

Interferon-tau e o reconhecimento da gestação em bovinos

(*Interferon-tau and pregnancy recognition in cattle*)

Vanessa Belentani Marques¹, Claudia Maria Bertan², Alexandre Barreto de Almeida³,
Flavio Vieira Meirelles⁴, Paula de Carvalho Papa¹, Mario Binelli³

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia.

²Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Zootecnia, Campus de Dracena.

³Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal.

⁴Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Básicas.

Correspondência: binelli@usp.br

Suporte financeiro: FAPESP e CNPq

Resumo

O reconhecimento materno da gestação, entre os dias 15 e 19 após a fertilização, estabelece um dos principais desafios biológicos para a obtenção de índices reprodutivos satisfatórios em bovinos. Nessa espécie, uma glicoproteína secretada pelo concepto (embrião e membranas associadas) no ambiente uterino, denominada de interferon-tau (IFN- τ) bloqueia a secreção pulsátil de prostaglandina F2alfa (PGF_{2 α}) endometrial. Tal bloqueio fisiológico determina a manutenção da secreção de progesterona pelo corpo lúteo e o estabelecimento da prenhez. Contudo, os mecanismos pelos quais o IFN- τ impede a luteólise ainda não foram suficientemente esclarecidos em fêmeas bovinas. Este artigo tem como objetivo sumarizar conhecimentos relativos aos mecanismos envolvidos nesse processo que é determinante ao êxito reprodutivo, especificamente sobre a atuação do IFN- τ no reconhecimento materno da gestação nas fêmeas bovinas.

Palavras-chave: gestação, bovino, interferon-tau.

Abstract

Maternal recognition of pregnancy occurs between days 15 and 19 after estrus. This process is one of the most important biological challenges to increase reproductive performance in cattle. In cattle, interferon-tau (IFN- τ) is a conceptus glycoprotein secreted into the uterine microenvironment. The IFN- τ blocks luteolysis thereby maintaining progesterone secretion by the corpus luteum and ensuring pregnancy maintenance. However, mechanisms by which IFN- τ blocks endometrial pulsatile release of prostaglandin F2alpha (PGF_{2 α}) are not yet completely understood. This article aims to review the knowledge about this important event to the success of reproduction in cattle, with a special emphasis on the IFN- τ actions.

Keywords: pregnancy, bovine and interferon-tau.

Introdução

O crescimento populacional humano aliado aos limites da ocupação territorial mundial determina a necessidade de maximizar a eficiência dos processos produtivos para que as demandas por alimento da sociedade moderna sejam supridas. A espécie bovina (*Bos taurus* – Linnaeus, 1758) foi domesticada e selecionada, constituindo importante fonte alimentar para a população humana. O Brasil consagrou-se como um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina, sendo atualmente detentor do maior rebanho comercial do mundo. Tal sistema produtivo animal é altamente influenciado pelos índices reprodutivos das fêmeas, as quais devem apresentar um adequado intervalo entre partos, ao redor de 12 meses, garantindo a produção de um bezerro/vaca/ano. Contudo, apesar das cifras movimentadas pela pecuária nacional, estima-se que o intervalo entre partos médio observado nos rebanhos brasileiros seja de aproximadamente 18 meses. Conhecimentos adquiridos acerca dos mecanismos reprodutivos nessa espécie podem fomentar um incremento nos indicadores produtivos desse setor e aumentar a oferta de nutrientes de alta qualidade a menores custos para a população humana.

Com o objetivo de padronizar os termos aplicados ao estudo da reprodução nessa espécie, o Comitê de Nomenclatura Reprodutiva Bovina (Committee ..., 1972) definiu que o período embrionário inicia-se na concepção e termina nos estágios finais da diferenciação sexual, por volta de 42 dias na espécie bovina. Esse período é seguido pelo período fetal, que se encerra no término da gestação. Estudos realizados desde a década de 70 permitiram a observação de que um dos principais desafios biológicos para o estabelecimento da prenhez nos rebanhos bovinos ocorre no período embrionário, especialmente entre os dias 15 e 19 após a fecundação, período que posteriormente foi designado de "período crítico" (Binelli *et al.*, 2001). Diskin e Sreenan (1980) relataram que falhas de fertilização e desenvolvimento embrionário até o dia 8 pós-fertilização são responsáveis

por 10% dos casos de fracasso reprodutivo, enquanto as mortes embrionárias entre os dias 8 e 16 pós-fertilização contribuem com mais de 30% dos referidos casos. Em rebanhos bovinos selecionados para produção de leite, esses índices reprodutivos são ainda menores (Drost *et al.*, 1999). Estudos em que vacas leiteiras lactantes foram submetidas à transferência de embriões e ao diagnóstico precoce da gestação por ultra-sonografia revelaram que menos de 50% das vacas mantiveram-se gestantes entre 27-30 dias após a ovulação (Sartori *et al.*, 2003). Tais dados justificam relatos de taxas de nascimento após única inseminação de 50 a 55% para novilhas (Sreenan e Mulvehill, 1975; Roche *et al.*, 1977; Wishart *et al.*, 1977), de 52 a 57% para vacas de raças selecionadas para produção leiteira (Mawhinney e Roche, 1978) e de 53% para vacas de raças especializadas na produção de carne (Roche *et al.*, 1977).

Durante o período crítico, em fêmeas bovinas não fertilizadas ou com conceito (embrião e membranas associadas) incapaz de bloquear a luteólise, ocorre a regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (CL). Esse evento fisiológico determina o início de um novo ciclo estral. Entretanto, para a ocorrência de uma prenhez, deve ser estabelecido um diálogo bioquímico eficiente entre o conceito e a unidade materna no microambiente uterino. Tal diálogo deve resultar no bloqueio da luteólise, na manutenção da secreção de progesterona (P_4) pelo CL e na conseqüente manutenção da gestação. Esse processo, conhecido como reconhecimento materno da gestação, é estabelecido por meio de mecanismos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos peculiares às diferentes espécies mamíferas.

Este artigo tem como objetivo reunir informações sobre os mecanismos envolvidos no reconhecimento materno da gestação nas fêmeas bovinas, particularmente sobre a atuação da glicoproteína secretada pelo conceito bovino, conhecida como interferon-tau (IFN- τ), fundamental nesse processo.

Placentação, implantação e reconhecimento materno da gestação

Entende-se por placentação a forma como as membranas associadas ao embrião ou feto se desenvolvem e se ligam ao endométrio (Björkman, 1976). Nos ruminantes artiodáctilos (i.e., bovinos, caprinos, ovinos, cervídeos) a placentação é do tipo sinepiteliocorial quanto às camadas teciduais da barreira materno-fetal, um processo de implantação levemente invasivo, em que seis camadas teciduais (endotélio materno, tecido conjuntivo materno, epitélio materno, trofoblasto, tecido conjuntivo embrionário e endotélio embrionário) estabelecem os limites entre as circulações fetal e materna (Leiser e Kaufmann, 1994). Observa-se que a evolução quanto ao tipo de placentação nas espécies mamíferas tem determinado o mecanismo pelo qual o conceito deve sinalizar sua presença à mãe (Roberts *et al.*, 1997). Associada à placentação, desenvolve-se a implantação embrionária, processos determinantes no estabelecimento da comunicação materno-embrionária em cada espécie.

A implantação do blastocisto junto ao útero materno é uma adaptação embrionária associada com a viviparidade, requerida para sustentar a nutrição e a proteção do conceito durante a gestação (Spencer *et al.*, 2004). Nas espécies mamíferas, diferentes estratégias estão envolvidas no processo de implantação. Em roedores, primatas e humanos, os blastocistos são rapidamente implantados no endométrio materno, antes mesmo de se expandirem e formarem as membranas embrionárias (Carson *et al.*, 2000). Já em ruminantes domésticos, o blastocisto evolui da forma esférica para tubular, alonga-se rapidamente, e as membranas embrionárias são formadas antes da implantação (Spencer *et al.*, 2004). Nessas espécies, o mecanismo de reconhecimento materno da gestação ocorre no período pré-implantação.

A expressão “reconhecimento materno da gestação” foi definida por Roger Short, em 1969, como o processo pelo qual o conceito sinaliza sua presença à unidade materna, prolongando a vida do CL e mantendo a gestação devido a de um diálogo bioquímico que se estabelece entre o conceito e o tecido endometrial nas diversas espécies mamíferas (revisado por Spencer e Bazer, 2004).

Em experimentos realizados nos anos 60 (Moor e Rowson, 1964; 1966) e no final dos anos 70 (Martal *et al.*, 1979), evidenciou-se que a manutenção do CL em ovinos ocorre pela atuação de fatores produzidos pelo conceito no endométrio materno. Outros estudos na década de 80 demonstraram que a infusão de proteínas secretadas por conceitos no útero de vacas não gestantes retardou a luteólise (Knickerbocker *et al.*, 1986; Helmer *et al.*, 1989). Tais fatores antiluteolíticos foram denominados inicialmente de trofoblastina (Martal *et al.*, 1979) ou proteína trofoblástica-1 (Godkin *et al.*, 1984; Bartol *et al.*, 1985). Na década de 90, com a purificação, a clonagem e o sequenciamento desses fatores, verificaram-se semelhanças estruturais com um grupo de glicoproteínas conhecidas como interferons (IFN) tipo I (Imakawa *et al.*, 1987). Ainda observou-se que tais interferons produzidos pelos conceitos apresentavam atividades peculiares aos IFN tipo I, como atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória. Dessa forma, os interferons de origem trofoblástica foram nomeados de interferon-tau (IFN- τ) (Roberts *et al.*, 1992). Posteriormente, diversos autores observaram que a administração de IFN recombinante (rIFN- τ) prolonga a vida do CL em ovinos, caprinos e bovinos (Martal *et al.*, 1990; Ott *et al.*, 1993; L'Haridon *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1995).

Estrutura dos interferons

Os IFN são citocinas sintetizadas e secretadas por células somáticas das espécies mamíferas. A designação coletiva de interferons surgiu com estudos de Stewart (1979) que assim os nomeou por sua peculiar capacidade de interferir na biologia das células mamíferas induzindo um estado antiviral.

Alguns estudos identificaram diversas proteínas tipo IFN inicialmente em humanos. O interferon-alfa (IFN- α) é composto por 12 subtipos, que são proteínas distintas contendo de 165 a 166 aminoácidos (Nagata *et al.*, 1980). O interferon beta (IFN- β) é molécula única composta por 166 aminoácidos (Taniguchi *et al.*, 1980). O interferon-ômega (IFN- ω) é molécula de 172 a 174 aminoácidos (Capon *et al.*, 1985; Hauptmann e Swetly, 1985). O interferon-kappa (IFN- κ) é derivado de queratinócitos (Nardelli *et al.*, 2000; Lafleur *et al.*, 2001). Na espécie bovina, foram identificados múltiplos subtipos de IFN- α , IFN- β , IFN- ω , e ainda se observou a expressão de interferon-tau (IFN- τ), responsável pelo reconhecimento materno nessa espécie (Roberts *et al.*, 1992; 1999).

Genes que codificam o IFN- τ foram identificados apenas em ruminantes (Leaman e Roberts, 1994). Acredita-se que os genes para IFN- τ tenham evoluído de um IFN- ω ancestral há aproximadamente 36 milhões de anos, no momento da divergência entre os ruminantes pecoran (ovinos, caprinos, bovinos, antílopes, cervídeos, girafas) e os outros artiodáctilos (suínos, lhamas e camelídeos) (Roberts *et al.*, 1999). Observou-se que as famílias de genes para IFN sofrem extensivas duplicações, originando múltiplas isoformas protéicas de IFN- α , - ω e - τ , além de apresentarem a característica de não possuírem introns (Demmers *et al.*, 2001).

Apesar das diferenças na sequência de aminoácidos, os IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- κ e IFN- τ apresentam estrutura tridimensional semelhante (Roberts *et al.* 1999). Tal característica estrutural, associada às propriedades biofísicas e atividades biológicas comuns, como estabilidade de atividade em pH ácido e reconhecimento de classes comuns de receptores de superfície celular (Mogensen *et al.*, 1999), determinou a designação coletiva dessas moléculas como IFN tipo I.

Um IFN estruturalmente distinto, conhecido originalmente como IFN imune devido à sua origem nas células-T, foi clonado em 1982 (Gray e Goeddel, 1982). Diferente do tipo I, esse IFN é conhecido como IFN-gama (IFN- γ). Devido à sua ligação a receptores diferentes dos observados para os IFN tipo I (Mogensen *et al.*, 1999), esse foi classificado como IFN tipo II.

O IFN- τ apresenta atividades inerentes aos interferons, como potente atividade antiviral, inibição na proliferação celular e efeitos regulatórios nas células do sistema imune semelhantes ao IFN- α . Sua molécula é composta por 172 aminoácidos e apresenta 75% de homologia com o IFN- ω (Ealy *et al.*, 1998). Assim como todos IFN tipo I, o IFN- τ se liga às subunidades de receptor para interferon 1 e 2 (IFNAR1 e IFNAR2) (Li e Roberts, 1994a; b) e ativa fatores de transcrição (Alexenko *et al.*, 1997; Binelli *et al.*, 2001), induzindo a expressão de diversos genes (Ott *et al.*, 1998; Spencer *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Gray *et al.*, 2006).

Após a purificação das proteínas secretadas por conceptos ovinos, Godkin *et al.* (1982) observaram que o interferon-tau ovino (oIFN- τ) apresenta diversas isoformas protéicas com peso molecular de aproximadamente 18 KDa, sem a presença de glicosilação. Já as isoformas de interferon-tau bovino (bIFN- τ) apresentam peso molecular entre 22 e 24 KDa, glicosiladas na extremidade amino (Demmers *et al.*, 2001). A razão para a transcrição de múltiplas isoformas de IFN- τ permanece desconhecida. No entanto, Ealy *et al.* (2004) sugerem que as diferentes isoformas desempenhem distintas atividades como hormônios da gestação ou que estabeleçam um mecanismo que amplifique a produção desta proteína no período crítico.

Mecanismos de ação do IFN- τ

De maneira geral, as respostas biológicas aos interferons são iniciadas pela sua ligação aos receptores de superfície celular específicos e pela subsequente ativação de vias de transdução de sinal citoplasmático, ativando a expressão de genes regulados por IFN (Sen e Lengyel, 1992; Stark *et al.*, 1998). Observou-se que células endometriais expressam as subunidades 1 e 2 do receptor para IFN (Kaluz *et al.*, 1996). A ligação do IFN ao seu receptor desencadeia fosforilações intracelulares que ativam mensageiros secundários conhecidos como Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição os quais se ligam aos Elementos de Resposta Estimulados por Interferon nos genes que os possuem (Darnell, 1997; Harda *et al.*, 1989; Reid *et al.*, 1989). Tal mecanismo foi também descrito em bovinos por Binelli *et al.* (2001).

O mecanismo geral pelo qual o IFN- τ inibe a regressão do CL é pela supressão da liberação pulsátil de PGF_{2 α} endometrial. Sabe-se que o oIFN- τ produzido pelo embrião atua de maneira parácrina no tecido materno suprimindo a transcrição de genes para receptores de ocitocina (OTR) e de estradiol (ER) no endométrio (Lamming *et al.*, 1995; Spencer e Bazer, 1995). Ainda, os aumentos na expressão dos genes para OTR e ER detectados nas fêmeas ovinas cíclicas entre os dias 11 e 17 pós-estro não ocorrem nas fêmeas gestantes (Spencer e Bazer, 1995) ou em fêmeas cíclicas que receberam infusão uterina de IFN- τ (Spencer *et al.*, 1995). Especula-se que, por meio da inibição de ER, o IFN- τ iniba a regulação positiva nos OTR. Com tal mudança na célula endometrial, a ocitocina (OT) de origem hipofisária ou luteal não terá possibilidade de promover a liberação dos pulsos de PGF_{2 α} essenciais à luteólise.

Em fêmeas bovinas, observou-se o efeito de IFN- τ na inibição da síntese de PGF_{2 α} em explantes endometriais (Arnold *et al.*, 2000) e em células endometriais epiteliais (Danet-Desnoyers *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1998; Binelli *et al.*, 2000). No entanto, nessa espécie, a relação entre IFN- τ , ER e OTR ainda não está clara. Sugere-se que o IFN- τ possa inibir a expressão de OTR (Kimmings e Maclaren, 2001; Robinson *et al.*, 2001). Observaram-se diferenças significativas na expressão de OTR endometrial entre as fêmeas bovinas prenhes e cíclicas (Fuchs *et al.*, 1990; Jenner *et al.*, 1991; Guzeloglu *et al.*, 2004a), sugerindo que o IFN- τ secretado pelo concepto suprime a expressão de OTR. A observação de que o IFN- τ recombinante inibe a expressão de OTR em explantes endometriais em cultivo corrobora com esse conceito (Horn *et al.*, 1998; Leung *et al.*, 2001). Recentemente, Robinson *et al.* (2001) estudaram a expressão de receptores para OT, E₂ e P₄ no endométrio bovino durante o ciclo estral ou período inicial da gestação por meio de hibridização *in situ* e imunohistoquímica. Nesse estudo, não foi observada a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para OTR entre os dias 12 e 18 após o estro no endométrio de fêmeas bovinas gestantes. Quanto ao ER, a presença de um concepto não surtiu efeito na expressão de RNAm para ER no epitélio luminal uterino, nas glândulas superficiais ou no estroma subepitelial entre os dias 12 e 14 pós-estro. Contudo, entre os dias 16 e 18 pós-fertilização, observou-se um aumento nas concentrações de RNAm para ER no epitélio luminal de fêmeas cíclicas, enquanto em fêmeas gestantes notou-se um declínio, tornando-se indetectável no décimo oitavo dia. Esses resultados indicam que a inibição de OTR promovida pelo IFN- τ não está relacionada temporalmente à expressão de ER nas fêmeas bovinas. Sabe-se que a região promotora do gene para OTR contém um Elemento de Resposta Estimulado por Interferon, ao qual se ligam os Fatores Regulatórios de Interferon-1 e 2 (Bathgate *et al.*, 1998). Assim, supõe-se que o IFN- τ possa inibir diretamente a expressão de OTR.

Alguns autores apontam outros possíveis mecanismos de ação antiluteolítica do (bIFN- τ). Especula-se que este possa modular a expressão de genes endometriais e, conseqüentemente, a síntese de proteínas que podem bloquear a síntese de PGF_{2 α} (Thatcher *et al.*, 1997; Binelli *et al.*, 2000; Schäfer-Somi, 2003). Austin *et al.* (1996) e Johnson *et al.*, (1998) observaram que o IFN- τ induz a síntese da proteína de reação cruzada com ubiquitina (UCRP), proteína que realiza degradação proteossomal. Em estudo recente, tal proteína foi designada de gene estimulado por interferon 15 (ISG15) e observou-se que a mesma se conjuga com proteínas citosólicas endometriais (Joyce *et al.*, 2005). Assim, alguns autores sugerem que o IFN- τ possa atuar intensificando a degradação da Proteína Quinase C, molécula fundamental na síntese de PGF_{2 α} endometrial e na luteólise (Austin *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1998). Ainda, especula-se que o IFN- τ possa inibir a luteólise, alterando a produção de PGF_{2 α} luteolítica para PGE₂, que é supostamente luteotrófica (Asselin e Fortier, 2000). Foi observado que o IFN- τ regula negativamente a expressão das enzimas prostaglandina F₂ sintase (Arosh *et al.*, 2004) e prostaglandina 9-ceto-redutase, desta forma possivelmente previne a produção de PGF_{2 α} endometrial (Asselin e Fortier 2000; Lafrance e Goff, 1990).

Provavelmente, a ação do IFN- τ envolve o controle da expressão gênica do endométrio (Wolf *et al.*, 2003), mas, até o momento, pouco se sabe sobre os mecanismos e as funções desses genes no contexto reprodutivo. Entretanto, recentemente alguns estudos foram realizados com o objetivo de observar a expressão gênica endometrial no período de periimplantação, na presença e ausência de concepção. Nesses estudos, utilizou-se a metodologia de análise comparativa entre pares de fêmeas gêmeas monozigóticas, em que uma fêmea recebeu um embrião e a outra não, o que reduz a variabilidade genética (Klein *et al.*, 2006). Neste estudo, observou-se a expressão de 38 genes sabidamente regulados por interferons do tipo I no endométrio das fêmeas prenhes. Alguns desses genes já foram relacionados com o período do reconhecimento da gestação, como o ISG15 (Austin *et al.*, 2004), 2' 5'-oligoadenilato sintetase (OAS; Schmitt *et al.*, 1993), proteína transmembrânica induzida por interferon 1 e 3 (IFITM-1, -3; Pru *et al.*, 2001), e proteína Mx 1 e 2 (Ott *et al.*, 1998), mas pouco ainda se sabe sobre os papéis dessas moléculas nesse processo. Sugeriu-se que a OAS afetou a síntese endometrial de PGF_{2 α} , possivelmente alterando o metabolismo do ácido araquidônico (Schmitt *et al.*, 1993). As proteínas IFITM-1 e -3 estão envolvidas nos processos de adesão celular induzidos por IFN (Deblandre *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1993). Hicks *et al.* (2003) relataram que a proteína Mx estava relacionada com a remodelação uterina. Bauersachs *et al.* (2006) examinaram a expressão gênica endometrial em novilhas cíclicas e gestantes por meio de abordagens moleculares comparativas (hibridização subtrativa e microarranjos). A compilação de seus resultados com os obtidos em Klein *et al.* (2006) e em Gray *et al.* (2006) demonstrou que 31% dos genes regulados positivamente nesses estudos são relacionados com as respostas imunes, 14% estão envolvidos nos processos de transdução de sinal, 10% participam de atividades de transporte, 9% estão comprometidos com proteólise, 8% participam da regulação de transcrição, 5% com processos de proliferação celular, 5% com sinalização célula-célula, 4% com metabolismo e 4% com indução de apoptose. Tais estudos devem contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no estabelecimento da gestação nas fêmeas bovinas.

Mensuração da expressão do IFN- τ

Atualmente diversas técnicas podem ser empregadas para observar a presença de uma molécula específica em um determinado evento fisiológico. A expressão de IFN- τ pode ser mensurada utilizando-se diversos métodos capazes de identificar essa proteína em meios de cultura ou fluidos biológicos, ou mesmo a

expressão de seu RNAm em tecidos e células.

A expressão do RNAm em células produtoras de IFN- τ tem sido monitorada por meio de modernas técnicas. Ealy *et al.* (2004) utilizaram a reação de polimerização em cadeia por transcriptase reversa (RT-PCR) para identificar diferentes isoformas de IFN- τ caprino em células de conceitos. Com o mesmo objetivo, Winkelman *et al.* (1999) empregaram esta técnica em conceitos ovinos e obtiveram sucesso na identificação das diferentes isoformas expressas no período de periimplantação. Ainda, por meio de PCR quantitativo em tempo real, outros pesquisadores observaram que a expressão de transcritos para essa proteína inicia-se próxima ao momento da formação da blastocle, evento que ocorre a partir de 7 dias pós-fertilização (Bertolini *et al.*, 2002). Um incremento na síntese de IFN- τ é observado durante o alongamento embrionário, observado entre os dias 12 e 17 da gestação, período em que o RNAm para IFN- τ é transcrito de forma mais abundante (Demmers *et al.*, 2001). Bertolini *et al.* (2002) relataram uma correlação positiva entre tamanho do trofoblasto e expressão de transcritos para IFN- τ . Entretanto, em estudo recente realizado por Robinson *et al.* (2006), apesar do notável incremento nas concentrações de IFN- τ no ambiente uterino entre os dias 14 e 18 da gestação, não foi observado aumento na síntese de RNAm para IFN- τ por unidade de massa de tecido trofoblástico. Assim, conclui-se que o aumento na produção de IFN- τ está relacionado com o crescimento trofoblástico.

Para observar a expressão protéica de IFN- τ em fluidos biológicos, técnicas como cromatografia e eletroforese têm sido freqüentemente utilizadas. Sinha *et al.* (2003) fizeram uso com sucesso do método de cromatografia líquida de alta *performance* para purificar o IFN- τ recombinante (roIFN-t) e determinar a produção dessa proteína por cepas da levedura *Pichia pastoris*. Ainda podem ser usados métodos de identificação de proteínas, com anticorpos específicos que propiciam a detecção da proteína de interesse. O teste de imunodifusão foi empregado para identificar bIFN- τ e oIFN- τ por Helmer *et al.* (1987). Atualmente, um radioimunoensaio para detecção do bIFN- τ foi desenvolvido por Takahashi *et al.* (2004). Outro método de ampla utilização é o *western blotting*, no qual se utiliza um anticorpo marcado para identificar proteínas após a amostra ser submetida à técnica de eletroforese. Alguns autores detectaram a expressão protéica de IFN- τ bovino, ovino e caprino (Ealy *et al.*, 1998; Guillomot *et al.*, 1998; Nagaya *et al.*, 2004). Aplicando microscopia confocal e eletrônica de transmissão associada à imunohistoquímica, Johnson *et al.* (2006) observaram a presença de IFN- τ no citoplasma e no núcleo de células trofoblásticas de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Outra possível maneira de estudar a presença de uma determinada molécula é por meio da mensuração de sua atividade biológica inerente a esta. Especialmente em relação aos interferons, moléculas complexas com diferentes isoformas, esse tipo de análise torna-se especialmente vantajoso. Nos primeiros ensaios biológicos aplicados ao estudo do IFN- τ , realizados na década de 80, observou-se que a atuação de concentrados protéicos secretados pelo conceito, infundidos no ambiente uterino, promoveu a extensão do ciclo estral (Helmer *et al.*, 1989; Knickerbocker *et al.*, 1986). Posteriormente, tal efeito antiluteolítico em fêmeas ovinas e bovinas também foi observado para isoformas recombinantes de IFN- τ (Martal *et al.*, 1990; Ott *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1995). Entretanto, a utilização de tal modelo para quantificar a atividade antiluteolítica foi inviabilizada devido à necessidade da utilização de grande número de animais experimentais. Assim, determinou-se vantajoso o desenvolvimento de ensaios biológicos *in vitro*, como os ensaios antivirais.

Segundo descrito por Armstrong (1981) e por Familetti *et al.* (1981), um ensaio antiviral conveniente, amplamente utilizado e que demanda um procedimento simples, consiste em mensurar a habilidade de preparações de interferon em proteger células contra os efeitos citotóxicos de vírus. Em ensaio desenvolvido por Rubinstein *et al.* (1981), mensurou-se a inibição do efeito citopático do vírus da estomatite vesicular em células Madin-Darby de rim bovino tratadas com interferons. De maneira geral, nesses ensaios tem-se que as potências das preparações contendo interferon são quantificadas pela determinação da resposta de células ao desafio com um vírus. Considera-se a atividade antiviral o recíproco da diluição de uma preparação requerida para produzir um estado antiviral que proteja 50% das células contra o efeito citopático máximo, observado nas preparações controle (i.e., sem interferon).

Cientes que o IFN- τ apresenta atividade antiviral, vários estudos relacionados aos aspectos do reconhecimento materno da gestação foram desenvolvidos usando ensaios de atividade antiviral como indicativo da secreção de IFN- τ . Kerbler *et al.* (1997) realizaram estudo para determinar a relação entre a concentração materna de progesterona e a síntese de IFN- τ pelos conceitos. Nesse estudo, a síntese de IFN- τ foi mensurada utilizando um ensaio de atividade antiviral adaptado a partir de Loewen e Derbyshire (1986). Empregando ensaio de atividade antiviral descrito por Rubinstein *et al.* (1981), Stojkovic *et al.* (1999) compararam a secreção de IFN-t por embriões obtidos *in vivo*, ou *in vitro* por transferência nuclear ou bipartição. Abecia *et al.* (2001) realizaram um estudo com ovelhas em que avaliaram a atividade antiviral em meios condicionados por conceitos através de ensaio descrito por Familetti *et al.* (1981) como parâmetro de competência embrionária em sintetizar IFN- τ . Ainda com o objetivo de estudar a influência de técnicas e meios de cultivo no desenvolvimento de embriões *in vitro*, alguns trabalhos abordaram a monitoração da secreção de IFN- τ por meio da observação da atividade antiviral (Hernandez-Ledezma *et al.*, 1993; Kubisch *et al.*, 1998; Larson *et al.*, 2001). No entanto, até o momento, não foi evidenciada a correlação entre as diferentes atividades exercidas pelos interferons, especificamente entre a atividade antiviral e a capacidade em modular a síntese de PGF_{2 α} (atividade antiluteolítica). Em estudo realizado por Parent *et al.* (2003) com três isoformas recombinantes de interferon

bovino e duas ovinas, não foi constatada relação entre as atividades antivirais e antiluteolítica observada em células epiteliais e estromais endometriais bovinas por essas diferentes isoformas. Outros estudos também demonstraram que isoformas variantes de IFN- τ apresentaram diferente atividade antiviral (Winkelman *et al.*, 1999) e atividade antiproliferativa (Ealy *et al.*, 1998).

Uma vez que a atividade antiluteolítica deve estar associada à viabilidade e competência embrionária, tornou-se fundamental o desenvolvimento de técnicas para quantificá-la. Recentemente, Marques *et al.* (2006) sugeriram uma metodologia de mensuração da atividade antiluteolítica por meio de um ensaio biológico que quantifica a inibição da síntese de PGF_{2 α} em uma linhagem definida de células endometriais bovinas (células BEND; Staggs *et al.*, 1998). A capacidade de fluidos biológicos suspeitos de conterem IFN- τ modularem a síntese de PGF_{2 α} estimulada por phorbol 12,13 dibutirato (Arnold *et al.*, 2000; Binelli *et al.*, 2000; Guzeloglu *et al.*, 2004b) foi equacionada matematicamente de forma a se obterem as atividades antiluteolítica de tais fluidos.

Perspectivas

As informações apresentadas nesta revisão evidenciam a atuação do interferon-tau no reconhecimento materno da gestação. Entretanto, novos estudos ainda devem ser realizados na tentativa de melhor compreender os mecanismos envolvidos no reconhecimento materno da gestação, especialmente em bovinos. Nessa espécie, a compreensão de tal evento fisiológico favorecerá o emprego de estratégias antiluteolíticas durante o período crítico (Binelli *et al.*, 2001; 2006). Apesar do alto impacto das perdas embrionárias nos índices reprodutivos, observa-se a escassez de dados sobre tais perdas nos rebanhos explorados nas condições brasileiras. As novas tecnologias de análise proteômica e genômica utilizadas por diversos grupos de pesquisa no mundo devem favorecer a geração de novas informações sobre as interações materno-fetais que ocorrem nesse período nas diferentes espécies, incluindo a bovina (Klein *et al.*, 2006; Bauersachs *et al.*, 2006). Portanto, as atuais ferramentas de pesquisa devem trazer novas perspectivas ao estudo dos mecanismos determinantes ao êxito do processo reprodutivo.

Referências

- Abecia JA, Forcada F, Zuñiga O. Differences in reproductive performance, embryo development, interferon-tau secretion by conceptus and luteal function in ewe lambs synchronized in oestrus before or after the spontaneous onset of luteal activity preceding puberty. *Reprod Dom Anim*, v.36, p.73-77, 2001.
- Alexenko AP, Leaman DW, Li L, Roberts RM. The antiproliferative and antiviral activities of IFN- τ variants in human cells. *J Interferon Cytokine Res*, v.17, p.769-779 1997.
- Armstrong JA. Cytopathic effect inhibition assay for interferon: Microculture plate assay. *Meth Enzymol*, v.78, p.381-387, 1981.
- Arnold DR, Binelli M, Vonk J, Alexenko AP, Drost M, Wilcox CJ, Thatcher WW. Intracellular regulation of endometrial PGF_{2 α} and PGE₂ production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon- τ . *Domest Anim Endocrinol*, v.18, p.199-216, 2000.
- Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, MacLaren LA, Fortier MA. Effect of interferon- τ on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostglandin E2. *Endocrinology*, v.145, p.5280-5293, 2004.
- Asselin E, Fortier MA. Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E2 reductase: effect of oxytocin and interferon-tau. *Biol Reprod*, v.62, p.125-131, 2000.
- Austin KJ, Carr AL, Pru JK, Hearne CE, George EL, Belden EL, Hansen TR. Localization of ISG15 and conjugated proteins in bovine endometrium using immunohistochemistry and electron microscopy. *Endocrinology*, v.145, p.967-975, 2004.
- Austin KJ, Ward SK, Teixeira MG, Dean VC, Moore DW, Hansen TR. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. *Biol Reprod*, v.54, p.600-606, 1996.
- Bartol FF, Roberts RM, Bazer FW, Lewis GS, Godkin JD, Thatcher WW. Characterization of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptuses. *Biol Reprod*, v.32, p.681-693, 1985.
- Bathgate RAD, Tillmann G, Ivell R. Molecular mechanism of the bovine oxytocin receptor gene regulation. *Biol Reprod Suppl*, n.58, p.160, 1998.
- Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SEM, Meyer HHD, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction*, v.132, p.319-331, 2006.
- Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, v.63, p.318-328, 2002.
- Binelli M, Guzeloglu A, Badinga L, Arnold DR, Sirois J, Hansen TR, Thatcher WW. Interferon- τ modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2

- from bovine endometrial cells. *Biol Reprod*, v.63, p.417-424, 2000.
- Binelli M, Machado R, Bergamaschi MACM, Silva JCB, Ibiapina BT, Bisinotto RS.** Conceitos e aplicações de estratégias antiluteolíticas visando o incremento da taxa de concepção em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. São Paulo, SP: FMVZ/USP, 2006: p.93-100.
- Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS.** Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Therio*, v.56, p.1451-1463, 2001.
- Björkman N.** Placentation. In: Ullmann HD, Brown EM (Ed.). *Textbook of veterinary histology*. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 1976. p.351-369.
- Capon DJ, Shepard HM, Goeddel DV.** Two distinct families of human and bovine interferon- α genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol Cell Biol*, v.5, p.768-779, 1985.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K.** Embryo implantation. *Dev Biol*, v.223, p.217-237, 2000.
- Chen Y, Green JA, Antoniou E, Ealy AD, Mathialagan N, Walker AM, Avallé MP, Rosenfeld CS, Hearne LB, Roberts RM.** Effect of administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*, v.147, p.2127-2137, 2006.
- Committee on Reproductive Nomenclature.** Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet*, v.62, p.216-237, 1972.
- Danet-Desnoyers C, Wetzels C, Thatcher WW.** Natural and recombinant bovine interferon-tau regulata basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F 2α and E $_2$ by epithelial and stromal cells in the endometrium. *Reprod Fertil Dev*, v.6, p.193-202, 1994.
- Darnell JE.** STATs and gene regulation. *Science*, v.277, p.1630-1635, 1997.
- Deblandre GA, Marinx OP, Evans SS, Majaj S, Leo O, Caput D, Huez GA, Wathélet MG.** Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. *J Biol Chem*, v.270, p.23860-23866, 1995.
- Demmers KJ, Derecka K, Flint A.** Trophoblast interferon and pregnancy. *Reproduction*, v.121, p.41-49, 2001.
- Diskin MG, Sreenan JM.** Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil*, v.59, p.463-468, 1980.
- Drost M, Ambrose JE, Thatcher M-J, Cantrell CK, Wolfsdorf KE, Hansen JF, Thatcher WW.** Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Therio*, v.52, p.1161-1167, 1999.
- Ealy AD, Green JA, Alexenko AP, Keisler DH, Roberts RM.** Different ovine interferon-tau genes are not expressed identically and their protein products display different activities. *Biol Reprod*, v.58, p.566-573, 1998.
- Ealy AD, Wagner SK, Sheils AE, Whitley NC, Kiesling DO, Johnson SE, Barbato GF.** Identification of interferon- τ isoforms expressed by the peri-implantation goat (*Capra hircus*) conceptus. *Domest Anim Endocrinol*, v.27, p.39-49, 2004.
- Evans SS, Collea RP, Leasure JA, Lee DB.** IFN- α induces homotypic adhesion and Leu-13 expression in human B lymphoid cells. *J Immunol*, v.150, p.736-747, 1993.
- Familetti PC, Rubinstein S, Petska SA.** A convenient and rapid cytopathic effect inhibition assay for interferon. *Meth Enzymol*, v.78, p.387-394, 1981.
- Fuchs AR, Behrens O, Helmer H, Liu C-H, Barros CM, Fields LJ.** Oxytocin and vasopressin receptor in bovine endometrium and myometrium during the oestrous -cycle and early pregnancy. *Endocrinology*, v.127, p.629-636, 1990.
- Godkin JD, Bazer FW, Roberts RM.** Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. *Endocrinology*, v.114, p.120-130, 1984.
- Godkin JD, Bazer FW, Session F, Roberts RM.** Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at days 13-21. *J Reprod Fertil*, v.71, p.57-64, 1982.
- Gray CA, Abbey CA, Beremand PD, Choi Y, Farmer JL, Adelson DL, Thomas TL, Bazer FW, Spencer TE.** Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon-tau in the ovine uterus. *Biol Reprod*, v.74, p.383-394, 2006.
- Gray PW, Goeddel DV.** Structure of the human immune interferon gene. *Nature*, v.26, p.859-863, 1982.
- Guillomot M, Reinault P, La Bonnardiere C, Charpigny G.** Characterization of conceptus-produced goat interferon tau analysis of its temporal and cellular distribution during early pregnancy. *J Reprod Fertil*, v.112, p.149-156, 1998.
- Guzeloglu A, Bilby TR, Meikle A, Kamimura S, Kowalski A, Michel F, MacLaren LA, Thatcher WW.** Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. *J Dairy Sci*, v.87, p.3268-3279, 2004a.
- Guzeloglu A, Michel F, Thatcher WW.** Differential effects of interferon- τ on the prostaglandin synthetic pathway in bovine endometrial cells treated with phorbol ester. *J Dairy Sci*, v.87, p.2032-2041, 2004b.
- Harda H, Fujita T, Myiamoto M, Kimura Y, Maruyama M, Furia A, Miyata T, Taniguchi T.** Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell*, v.58, p.729-739, 1989.

- Hauptmann R, Swetly P.** A novel class of human type I interferons. *Nucleic Acids Res*, v.13, p.4739-4749, 1985.
- Helmer SD, Hansen PJ, Anthony RV, Thatcher WW, Bazer FW, Roberts RM.** Identification of bovine trophoblast protein-1, a secretory protein immunologically related to ovine trophoblast protein-1. *J Reprod Fertil*, v.79, p.83-91, 1987.
- Helmer SD, Hansen PJ, Thatcher WW, Johnson JW, Bazer FW.** Intrauterine infusion of highly enriched bovine trophoblast protein-1 complex exerts an antiluteolytic effect to extend corpus luteum lifespan in cyclic cattle. *J Reprod Fertil*, v.87, p.89-101, 1989.
- Hernandez-Ledezma J, Mathialagan N, Villanueva C, Sikes JD, Roberts RM.** Expression of bovine trophoblast interferons bu in vitro-derived blastocyst is correlated with their morphological quality and stage of development. *Mol Reprod Dev*, v.36, p.1-6, 1993.
- Hicks BA, Etter SJ, Carnahan KG, Joyce MM, Assiri AA, Carling SJ, Kodali K, Johnson GA, Hansen TR, Mirando MA, Woods GL, Vanderwall DK, Ott TL.** Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. *J Anim Sci*, v.81, p.1552-1561, 2003.
- Horn S, Bathgate R, Lioutas C, Bracken K, Ivell R.** Bovine endometrial epithelial cells as a model system to study oxytocin receptor regulation. *Hum Reprod Update*, v.4, p.605-614, 1998.
- Imakawa K, Anthony RV, Kazemi M, Marotti KR, Polites HG, Roberts RM.** Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoderm. *Nature*, v.330, p.377-379; 1987.
- Jenner LJ, Parkinson TJ, Lamming GE.** Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows. *J Reprod Fertil*, v.91, p.49-58, 1991.
- Johnson GA, Austin KJ, Van Kirk EA, Hansen TR.** Pregnancy and interferon-tau induce conjugation of bovine ubiquitin cross-reactive protein to cytosolic uterine proteins. *Biol Reprod*, v.58, p.898-904, 1998.
- Johnson KM, Alvarez X, Borkhsenius ON, Kubisch M.** Nuclear and cytoplasmic localization of interferon- τ in in vitro-produced bovine blastocysts. *Reprod Nutr Dev*, v.46, p.97-104, 2006.
- Joyce MM, White FJ, Burghardt RC, Muniz JJ, Spencer TE, Bazer FW, Johnson GA.** Interferon stimulated gene 15 conjugates to endometrial cytosolic proteins and is expressed at the uterine-placental interface throughout pregnancy in sheep. *Endocrinology*, v.146, p.675-684, 2005.
- Kaluz S, Fisher PA, Kaluzova M, Sheldrick EL, Flint APF.** Structure of an ovine interferon receptor and its expression in endometrium. *J Mol Endocrinol*, v.17, p.207-215, 1996.
- Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie LE, Walton JS.** Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by conceptus in cattle. *Therio*, v.47, p.703-714, 1997.
- Kim S, Choi Y, Bazer FW, Spencer TE.** Identification of genes in the ovine endometrium regulated by interferon- τ independent of signal transducer and activator of transcription. *Endocrinology*, v.144, p.5203-5212, 2003.
- Kimmins S, MacLaren LA.** Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of estrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*, v.22, p.742-748, 2001.
- Klein C, Bauersachs S, Ulbrich SE, Einspanier R, Meyer HH, Schmidt SE, Reichenbach HD, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H, Wolf E.** Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. *Biol Reprod*, v.74, p.253-264, 2006.
- Knickerbocker JJ, Thatcher WW, Bazer FW, Drost M, Barron DH, Fincher KB, Roberts RM.** Proteins secreted by day -16 to -18 bovine conceptuses extend corpus luteum function in cows. *J Reprod Fertil*, v.77, p.381-391, 1986.
- Kubisch HM, Larson MA, Roberts RM.** Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, v.49, p.254-260, 1998.
- LaFleur DW, Nardelli B, Tsareva T, Mather D, Feng P, Semenuk M, Taylor K, Buergin M, Chinchilla D, Roschke V, Chen G, Ruben SM, Coleman TA, Moore PA.** Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. *J Biol Chem*, v.276, p.39765, 2001.
- LaFrance M, Goff AK.** Control of bovine uterine prostaglandin F2 alpha release *in vitro*. *Biol Reprod*, v.42, p.188-193, 1990.
- Lamming GE, Whates DC, Flint APF, Payne JH, Stevenson KR, Vallet JL.** Local actions of trophoblast interferons in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. *J Reprod Fertil*, v.105, p.165-175, 1995.
- Larson MA, Kimura K, Kubisch HM, Roberts RM.** Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN- τ . *Dev Biol*, v.98, p.9677-9682, 2001.
- Leaman DW, Roberts RM.** Genes for the trophoblast interferons in sheep, goat and musk ox, and distribution of related genes among mammals. *J Interferon Res*, v.12, p.1-11, 1994.
- Leiser R, Kaufmann P.** Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol*, v.245, p.57-60, 1994.
- Leung ST, Cheng Z, Shekdrick EL, Derecka K, Flint APF, Whates DC.** The effects of lipopolysaccharide and interleukins -1 α -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. *J Endocrinol*, v.168, p.497-508, 2001.

- L'Haridon RM, Huynh L, Assal NE, Martal J.** A single intrauterine infusion of sustained recombinant ovine interferon-tau extends corpus luteum lifespan in cyclic ewes. *Therio*, v.43, p.1031-1045, 1995.
- Li J, Roberts RM.** Interferon- τ and interferon- α interact with the same receptors in uterine endometrium: use of readily iodinated form of recombinant interferon- τ for binding studies. *J Biol Chem*, v.269, p.13544-13550, 1994a.
- Li J, Roberts RM.** Structure-function relationships in the interferon- τ (IFN- τ). Changes in receptor binding and in antiviral and antiproliferative activities resulting from site-directed mutagenesis performed near the carboxyl terminus. *J Biol Chem*, v.269, p.24826-24833, 1994b.
- Loewen KG, Derbyshire JB.** Interferon induction with polyinosinic: polycytidylic acid in the newborn piglet. Canadian. *J Vet Res*, v.50, p.232-237, 1986.
- Marques VB, Bertan CM, Lima MC, Fedozzi F, Bressan FF, Miglino MA, Meirelles FV, Zimmerknopf E, Binelli M.** Antiluteolytic activity in bovine uterine microenvironment. *Anim Reprod*, v.3, p.308, 2006. (abstract).
- Martal J, Degryse E, Charpigny G, Assal N, Reinault P, Charlier M, Gaye P, Lecocq JP.** Evidence for extended maintenance of the corpus luteum by uterine infusion of recombinant α -interferon (Trophoblastin) in sheep. *J Endocrinol*, v.127, p.R5-R8, 1990.
- Martal J, Lacroix MC, Loudes C, Saunier M, Wintenberger-Torres S.** Trophoblastin, an anti-luteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *J Reprod Fertil*, v.56, p.63-73, 1979.
- Mawhinney S, Roche JF.** Factors involved in oestrus cycle control in the bovine. In: Sreenan JM (Ed). *Control of reproduction in the cow*. Luxembourg: EEC, 1978. p.511-530.
- Meyer MD, Hansen PJ, Thatcher WW, Drost M, Badinga L, Roberts RM, Li J, Ott TL, Bazer FW.** Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ of cows in response to recombinant interferon- τ . *J Dairy Sci*, v.78, p.1921-1931, 1995.
- Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uzé G.** The type I interferon receptor: structure, function and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res*, v.19, p.1069, 1999.
- Moor RM, Rowson LEA.** Influence of the embryo and uterus on luteal function in the sheep. *Nature*, v.210, p.522-523, 1964.
- Moor RM, Rowson LEA.** The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. *J Endocrinol*, v.34, p.233-239, 1966.
- Nagata, Mantei N, Weissmann C.** The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon- α . *Nature*, v.287, p.401, 1980.
- Nagaya H, Kanaya TY, Kaki H, Tobita Y, Takahashi H, Hirako M, Yokomizo Y, Inumaru S.** Establishment of a large-scale purification procedure for purified recombinant bovine interferon-tau produced by a silkworm-baculovirus gene expression system. *J Vet Med Sci*, v.66, p.1395-1401, 2004.
- Nardelli B, LaFleur DW, Chinchilla D, Tsareva T, Guoxian C, Mather D, Shah D, Giri J, Ruben SM, Coleman TA, Moore PA.** IFN- κ , a novel type I interferon. *Eur Cytokine Netw*, v.11, p.39, 2000.
- Ott TL, Van Heeke G, Hostetler CE, Schalue TK, Olmsted JJ, Johnson HM, Bazer FW.** Intrauterine injection of recombinant ovine interferon-tau extends the interestrous interval in sheep. *Therio*, v.4, p.757-769, 1993.
- Ott TL, Yin J, Wiley AA, Kim HT, Gerami-Naini B, Spencer TE, Bartol FF, Burghardt RC, Bazer FW.** Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod*, v.59, p.784-794, 1998.
- Parent J, Villeneuve C, Alexenko AP, Ealy AD, Fortier MA.** Influence of different isoforms of recombinant trophoblastic interferons on prostaglandin production in cultured bovine endometrial cells. *Biol Reprod*, v.68, p.1035-1043, 2003.
- Pru JK, Austin KJ, Haas AL, Hansen TR.** Pregnancy and interferon-tau upregulate gene expression of members of the 1-8 family in the bovine uterus. *Biol Reprod*, v.65, p.1471-1480, 2001.
- Reid LE, Brasnett AH, Gilbert CS, Porter ACG, Gewert DR, Stark GR, Kerr IM.** A single DNA response element can confer inducibility by both α - and γ -interferons. *Proc Natl Acad Sci*, v.84, p.840-844, 1989.
- Roberts RM, Ealy AD, Alexenko AP, Han CS, Ezashi T.** Trophoblast interferons. *Placenta*, v.20, p.259-264, 1999.
- Roberts RM, Leaman DW, Cross JC.** Role of interferons in maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med*, v.200, p.7-18, 1992.
- Roberts RM, Liu L, Alexenko A.** New and atypical families of type I interferons in mammals: comparative functions, structures, and evolutionary relationships. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol*, v.56, p.287-325, 1997.
- Robinson RS, Fray MD, Whates DC, Lamming GE, Mann GE.** In vivo expression of interferon-tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon-tau protein during early pregnancy in the cow. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.470-474, 2006.
- Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Whates DC.** Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, 122, p.965-979, 2001.
- Roche JF, Prenderville DJ, Davis WD.** Calving rate following fixed-time insemination after a 12-day

- progesterone treatment in dairy cows, beef cows and heifers. *Vet Rec*, v.101, p.417-418; 1977.
- Rubinstein S, Familletti PC, Petska S.** Convenient assay for interferons. *J Virol*, v.2, p.755-758, 1981.
- Sartori R, Gumen A, Guenther JN, Souza AH, Wiltbank MC.** Comparison of artificial insemination (IA) versus embryo transfer in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, v.86, suppl.1, p.238, 2003. (abstract).
- Schäfer-Somi S.** Cytokines during the early pregnancy of mammals: a review. *Anim Reprod Sci*, v.75, p.73-79, 2003.
- Schmitt RA, Geisert RD, Zavy MT, Short EC, Blair RM.** Uterine cellular changes in 2',5'- oligoadenylate synthetase during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod*, v.48, p.460-466, 1993.
- Sen GC, Lengyel P.** The interferon system: a bird's eye view of the biochemistry. *J Biol Chem*, v.267, p.5017-5020, 1992.
- Sinha AE, Prazen BJ, Fraga CG, Synoves RE.** Valve-based comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection: instrumentation and figures-of-merit. *J Chromatogr A*, v.1019, p.79-87, 2003.
- Spencer TE, Bazer FW.** Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*, v.2, p. 49, 2004.
- Spencer TE, Bazer FW.** Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod*, v.53, p.1527-1543, 1995.
- Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW.** Ovine interferon- τ inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology*, v.136, p.4932-4944, 1995.
- Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC.** Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*, v.128, p. 657-668, 2004.
- Spencer TE, Ott TL, Bazer FW.** Expression of interferon regulatory factors one and two in the ovine endometrium: effects of pregnancy and ovine interferon tau. *Biol Reprod*, v.58, p. 1154-1162, 1998.
- Sreenan, JM, Mulvehill P.** The application of long and short-term progestagen treatments for oestrus cycle control in heifers. *J Reprod Fertil*, v.45, p.867-869; 1975.
- Staggs KL, Austin KJ, Johnson GA, Teixeira MG, Talbott CT, Doosley VA, Hansen TR.** Complex induction of bovine uterine proteins by interferon-tau. *Biol Reprod*, v.59, p.293-297, 1998.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD.** How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, v.67, p.227-264, 1998.
- Stewart WE.** *The interferon system*. New York: Springer-Verlag, 1979.
- Stojkovic M, Buttner M, Zakhartchenko V, Riedl J, Reichenbach HD, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E.** Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture; comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. *Anim Reprod Sci*, v.55, p.151-162, 1999.
- Takahashi H, Takahashi M, Nagaya H, Hirako M, Sawai K, Minaihashi A, Inumaru S, Yokomizo Y, Geshi M, Okano A, Okuda K.** Establishment of a specific radioimmunoassay for bovine interferon tau. *Therio*, v.63, p.1050-1060, 2004.
- Taniguchi T, Mantei N, Schwarzstein M, Nagata S, Muramatsu M, Wiessmann C.** Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. *Nature*, v.285, p.547-549, 1980.
- Thatcher WW, Binelli M, Burke J, Staples C, Ambrose JD, Coelho S.** Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Therio*, v.47, p.131-140, 1997.
- Winkelman GL, Roberts RM, James Peterson A, Alexenko AP, Ealy AD.** Identification of the expressed forms of ovine interferon-tau in the periimplantation conceptus: sequence relationships and comparative biological activities. *Biol Reprod*, v.61, p.1592-1600, 1999.
- Wishart DF, Young IM, Drew SB.** A comparison between the pregnancy rates of heifers inseminated once or twice after progestin treatment. *Vet Rec*, v.101, p.230-231, 1977.
- Wolf E, Arnold GJ, Bauersachs S, Beier HM, Blum H, Einspanier R, Frölich T, Herrier A, Hiendleder S, Prelle K, Reichenbach H-D, Stojkovic M, Wenigerkind H, Sinowatz F.** Embryo-Maternal communication in bovine – strategies for deciphering a complex cross-talk. *Reprod Dom Anim*, v.38, p.276-289, 2003.
- Xiao C, Liu WJ, Sirois J, Goff AK.** Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon- τ in bovine epithelial cells. *Endocrinology*, v.139, p.2293-2299, 1998.