

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/02/2024.

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

COORIENTADOR: 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 Reproducao e Saude Unica / 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 metallopeptidase 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.

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.

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.; Vologodskaja, 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.