016982	-4.59926761289637	-1.53294796619728	0.614935535631122	0.439745674542315	0.0472139550344666	1.58016192123174
ENSBTAG00000005324	ENSBTAG00000005324	4.58816104654107	2.82899586567018	0.572272110442103	NA	2.82899586567018	0
IGFBP3	ENSBTAG00000003994	4.58517460230098	95.2488081081069	0.0994427776122484	0.294491073326218	99.7007290097979	4.45192090169103
DCT	ENSBTAG00000002300	4.56942007303733	0.148815689838838	0.781024732486731	0.8	0.15533952547402	0.00652383563518186
BSP3	ENSBTAG00000003886	-4.55507383233905	-0.640788200719888	NA	0.358662173213077	0	0.640788200719888
ENSBTAG00000048395	ENSBTAG00000048395	-4.55475871869254	-1.49175928917298	0.259681812333872	0.413284074808977	0.0679444069205873	1.55970369609357
CYP3A4	ENSBTAG00000052665	4.54947861024019	16.1959899325145	0.505185337093724	0.234091152098849	17.0043917722522	0.8084018397377
KLF17	ENSBTAG00000047871	-4.51816238250645	-1.18224713276154	0.679395546313255	0.232158498444094	0.0567615033820296	1.23900863614357
TNC	ENSBTAG00000000575	4.43688586273517	208.62727582452	0.377655272939868	0.387453477402939	219.345984954238	10.7187091297178
MGAT4C	ENSBTAG00000011153	-4.42830804103556	-10.1430414632334	0.444765811814567	0.393854200026938	0.457699191000382	10.6007406542338
KCNE1	ENSBTAG00000001150	4.41825885492678	0.283951444740196	0.667496459654903	0.8	0.29826234934035	0.0143109046001541
C28H10orf99	ENSBTAG00000050197	-4.40459288804529	-2.46284578703824	0.595524385461041	0.196760828426254	0.0925943051593968	2.55544009219764
SFN	ENSBTAG00000009223	4.38739338650954	14.219610237416	0.493299337159911	0.156621523347076	15.0037883414765	0.784178104060512
PRODH	ENSBTAG00000047676	-4.37823848956379	-8.38833718911427	0.165357870002746	0.24670042616056	0.360378147127657	8.74871533624193
S100A12	ENSBTAG00000012638	4.37468878868362	10.7508742455153	0.529950363454291	0.367741910941125	11.309453729421	0.558579483905632

ENSBTAG00000052585	ENSBTAG00000052585	-4.37085733781731	-4.65499638608366	0.529564529737433	0.566681904472133	0.172518301137926	4.82751468722159
SLC14A1	ENSBTAG00000019870	4.34841217170969	3.27389980244996	0.719294681521202	0.43878817341671	3.4405727956693	0.166672993219341
GJB4	ENSBTAG000000005719	-4.3460233148246	-9.2846910699956	0.455467368287012	0.441146566258235	0.390694171159466	9.67538524115507
ENSBTAG00000048794	ENSBTAG00000048794	4.34073589208589	167.677422864312	0.41365717422201	0.41744372950316	177.361731400924	9.68430853661206
LOC112441481	ENSBTAG00000012540	-4.33881125665703	-0.529486086435191	0.709098966057574	0.329646698327027	0.048095017148613	0.577581103583804
LOC507527	ENSBTAG00000013507	4.33049803539077	0.00796028178064769	0.562107108912761	NA	0.00796028178064769	0
ENSBTAG00000053707	ENSBTAG00000053707	4.3267015493717	1.58412444509021	0.40865370111719	0.444099991082275	1.67820105617526	0.0940766110850541
S100A8	ENSBTAG00000012640	4.31913547505644	1.19861552784099	0.5233191170937	0.38928140268617	1.26725393728352	0.0686384094425284

Tabela 4. 100 genes mais expressos na fase folicular e estral da cervice ovina.

Gene	ID	Log Fold Change	Dif Means	gini_1	gini_2	Mean1	Mean2
ENSOARG00020011601	ENSOARG00020011601	7.65678771992481	2.33754749161547	0.767658467531659	0.735541205336112	2.35002171949169	0.0124742278762233
ENSOARG00020000537	ENSOARG00020000537	7.32707456273094	0.0753685444755734	0.81927013027439	0.736979654019151	0.0758769005296702	0.000508356054096724
KRTDAP	ENSG00000188508	7.25380690371756	0.0111377364888888	0.858832754411478	0.839786875344018	0.0111839536402679	4.62171513791126e-05
DRD2	ENSG00000149295	6.7507378119605	51.670365850602	0.463983997794401	0.853983800457149	52.1954422878483	0.52507643724623
SLURP1	ENSG00000126233	6.64203575141894	0.258738719182664	0.672064308043247	0.802490451645851	0.261554540361375	0.00281582117871167
KRT4	ENSG00000170477	6.64118502059344	1070.81788636707	0.825671836911915	0.924309206282594	1115.30013891217	44.482252545096
PLA2G4E	ENSG00000188089	6.57073948117742	0.594890875845066	0.870768628493842	0.875252767091832	0.596887198985571	0.00199632314050495
ENSOARG00020018856	ENSOARG00020018856	6.16812848914848	0.00738487708862217	0.892911726650831	0.697396395694228	0.00746780094259318	8.29238539710077e-05
MMP1	ENSG00000196611	6.16576596182193	0.403520062244577	0.676630866949708	0.894876015890183	0.40947511233817	0.00595505009359361
TECTB	ENSG00000119913	5.83895349961854	0.130225827049176	0.73503534592538	0.696393706901843	0.132679945325323	0.00245411827614712
SCG2	ENSG00000171951	5.65339614183538	0.867067709064849	0.540959058728606	0.831792221054691	0.885957372812962	0.0188896637481134
KRT79	ENSG00000185640	5.63144322349349	2.28717664250687	0.74623858964369	0.767969205304519	2.33717117174681	0.0499945292399396
CSN3	ENSG00000171209	5.62539017807886	1.12964207762822	0.899556216605685	0.916461904836629	1.13716401976393	0.0075219421357065
IBSP	ENSG00000029559	5.60558222079176	0.233812769438452	0.666056914977453	0.93875017133709	0.23617825645322	0.00236548701476805
ADAM7	ENSG00000069206	-5.58250234721926	-3.24039388002412	0.576242541355225	0.647289715558404	0.0654185677861933	3.30581244781032
ENSOARG00020019270	ENSOARG00020019270	5.56729164751594	0.146829870523219	0.955010580434334	0.817380378632078	0.147397625031332	0.000567754508112833
ENSOARG00020010220	ENSOARG00020010220	-5.50926952410315	-19.9830095240443	0.8423808079539	0.873602332007091	0.42262162265611	20.4056311467004
ENSOARG00020012069	ENSOARG00020012069	5.42856128341953	1.39833297284088	0.729774021844396	0.580709863778545	1.43393308416918	0.0356001113282972
ENSOARG00020024490	ENSOARG00020024490	5.42054576262215	0.201074255363184	0.85907376486467	0.834514981307652	0.206514545665752	0.00544029030256842
KRT85	ENSG00000135443	-5.36888720716065	-0.679769137156458	0.886335091400448	0.804029299987675	0.0144309064747076	0.694200043631165
TFF1	ENSG00000160182	5.31535865509055	2.77619608234766	0.673581585724974	0.709475018445018	2.85111580527535	0.0749197229276895
ENSOARG00020011654	ENSOARG00020011654	5.3040154599145	18.2264964452496	0.770570686141199	0.689710973149857	18.7332947083822	0.506798263132556
ENSOARG00020015596	ENSOARG00020015596	-5.195565115895	-1.29049973712559	0.887666111980304	0.84821302845308	0.0342772063486563	1.32477694347424
ENSOARG00020000114	ENSOARG00020000114	5.17939370895714	0.430830278181781	0.897266673501732	0.783973408492965	0.440758771530191	0.00992849334840928
ENSOARG00020000372	ENSOARG00020000372	5.10688287182257	0.0723453713139255	0.767810780167757	0.53851386930478	0.074657214528892	0.0023118432149665
ENSOARG00020024493	ENSOARG00020024493	-5.02464664754408	-1.01468859896477	0.416676548651069	0.669929118968995	0.030593915782405	1.04528251474717
ENSOARG00020013969	ENSOARG00020013969	-4.99117002843005	-0.0198389644560448	0.820235129618376	0.695395389932465	0.000601968203748093	0.0204409326597929
ENSOARG00020012116	ENSOARG00020012116	4.98002467282859	0.0279318533758113	0.857970026929464	0.942061535861	0.0282288172221723	0.000296963846360968
ENSOARG00020011773	ENSOARG00020011773	4.92106084845893	3.62959702073834	0.705832452761686	0.552839104353695	3.76124504961823	0.131648028879884
SLC26A3	ENSG00000091138	-4.89597054736947	-754.177499553705	0.330840174402812	0.57205899643128	24.6878518295235	778.865351383229
KLK4	ENSG00000167749	-4.78739708526638	-0.036818346797663	0.343745324886879	0.724051025161995	0.00130138372554361	0.0381197305232066

ENSOARG00020005727	ENSOARG00020005727	-4.7849627155198	-0.126265297680224	0.883704400412593	0.873124015145863	0.00447697990330126	0.130742277583525
ENSOARG00020002591	ENSOARG00020002591	4.76299285494152	0.466048532730646	0.678077825251925	0.764617399492265	0.486036335154241	0.0199878024235952
ENSOARG00020014156	ENSOARG00020014156	4.74941696212319	4.28441627026882	0.716880151074667	0.688276805760726	4.45875281379534	0.174336543526519
S100A8	ENSG00000143546	4.72531298633464	1.24619396428815	0.763615037471685	0.875275348415652	1.3678216532036	0.12162768891545
KRT36	ENSG00000126337	4.66482018841708	0.03647105778499	0.773783488764952	0.855531537929379	0.0376754035582404	0.00120434577325037
GRP	ENSG00000134443	4.66367170499564	35.9428408560887	0.836575551240455	0.924344533879189	41.3505939564768	5.40775310038808
ENSOARG00020021239	ENSOARG00020021239	-4.59940498848173	-2.25380931529806	0.931467139560216	0.843418264039823	0.0950856635040879	2.34889497880215
PRSS27	ENSG00000172382	4.54289695514717	4.2608055896385	0.920812849281677	0.717065701003756	4.32684874428226	0.0660431546437642
ENSOARG00020026387	ENSOARG00020026387	-4.48281311685366	-0.0633855437178787	0.607887537161391	0.774714330999619	0.00279937361951375	0.0661849173373925
TMPRSS11D	ENSG00000153802	4.47014188018446	0.320359227172443	0.851097623570003	0.759018701265936	0.340303618572474	0.0199443914000312
ENSOARG00020023153	ENSOARG00020023153	-4.46920291737012	-0.120826576423646	0.805968026338844	0.655413957691635	0.0053391274474405	0.126165703871087
RBP2	ENSG00000114113	4.41704619388933	1.30153487327226	0.558473998831547	0.40503014287533	1.37119757352733	0.0696627002550655
IGFL1	ENSG00000188293	4.35940626188571	0.019247284918464	0.69833725631857	0.816417173255253	0.0202812756483838	0.00103399072991973
CCK	ENSG00000187094	4.31328493529238	0.0117975985311752	0.518100524620428	0.701987852697961	0.0124758121098498	0.000678213578674543
GYS2	ENSG00000111713	4.3125787380265	0.369585906573251	0.524253710775918	0.685220095218447	0.390671053512615	0.0210851469393634
S100A12	ENSG00000163221	4.29146525792214	2.59106896214359	0.760076253812433	0.758523901877582	2.73791161414256	0.146842651998973
ENSOARG00020000383	ENSOARG00020000383	4.26760937076823	11.1569115886792	0.648259411010195	0.600321542206942	11.814051924527	0.657140335847787
ENSOARG00020011181	ENSOARG00020011181	-4.25900027561818	-0.00225588589752385	0.930692106722105	0.874560576071345	9.1217201147758e-05	0.00234710309867161
OXTR	ENSG00000180914	4.18480320699374	0.547423071976084	0.718277754306683	0.908907501438242	0.897956162912576	0.350533090936492
SPINK14	ENSG00000196800	-4.1817433953541	-0.00523798326827404	0.987012987012987	0.803486387697958	5.06417858976757e-05	0.00528862505417172
ENSOARG00020023117	ENSOARG00020023117	-4.17783768119593	-0.624688148962628	0.698154788809904	0.602559400142477	0.0342086856612063	0.658896834623835
TAC3	ENSG00000166863	4.16692906883266	4.6016944536264	0.321370647445723	0.77216717174452	4.89728885568738	0.295594402060981
ENSOARG00020025007	ENSOARG00020025007	-4.14445638002974	-8.14973070133269	0.572727687120471	0.58627115063701	0.45598327693389	8.60571397826658
LYPD2	ENSG00000197353	4.1303292704533	0.302506719475753	0.613558304566679	0.485074033372085	0.322127968800547	0.0196212493247939
ENSOARG00020020891	ENSOARG00020020891	4.08819605626998	92.8586085438018	0.462808121800076	0.484643228300231	99.1894542548288	6.33084571102699
KRT35	ENSG00000197079	4.05551448402891	0.758534796303049	0.401988086517413	0.628226461724914	0.809878475410767	0.0513436791077181
FSTL5	ENSG00000168843	4.03431199857308	0.608568192325194	0.503545104226829	0.742249302813963	0.649788221945426	0.0412200296202324
ENSOARG00020010586	ENSOARG00020010586	-4.02578428004074	-0.654413893237148	0.879163659198644	0.866364404754675	0.0415177637863426	0.69593165702349
MATN1	ENSG00000162510	4.01864242379543	0.0182033427716846	0.462937829355593	0.616734312399007	0.0194741891993515	0.00127084642766691
ENSOARG00020005568	ENSOARG00020005568	3.99996950903221	8.26166695100927	0.556216936306709	0.654621653406175	8.85229260051368	0.590625649504409
ENSOARG00020001244	ENSOARG00020001244	-3.9880188404984	-0.00787557057671479	0.795407438558841	0.777488005635453	0.000490330378307131	0.00836590095502192
KRT3	ENSG00000186442	3.95241187819827	0.11778235866841	0.836574943680045	0.712705203734278	0.126278816641448	0.00849645797303805
MMP12	ENSG00000262406	3.94563871231721	2.99494473103739	0.529945505351547	0.589261116546984	3.21901550161837	0.224070770580984
ENSOARG00020000427	ENSOARG00020000427	3.93442293948545	0.0762251651378047	0.768973657959708	0.887591724106844	0.0821005267021742	0.00587536156436946
ATP13A5	ENSG00000187527	-3.91530249608752	-226.767121964689	0.610019612038265	0.557756088370324	15.3212325177328	242.088354482421
KRT78	ENSG00000170423	3.84620142858859	4.85664628411337	0.68743710538597	0.510560392168535	5.24654141687767	0.389895132764298
TMIE	ENSG00000181585	-3.80542262850698	-0.501117361694343	0.594644543692849	0.520508056405506	0.0364539900621305	0.537571351756473
OLFM4	ENSG00000102837	3.79735004215817	4.118938668959	0.552708201468705	0.653505583247968	4.45856250784033	0.339623838881322
KRT75	ENSG00000170454	3.78583249517957	1.6396310134023	0.729285450242233	0.7241226686298	1.77754891603256	0.13791790263026
DKK1	ENSG00000107984	-3.78531830978448	-0.458407213984153	0.854845394778049	0.52261665445266	0.033951079305922	0.492358293290075
INHBE	ENSG00000139269	3.7554520487291	14.0326458083088	0.583151242725386	0.653289855793245	15.2311565181	1.19851070979119
IGFBP1	ENSG00000146678	3.75169586700212	0.0172064280114894	0.654167742730961	0.881112440505228	0.0183669947090168	0.00116056669752738
TTR	ENSG00000118271	3.73586741306458	0.0328280103927138	0.464159129645637	0.564666762616246	0.0355813833198303	0.0027533729271165

ENSOARG00020012854	ENSOARG00020012854	3.73388499719166	0.150547505319081	0.535012683751303	0.45452163732735	0.163738578529154	0.0131910732100728
BPIFA3	ENSG00000131059	-3.70338876419038	-0.0665372074337309	0.788751878193867	0.578375700922563	0.00518750493299057	0.0717247123667215
ENSOARG00020018060	ENSOARG00020018060	-3.61631363751709	-0.00234932725910245	0.96553961435552	0.514908196436354	0.000163382880576069	0.00251271013967852
NMB	ENSG00000197696	-3.6105884527357	-0.361948629550567	0.421000128689567	0.501549653653504	0.0302894106364112	0.392238040186978
ENSOARG00020005653	ENSOARG00020005653	-3.60931247910219	-0.00842281835341439	0.893464683857698	0.859496284174818	0.000577823043094457	0.00900064139650885
ENSOARG00020007834	ENSOARG00020007834	3.60820086544691	169.348643046171	0.917640829763144	0.570628887624536	174.100120125419	4.75147707924802
APOBEC3Z1	APOBEC3Z1	3.60065605987899	0.0818940483603901	0.941469453500167	0.843196888614979	0.0837095119055201	0.00181546354513008
AQP9	ENSG00000103569	-3.59738285500367	-86.7124577204827	0.696200949984435	0.43057366262928	7.32754508754471	94.0400028080275
NTS	ENSG00000133636	3.56316236884929	253.658027656422	0.50681913545105	0.797792179959098	278.697144954811	25.0391172983889
ENSOARG00020009811	ENSOARG00020009811	3.56249925596615	0.558084808281715	0.831713052585341	0.85159934279402	0.612167529601945	0.0540827213202299
GREM1	ENSG00000282046	3.55628746191299	3.35950016879503	0.647308286433341	0.525331956299854	3.70107558490097	0.341575416105935
ENSOARG00020012216	ENSOARG00020012216	-3.49032633160166	-18.1010250730951	0.601089691235662	0.554103952875788	1.68238105983719	19.7834061329323
SERPINB12	ENSG00000166634	3.47420778507579	0.192089898033723	0.556225483769819	0.56136095265624	0.212634844490066	0.0205449464563438
ENSOARG00020001753	ENSOARG00020001753	-3.43537988949491	-0.221251173376968	0.698080404451732	0.608363666918682	0.0210162606866806	0.242267434063648
ENSOARG00020018226	ENSOARG00020018226	-3.40717661733745	-0.0532386590988594	0.749107609830539	0.541064883342557	0.00522088185396742	0.0584595409528269
ENSOARG00020001098	ENSOARG00020001098	-3.40344001263939	-0.0342357893661368	0.830611709397833	0.730729588621107	0.00328916821087223	0.037524957577009
PHLDA2	ENSG00000274538	3.39106716508031	0.325306474319888	0.557379592939645	0.477502454620655	0.362979900512606	0.0376734261927181
ENSOARG00020007580	ENSOARG00020007580	3.38023399394846	14.6884611380242	0.916202274448986	0.547370017050209	15.1751004962149	0.486639358190693
ENSOARG00020008854	ENSOARG00020008854	-3.32043361197932	-14.3420626855636	0.613757392231996	0.504421717314006	1.51535317788897	15.8574158634526
UPK2	ENSG00000110375	3.31434756135508	0.00313727307173313	0.527111993891946	0.794120860470912	0.00352460930929406	0.000387336237560927
MMP7	ENSG00000137673	3.29494686122149	3.01760775813671	0.743589577048928	0.769719728775387	3.92029956663954	0.902691808502828
GRXCR1	ENSG00000215203	3.26416933728337	0.79133409904993	0.48311096262132	0.827128452731347	0.874049535012958	0.0827154359630285
GREB1	ENSG00000196208	3.26232532203146	976.398750184738	0.309089605914334	0.440305795982338	1099.41139428492	123.012644100181
ENSOARG00020008814	ENSOARG00020008814	-3.26060519749211	-0.244046050661095	0.755270394178281	0.548891648029976	0.0269150977481888	0.270961148409283
GJB6	ENSG00000121742	3.25789093422036	0.00483369541035877	0.733228680166457	0.827009795359644	0.00533650100566402	0.000502805595305254
ENSOARG00020000477	ENSOARG00020000477	3.24317205802819	0.0354886233817352	0.824143541036406	0.670801312676388	0.038286804915271	0.00279818153353582

Tabela 5. Genes exclusivos da cérvix bovina na fase estral e folicular

Gene	ID	Log Fold Change	Dif Means	gini_1	gini_2	Mean1	Mean2	Fase estral
BPIFA2B	ENSBTAG00000019752	8.01169488659356	0.627058853372568	0.495585367076419	NA	0.627058853372568	0	Follicular
LOC112446672	ENSBTAG000000052798	5.97028153990243	0.422175917456848	0.568501932138137	NA	0.422175917456848	0	Follicular
RDH16	ENSBTAG00000001392	-5.30278893747946	-0.211260754246596	NA	0.22153142686123	0	0.211260754246596	Luteal
C29H11orf86	ENSBTAG00000022246	5.11490131443356	0.901634401094783	0.466235913936583	NA	0.901634401094783	0	Follicular
ENSBTAG000000048830	ENSBTAG000000048830	4.80228490133332		0.423799663506785	NA	0.0270053431419432	0	Follicular
TMEM229A	ENSBTAG00000049382	4.66450793972288	0.192363626559942	0.441941247442293	NA	0.192363626559942	0	Follicular
ENSBTAG000000005324	ENSBTAG000000005324	4.58816104654107	2.82899586567018	0.572272110442103	NA	2.82899586567018	0	Follicular
BSP3	ENSBTAG00000003886	-4.55507383233905	-0.640788200719888	NA	0.358662173213077	0	0.640788200719888	Luteal
LOC507527	ENSBTAG00000013507	4.33049803539077	0.00796028178064769	0.562107108912761	NA	0.00796028178064769	0	Follicular
NPVF	ENSBTAG000000019447	4.19515510583535	0.0412841844376611	0.459296453953889	NA	0.0412841844376611	0	Follicular
ENSBTAG000000052976	ENSBTAG000000052976	-4.14806392999975	-0.135683077496103	NA	0.268062655301592	0	0.135683077496103	Luteal
ENSBTAG00000012533	ENSBTAG00000012533	4.12932092887349	0.00941592543141604	0.62449535675828	NA	0.00941592543141604	0	Follicular
ENSBTAG000000049959	ENSBTAG000000049959	3.72021199993998	0.00705352483514716	0.519300181975886	NA	0.00705352483514716	0	Follicular

LOC520402	ENSBTAG00000040320	-3.39489882153536	-0.0364767605915812	NA	0.393006256335909	0	0.0364767605915812	Luteal
KCNC2	ENSBTAG00000054123	3.36487699970871	0.0813137372751472	0.615161872409253	NA	0.0813137372751472	0	Follicular
MYL10	ENSBTAG00000026273	3.34370470861356	0.121832086532478	0.620855813182252	NA	0.121832086532478	0	Follicular
R3HDML	ENSBTAG00000013220	3.1956982497018	0.0211369823488593	0.614225023129965	NA	0.0211369823488593	0	Follicular
LOC523389	ENSBTAG00000053227	3.1156670054286	0.0553082185424062	0.440599361865036	NA	0.0553082185424062	0	Follicular
ENSBTAG00000040248	ENSBTAG00000040248	2.98069741015961	0.0126126783125132	0.422518946319597	NA	0.0126126783125132	0	Follicular
MC4R	ENSBTAG00000019676	2.77976167767441	0.181892877426001	0.647587296803692	NA	0.181892877426001	0	Follicular
ENSBTAG00000054106	ENSBTAG00000054106	-2.77866487828753	-0.032596894581462	NA	0.141339065763543	0	0.032596894581462	Luteal
ENSBTAG00000053691	ENSBTAG00000053691	2.67531653468796	0.00638802558021577	0.329641811491069	NA	0.00638802558021577	0	Follicular
ENSBTAG00000054917	ENSBTAG00000054917	-2.54230941311803	-0.0169661005586573	NA	0.23921970533918	0	0.0169661005586573	Luteal