

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL
CAMPUS DE DRACENA**

Laura Chuba Machado Rolniche

Médica Veterinária

**EFEITOS DE DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS NA SÍNTESE
DE PGF₂ α E PGE₂ EM EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dracena

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL
CAMPUS DE DRACENA

Laura Chuba Machado Rolniche

Médica Veterinária

**EFEITOS DE DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS NA SÍNTESE
DE PGF₂ α E PGE₂ EM EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Tecnológicas - Unesp, Câmpus de
Dracena, como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientadora: **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**

Dracena

2024

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação
Campus de Dracena

R755e

Rolniche, Laura Chuba Machado

Efeitos de diferentes ácidos graxos na síntese de PGF2 α e PGE2 em embriões bovinos produzidos *in vitro* / Laura Chuba Machado Rolniche. -- Dracena: [s.n.], 2024.
111 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2024.

Orientadora: Claudia Maria Bertan Membrive

1. Bovinos. 2. Embriões. 3. Prostaglandinas. 4. Prenhez. 5. Ácidos graxos. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

A implementação da Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) no Brasil, com o objetivo de aumentar o número de bezerros geneticamente superiores, representa uma estratégia alinhada aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Organização das Nações Unidas (ONU). A PIVE promove a formação de recursos humanos capacitados e a inovação tecnológica, contribuindo para uma pecuária mais sustentável e eficiente, reduzindo a fome e melhorando a segurança alimentar. A utilização de ácidos graxos específicos, adicionados ao meio de cultivo da PIVE, pode aumentar a quantidade e qualidade dos embriões produzidos, aumentando inclusive a taxa de prenhez por embrião transferido às receptoras.

EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

The implementation of In Vitro Embryo Production (IVP) in Brazil, aiming to increase the number of genetically superior calves, represents a strategy aligned with the United Nations (UN) Sustainable Development Goals. IVP promotes the development of skilled human resources and technological innovation, contributing to more sustainable and efficient livestock farming, reducing hunger, and improving food security. The use of specific fatty acids, added to the IVP culture medium, can enhance the quantity and quality of the embryos produced, thereby increasing the pregnancy rate per embryo transferred to recipients.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA
DISSERTAÇÃO:

Efeitos de diferentes ácidos graxos na síntese de PGF2 α e
PGE2 em embriões bovinos produzidos in vitro

AUTORA: LAURA CHUBA MACHADO ROLNICHE

ORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências, pela
Comissão Examinadora:

Profa. Assoc. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE (Participação Virtual)
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – FCAT - Unesp
- Câmpus de Dracena



Documento assinado digitalmente
CALIÊ CASTILHO SILVESTRE
Data: 14/06/2024 14:44:57-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. CALIÊ CASTILHO (Participação Virtual)
Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência Animal / UNOESTE - Presidente Prudente, SP



Documento assinado digitalmente
MILENA LOPES OLIVEIRA
Data: 14/06/2024 12:40:04-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. MILENA LOPES OLIVEIRA (Participação virtual)
Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão

Dracena, 14 de junho de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LAURA CHUBA MACHADO ROLNICHE, nascida em 4 de janeiro de 1999, na cidade de Presidente Epitácio, estado de São Paulo. Realizou o curso Técnico em Administração pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) em Presidente Epitácio, estado de São Paulo, concluído em 2016. Iniciou a graduação em Medicina Veterinária em fevereiro de 2017, na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em Presidente Prudente, estado de São Paulo. Durante a graduação, desenvolveu duas iniciações científicas na área de reprodução animal, intituladas “Impacto da α -L-fucosidase no processo de fertilização *in vitro* durante a produção de embriões bovinos” com vigência de 2019 a 2020 e “Avaliação da dimensão fractal no oviduto bovino submetido à super estimulação ovariana” com vigência de 2020 a 2021; ambas sob orientação do Prof. Dr. Anthony Cesar de Souza Castilho. Em agosto de 2022, ingressou no curso de Mestrado acadêmico em Ciência e Tecnologia Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Dracena, estado de São Paulo, onde desenvolveu sua dissertação de mestrado e também participou de vários outros estudos do grupo no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), sob orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive.

DEDICATÓRIA

Ao meus pais, ***Nilson Rolniche*** e ***Eliane Chuba Machado Rolniche***. Aos meus avós, ***Maria Rolnich Brocchi***, ***Jandira Guimaro Chuba Machado*** e ***Luiz Carlos Machado***. Todos me educaram e me possibilitaram mais essa conquista, exemplos fundamentais para a minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, que nas horas mais difíceis me deu forças para continuar e persistir no meu sonho.

Aos meus **pais e avós**, por todo apoio e suporte durante esse longo caminho percorrido.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal**, da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT, UNESP, Câmpus de Dracena e Ilha Solteira, pela oportunidade oferecida.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio ao Programa e pela concessão da bolsa de mestrado, de 01/08/2022 a 31/05/2024.

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro concedido, Processo nº 2022/01110-3, que possibilitou o desenvolvimento desse estudo.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**, da UNESP Câmpus de Dracena e Ilha Solteira, pelos ensinamentos e formação.

Em especial, a minha orientadora **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**. Agradeço por ter me guiado durante todo esse processo, enfrentando comigo todas as dificuldades encontradas e pela constante motivação e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Pugliesi**, responsável pelo Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na realização das mensurações por ELISA para a quantificação da PGF2 α e PGE2 e pelo valioso apoio científico.

Ao **Prof. Dr. Alan Ealy**, do Department of Animal and Poultry Science da Virginia Tech, Blacksburg, VA, Estados Unidos, pela imensa colaboração ao grupo. Agradeço por dividir suas experiências e tornar nossos estudos mais relevantes.

Ao **Prof. Dr. Vitor Mercadante**, do Department of Animal and Poultry Science da Virginia Tech, Blacksburg, VA, Estados Unidos, pela colaboração científica ao projeto.

A **Dra. Isabella Rio Feltrin**, pelo valioso auxílio nas análises de RT-qPCR dos embriões e análises estatísticas.

A **Ms. Amanda Guimarães da Silva**, pela disposição e atenção dispensada para auxiliar nas análises de mensurações por ELISA para a quantificação da PGF2 α e PGE2.

Aos queridos membros do Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Unesp de Dracena/SP, **Lucas de Oliveira Bezerra**, **Adriano Felipe Mendes**, **Maria Eduarda Rocha Pinto**, **Catarina Lazarevicius Prestes**, **Emily Silva do Nascimento** e **Gabriel Souza da Silva**, pelo auxílio durante o desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus amigos e companheiros de vida que conquistei ao longo dessa jornada, **Lucas de Oliveira Bezerra**, **Adriano Felipe Mendes**, **Maria Eduarda Rocha Pinto** e agregado **Dreyfus Martins Bertoli**, agradeço imensamente pelo suporte ao decorrer de todo o mestrado, que não mediram esforços para conquistar o sucesso desse trabalho.

Aos membros do **Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM)**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pela colaboração nas análises laboratoriais.

Aos membros da banca de qualificação, **Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Mendes** da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) e **Profa. Dra. Alessandra Bridi** da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por toda contribuição pessoal e científica.

Ao médico veterinário, **Lucas Henrique Gaspar**, que junto ao frigorífico ACOVACAT e seus colaboradores, não mediram esforços para garantir a disponibilidade dos ovários que serviram de base para as pesquisas desenvolvidas.

Aos **funcionários e técnico-administrativos** da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, da Unesp de Dracena/SP, por todo o suporte oferecido.

Agradeço a todas as pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento desse estudo.

A todos minha enorme gratidão!

“Enquanto eles não se conscientizarem, não serão rebeldes autênticos e, enquanto não se rebelarem, não têm como se conscientizar”.

(Orwell, 1984).

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Dracena



Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Efeito de diferente ácidos graxos na síntese de PGE2 e PGE2a em células trofoblásticas e embriões de bovinos"** (Effect of different fatty acids on PGE2 and PGE2a synthesis in bovine trophoblast cells and embryos), registrada com o nº **18/2022 – CEUA**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Claudia Maria Bertan Membrive** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em **28/07/2022**.

Dracena, 10 de agosto de 2022.

Prof.ª Dra Jaqueline Dalbello Biller

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil

Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLÉICO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS SOBRE A SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA PGE2 E PGF2A" (EFFECTS OF LINOLEIC ACID SUPPLEMENTATION ON IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS ON PROSTAGLANDIN PGE2 AND PGF2A SYNTHESIS) registrada com o nº 07/2021 - CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Claudia Maria Bertan Membrive** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de **11/06/2021**.

Dracena, 14 de junho de 2021.



Prof.ª Dra Jaqueline Dalbello Biller
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

RESUMO

Em bovinos a mortalidade embrionária precoce (MEP) causada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP) entre os dias 15 e 19 após a fecundação, constitui uma das principais causas de insucesso reprodutivo. Estratégias que visem melhorar o RMP durante esse período são de interesse econômico. Dentre as estratégias, inclui-se a redução da síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α) pelo endométrio materno e/ou a maximização do estímulo anti-luteolítico induzido pelo embrião e conceito, envolvendo o aumento da síntese de prostaglandina E2 (PGE2). A PGF2 α é responsável pela regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (CL), sendo sua síntese determinante na MEP. Por outro lado, a PGE2, sintetizada tanto pelo endométrio materno e quanto pelo embrião, apresenta efeitos luteotróficos e anti-luteolíticos, assim favorecendo o RMP. A suplementação lipídica de oócitos e embriões foi relacionada ao aumento da qualidade embrionária e também é reconhecida por modular a biossíntese de eicosanóides, dentre eles a PGF2 α e PGE2. Desse modo, a hipótese da presente proposta é que a suplementação do meio maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e/ou do meio de cultivo *in vitro* de embriões (CIV) com ácidos graxos específicos favorece a produção *in vitro* de embriões bovinos, reduz a síntese de PGF2 α , aumenta a síntese de PGE2 e aumenta a razão PGE2/PGF2 α . No estudo 1, objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 100 μ M de ácido linoleico conjugado (CLA), 100 μ M de ácido linoleico (AL), 100 μ M de ácido oleico (AO) ou 50 μ M de ácido eicosapentanoico (EPA) + 50 μ M de ácido docosahexaenoico (DHA), no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (CIV), sobre a taxa de blastocistos produzidos no D7 e taxa de eclosão no D9, assim como na síntese de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α no meio de cultivo D9. No estudo 2, objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de CLA, durante a MIV e CIV ou somente no CIV, na taxa de produção de blastocisto no D7 e taxa de eclosão no D9, na síntese de PGE2 e PGF2 α e na expressão de transcritos PTGS2, AKR1B1, PTGES e IFN- γ em blastocistos, por RT-qPCR. No estudo 1, os ácidos graxos utilizados na suplementação não aumentaram a produção embrionária comparado ao grupo controle, contudo foi reduzida no grupo EPA + DHA no D7 e D9. O grupo suplementado com AL promoveu uma maior concentração de PGF2 α comparado aos demais grupos. O grupo AO apresentou maiores concentrações de PGF2 α quando comparado aos grupos controle, CLA e EPA + DHA. Os grupos CLA e EPA + DHA apresentaram menores concentrações de PGF2 α quando comparado aos demais grupos. As concentrações de PGE2 foram maiores ($P = 0,0001$) no grupo controle, AL e AO quando comparado aos grupos CLA e EPA + DHA. O grupo controle e AL apresentaram maior razão PGE2/PGF2 α quando comparado ao grupo EPA + DHA, onde EPA+DHA apresentou a menor razão. No estudo 2, a suplementação de CLA na MIV e CIV ou somente no CIV reduziu a síntese de PGE2, PGF2 α e a razão PGE2/PGF2 α em embriões no D9, sem alterar a abundância dos transcritos PTGS2, AKR1B1, PTGES e IFN- γ , e não promoveu aumento na produção embrionária no D7 e D9 (D0 = dia da fertilização *in vitro*). Conclui-se que a suplementação do meio de cultivo de oócitos e/ou embriões com ácidos graxos específicos modificaram a síntese de prostaglandina e a razão de PGE/PGF2 α no embrião, não aumentando a produção embrionária.

Palavras-chave: Bovinos. Embriões. Prostaglandinas. Prenhez. Ácidos graxos.

ABSTRACT

In cattle, early embryonic mortality (EEM) caused by failures in maternal recognition of pregnancy (MRP) between days 15 and 19 after fertilization is one of the main causes of reproductive failure. Strategies to improve MRP during this period are of economic interest. Among these strategies are the reduction of prostaglandin F₂ α (PGF₂ α) synthesis by the maternal endometrium and/or the maximization of the anti-luteolytic stimulus induced by the embryo and conceptus, involving increased prostaglandin E₂ (PGE₂) synthesis. PGF₂ α is responsible for the functional and structural regression of the corpus luteum (CL), and its synthesis is a determining factor in EEM. On the other hand, PGE₂, synthesized by both the maternal endometrium and the embryo, has luteotrophic and anti-luteolytic effects, thus favoring MRP. Lipid supplementation of oocytes and embryos has been associated with increased embryo quality and is also known to modulate eicosanoid biosynthesis, including PGF₂ α and PGE₂. Thus, the hypothesis of this proposal is that supplementation of the in vitro maturation (IVM) medium for oocytes and/or the in vitro culture (IVC) medium for embryos with specific fatty acids favors the in vitro production of bovine embryos, reduces PGF₂ α synthesis, increases PGE₂ synthesis, and increases the PGE₂/PGF₂ α ratio. In study 1, the objective was to determine the effects of supplementation with 100 μ M of conjugated linoleic acid (CLA), 100 μ M of linoleic acid (LA), 100 μ M of oleic acid (OA), or 50 μ M of eicosapentaenoic acid (EPA) + 50 μ M of docosahexaenoic acid (DHA) in the in vitro culture of bovine embryos (IVC) on the blastocyst production rate on day 7 (D7) and hatching rate on day 9 (D9), as well as on PGF₂ α and PGE₂ synthesis and the PGE₂/PGF₂ α ratio in the D9 culture medium. In study 2, the objective was to determine the effects of supplementation with 50 μ M, 100 μ M, and 150 μ M of CLA during IVM and IVC or only in IVC on the blastocyst production rate on D7 and hatching rate on D9, on PGE₂ and PGF₂ α synthesis, and on the expression of PTGS2, AKR1B1, PTGES, and IFN- τ transcripts in blastocysts by RT-qPCR. In study 1, the supplemented fatty acids did not increase embryo production compared to the control group, but it was reduced in the EPA + DHA group on D7 and D9. The LA-supplemented group promoted a higher concentration of PGF₂ α compared to the other groups. The OA group showed higher PGF₂ α concentrations compared to the control, CLA, and EPA + DHA groups. The CLA and EPA + DHA groups showed lower PGF₂ α concentrations compared to the other groups. PGE₂ concentrations were higher ($P = 0.0001$) in the control, LA, and OA groups compared to the CLA and EPA + DHA groups. The control and LA groups showed a higher PGE₂/PGF₂ α ratio compared to the EPA + DHA group, which had the lowest ratio. In study 2, CLA supplementation during IVM and IVC or only in IVC reduced the synthesis of PGE₂, PGF₂ α , and the PGE₂/PGF₂ α ratio in embryos on D9 without altering the abundance of PTGS2, AKR1B1, PTGES, and IFN- τ transcripts, and it did not increase embryo production on D7 and D9 (D0 = day of in vitro fertilization). It is concluded that the supplementation of the culture medium for oocytes and/or embryos with specific fatty acids modified prostaglandin synthesis and the PGE₂/PGF₂ α ratio in the embryo, without increasing embryo production.

Keywords: Cattle. Embryos. Prostaglandins. Pregnancy. Fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de síntese, sinalização e metabolismo de eicosanoides no endométrio.....	33
Figura 2	Mecanismos envolvidos na regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (Painel A) e na manutenção estrutural e funcional do corpo lúteo, durante o reconhecimento materno fetal (Painel B).....	35
Figura 3	Representação esquemática ilustrando a síntese de prostaglandinas no embrião e conceito.....	37
Figura 4	Modelo hipotético do experimento 1.....	44
Figura 5	Modelo hipotético do experimento 2.....	45
Figura 6	Delineamento Experimental.....	63
Figura 7	Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) ou Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , sobre a porcentagem da taxa de embriões clivados.....	67
Figura 8	Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , sobre a porcentagem da taxa de blastocistos no D7.....	68
Figura 9	Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , sobre a porcentagem da taxa de blastocistos no D9.....	69
Figura 10	Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , sobre a porcentagem da taxa de blastocistos eclodidos.....	70
Figura 11	Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos	

	produzidos <i>in vitro</i> , na síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α).....	71
Figura 12	Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , na síntese de prostaglandina E2 (PGE2).....	72
Figura 13	Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , na razão de PGE2/PGF2 α	73
Figura 14	Sumarização dos resultados apresentados com a suplementação de CLA, AL, AO e EPA+DHA durante o cultivo <i>in vitro</i> de embriões.....	74
Figura 15	Representação esquemática dos tratamentos com CLA realizados na maturação e cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos (Experimento 1).....	93
Figura 16	Representação esquemática dos tratamentos com CLA realizados somente no cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos (Experimento 2).....	94
Figura 17	Experimento 1. Efeito da suplementação com 50, 100 e 150 μ M de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) durante a MIV e CIV na da taxa de blastocistos no D7.....	100
Figura 18	Experimento 1. Efeitos da suplementação com 50, 100 e 150 μ M de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) em meio de maturação (MIV) e de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> na síntese de PGE2, PGF2 α e razão PGE2/PGF2 α	101
Figura 19	Experimento 2. Efeitos da suplementação com 50, 100 e 150 μ M de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , sobre a porcentagem da taxa de blastocistos no D7 e taxa de blastocistos eclodidos.....	102
Figura 20	Experimento 2. Efeitos da suplementação com 50, 100 e 150 μ M de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) em meio cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> na síntese de PGE2, PGF2 α e razão PGE2/PGF2 α	103

Figura 21	Experimento 2. Efeitos da suplementação com 50, 100 μ M de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> na expressão de transcritos para IFN- γ , AKR1B1, PTGS2 e PTGES.....	104
Figura 22	Sumarização dos resultados apresentados nos meios de cultura durante a MIV e CIV ou somente no CIV de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sumarização dos efeitos de ácidos graxos somente em oócitos e embriões segundo a espécie, principais efeitos observados e referência bibliográfica.....	41
Tabela 2	Símbolo dos genes alvo e genes referência, sequência de pares de primer forward e reverse, número de acesso no GenBank e a referência utilizada para gerar os primers.....	98
Tabela 3	Dados de validação dos primers e da concentração das amostras dos genes alvo e de referência para RT-qPCR.....	99

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
μM	Micromolar
AA	Ácido Araquidônico
AGPI	Ácido Graxo Poliinsaturado
AGs	Ácidos graxos
AKR1B1	Enzima PGF sintase B1
AKR1C3	Enzima PGF sintase C3
AKR1C4	Enzima PGF sintase C4
AL	Ácido Linoleico
AO	Ácido Oleico
Ca	Cálcio
CBR1	Carbonyl redutase 1
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo Lúteo
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
CO ₂	Dióxido de Carbono
COCs	Complexo <i>Cumulus</i> -Oócitos
COX-1	Cicloxygenase 1
COX-2	Cicloxygenase 2
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IFNR	Receptores de interferon-tau
IFN-t	Interferon-tau
ISGF3	Fator Gênico 3 Estimulado por Interferon

MEP	Mortalidade Embrionária Precoce
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MUFA	Ácido Graxo Monoinsaturado
°C	Graus Celsius
OPU	Aspiração Folicular Guiada por Ultrassom
OT	Ocitocina
P4	Progesterona
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGH2	Prostaglandina H2
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaglandina I2
PGI2	Prostaglandina I2
PGIs	Enzimas PGIs sintases
PGs	Prostaglandinas
PIB	Produto Interno Bruto
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA2	Fosfolipase A2
PLAS	Enzima Fosfolipase Citosólica A2
PTGDS	Enzima PGD sintase
PTGE1	Enzima PGE sintase 1
PTGE2	Enzima PGE sintase 2
PTGE3	Enzima PGE sintase 3
PTGER	Receptor de prostaglandina E
PTGES	Enzimas PGEs sintases
PTGFR	Receptor de prostaglandina F
PTGIs	Enzimas PGIs sintases
PTGS1	Prostaglandina-endoperóxido sintase 1
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintase 2
RMF	Reconhecimento Materno Fetal

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SLCO2A1	Proteína transportadora de membrana
TEC	Toneladas Equivalente de Carcaça
TETF	Transferência de Embriões em Tempo Fixo
µg	Micrograma
ω-3	Ômega 3
ω-6	Ômega 6
ω-9	Ômega 9

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	27
1.1 Introdução.....	27
1.2 Revisão de Literatura.....	29
1.2.1 Reconhecimento materno da prenhez (RMP) em fêmeas bovinas	29
1.2.2 Biossíntese e secreção de prostaglandinas	31
1.2.3 Síntese de prostaglandina pelo embrião	36
1.2.4 Ação dos ácidos graxos insaturados na síntese de prostaglandinas	37
1.3 Hipótese	44
1.3.1 Estudo 1	44
1.3.2 Estudo 2	45
1.4 Objetivo	45
1.4.1 Estudo 1	45
1.4.2 Estudo 2	46
REFERÊNCIAS.....	47
CAPÍTULO 2 – ESTUDO 1 SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS NO MEIO DE CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> ALTERA A BIOSÍNTESE DE PGF₂α E PGE₂ E A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA.....	56
2.1 Introdução.....	59
2.2 Material e Métodos	61
2.2.1 Local do experimento	61
2.2.2 Recuperação dos complexos <i>cumulus</i> -oócito e seleção	61
2.2.3 Delineamento experimental.....	62
2.2.4 Maturação <i>in vitro</i> dos complexos <i>cumulus</i> -oócito (COCs)	63
2.2.5 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	64
2.2.6 Preparo das soluções de ácidos graxos.....	64

2.2.7 Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões (CIV)	65
2.2.8 Avaliação da taxa de clivagem e produção embrionária	65
2.2.9 Coleta do meio de cultivo	66
2.2.10 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	66
2.2.11 Análise estatística.....	66
2.3 Resultados	67
2.3.1 Taxa de clivagem no D3.....	67
2.3.2 Taxa de blastocisto no D7	67
2.3.3 Taxa de blastocisto no D9	68
2.3.4 Taxa de eclosão	69
2.3.5 Concentrações de PGF2 α no D9	70
2.3.6 Concentrações de PGE2 no D9	71
2.3.7 Efeitos sobre a Razão de PGE2/PGF2 α no D9.....	72
2.4 Discussão	74
2.5 Conclusão	79
REFERÊNCIAS.....	80
CAPÍTULO 3 – ESTUDO 2 EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA E NA BIOSÍNTESE DE PGF2α E PGE2 EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>.....	84
3.1 Introdução.....	89
3.2 Materiais e Métodos	90
3.2.1 Local do experimento	90
3.2.2 Recuperação dos complexos <i>cumulus</i> -oócito e seleção	91
3.2.3 Preparo da solução estoque de CLA.....	91
3.2.4 Delineamento experimental.....	92
3.2.5 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	94
3.2.6 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	95

3.2.7 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	95
3.2.8 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para PGF2 α e PGE2	96
3.2.9 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR).....	96
3.2.10 Análise estatística.....	99
3.3 Resultados	99
3.3.1 Experimento 1 (Tratamentos na MIV e CIV).....	99
3.3.1.1 Efeito na produção de embriões o D7	99
3.3.1.2 Efeito na síntese de PGE2, PGF2 α e razão PGE2/PGF2 α	100
3.3.2 Experimento 2 (Tratamentos somente no CIV)	101
3.3.2.1 Efeito na produção de embriões o D7 e D9.....	101
3.3.2.2 Efeito na síntese de PGE2, PGF2 α e razão PGE2/PGF2 α	102
3.3.2.3 Efeito na expressão de <i>IFN-t</i> , <i>AKR1B1</i> , <i>PTGES</i> e <i>PTGS2</i>	103
3.4 Discussão	105
3.5 Conclusão	109
REFERÊNCIAS.....	110

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1.1 Introdução

A pecuária de corte no Brasil tem se destacado nos últimos anos, em relação ao cenário econômico nacional e internacional, devido aos avanços nos índices de produção de carne alcançados. Foi registrado aumento do número de animais abatidos e, portanto, na taxa de desfrute e aperfeiçoamento nos sistemas de produção, enfatizando o destaque para o emprego das biotecnologias da reprodução (Nogueira *et al.*, 2013). O crescimento da população mundial e a demanda por alimento tem instigado o avanço na produtividade brasileira.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), em 2022 foram produzidos 10,79 milhões de toneladas equivalente de carcaça (TEC), sendo que 3,02 milhões de TEC foram exportadas, incrementando a economia. Atualmente o agronegócio contribui com aproximadamente 24,8% do Produto Interno Bruto (PIB) (CEPEA, 2022). Considerando esse panorama, o Brasil detém o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 220 milhões de bovinos correspondendo a 14,3% do rebanho mundial, no entanto, ainda não supera o volume de produção de carne dos Estados Unidos (ANUALPEC, 2023; FAPRI, 2023).

A produtividade de um rebanho está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, as quais devem apresentar a produção de um bezerro/matriz/ano, com intervalo entre partos de 12 meses, sendo fator limitante na pecuária de corte. Em 2022, aproximadamente 64 milhões de matrizes estavam aptas a reprodução, apesar disso, apenas 23,5% foram submetidas à inseminação artificial (IA) e destas 80% representavam raças de corte (ASBIA, 2022; Baruselli *et al.*, 2019; Nogueira *et al.*, 2013). Em 2023, o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) cresceu 91,2% e a taxa de concepção 49,1% em rebanhos de corte comerciais, atualmente mais de 90% das fêmeas bovinas inseminadas são por IATF. No entanto, estabelecendo uma análise comparativa de 2023 com 2022, houve um recuo de 10,2% na venda de protocolos de IATF, reduzindo o percentual de animais inseminados por essa técnica. A queda registrada pode estar atribuída à retração do mercado após o grande crescimento nos últimos anos e a mudanças no ciclo da pecuária, tendo maior

oferta de fêmeas para o abate por causa da queda de 20 a 30% no valor do bezerro. Apesar disso, a consolidação da IATF continua em evolução (Baruselli, 2023).

Biotécnicas reprodutivas como a transferência de embrião em tempo fixo (TETF), associada a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), estão sendo cada vez mais utilizadas para intensificar o melhoramento genético e a produtividade, proporcionando a multiplicação exponencial de matrizes com alto valor genético. No Brasil, a produção anual de embriões bovinos teve um aumento de 800% ao longo da última década. De 2020 a 2021, houve crescimento de 35,3% da PIVE na América do Sul, sendo o Brasil o país com maior contribuição para o aumento desse índice e é consagrado como o segundo maior produtor de embriões *in vitro* no mundo procedendo os EUA (Viana, 2022). O Brasil tem destaque na produção mundial de embriões devido ao rebanho nacional ser composto predominantemente por animais zebuínos (*Bos taurus indicus*), que reconhecidamente apresentam maiores taxas de recuperação de oócitos de doadoras por meio da técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) quando comparado a animais taurinos (*Bos taurus taurus*). É sabido que o número de embriões produzidos *in vitro* depende da quantidade e qualidade dos oócitos recuperados, sendo importante identificar e selecionar matrizes com maior potencial produtivo, tanto em número de oócitos coletados como na capacidade de conversão de oócitos em embriões.

Na TETF os embriões produzidos e transferidos para as fêmeas receptoras dificilmente ultrapassam a taxa de prenhez de 50% aos 30 dias pós TETF (Grunert *et al.*, 2005). Presume-se que um dos principais entraves na performance da pecuária de corte é a mortalidade embrionária precoce (MEP), que acontece entre os dias 15 e 19 após a fecundação, designado de “período crítico”. A MEP é determinada pela incompetência do conceito (embrião e membranas anexas) produzir o interferon-tau (IFN-t), estas citosinas interagem diretamente com o endométrio materno, prevenindo a secreção pulsátil de prostaglandina F2 α (PGF2 α), e consequentemente a luteólise, proporcionando o reconhecimento materno da prenhez (RMP) e o estabelecimento da prenhez (Binelli *et al.*, 2001). Para garantir o êxito no estabelecimento da prenhez são necessários três fatores fundamentais, a boa receptividade do endométrio, qualidade do embrião na fase de blastocisto e comunicação sincronizada entre endométrio e embrião (Sadeghi, 2012).

O conceito durante o período crítico, apresenta intenso alongamento, produzindo quantidades crescentes de IFN-t, que possibilitam alterações fisiológicas

no embrião, endométrio e corpo lúteo (CL) para o sucesso do RME. O IFN-t, sintetizado e secretado pelas células trofoblásticas do conceito, foi caracterizado como a principal molécula envolvida no RMP na espécie bovina (Robinson *et al.*, 2006; Ealy; Yang, 2009). O IFN-t interage com o endométrio materno bloqueando a liberação pulsátil de PGF2 α e estimulando a secreção de prostaglandina E2 (PGE2). A PGF2 α exerce ação luteolítica, promovendo a regressão funcional e estrutural do CL. A PGE2 desempenha ação luteotrófica e anti-luteolítica, mantendo a funcionalidade do CL e elevadas concentrações de progesterona (P4) para manutenção da prenhez (Spencer *et al.*, 2007). Quando o conceito produz concentrações suficientes do IFN-t, o endométrio apresenta a diminuição da síntese de PGF2 α e aumento da síntese de prostaglandina E2 (PGE2). Na incapacidade do conceito em promover essas ações coordenadas, a luteólise é iniciada e a MEP é estabelecida.

Reconhecidamente, alguns ácidos graxos apresentam potencial de incrementar a qualidade de embriões produzidos *in vitro*. Os embriões possuem a capacidade de incorporar e metabolizar ácidos graxos específicos, quando adicionados no meio de cultivo e estabelecem modificações na biossíntese das prostaglandinas (PGs), bem como exercem respostas diferentes de acordo com o tecido e concentração utilizada (Whates *et al.*, 2007). Considerando o impacto das perdas econômicas ocasionadas pela MEP, as estratégias que visam favorecer o RMP são de grande interesse econômico. Assim, hipotetizou-se que a suplementação do meio de cultivo de oócitos e/ou embriões com ácidos graxos específicos favorece a produção *in vitro* de embriões bovinos e modula a síntese de prostaglandina no embrião de forma a reduzir a síntese de PGF2 α , aumentar a síntese de PGE2 e aumentar a razão PGE2/PGF2 α , favorecendo o RMP.

1.2 Revisão de Literatura

1.2.1 Reconhecimento materno da prenhez (RMP) em fêmeas bovinas

O conceito durante o alongamento é nutrido exclusivamente pela secreção epitelial endometrial, condição que persiste até que ocorra o estabelecimento da placentação, sendo evidenciado que a adesão das células trofoblásticas ao útero não ocorrem antes dos 21 dias de prenhez. Anteriormente a esse processo, a nutrição e a

comunicação materno-embrionária se estabelecem por meio do ambiente uterino, que deve garantir o bom desenvolvimento inicial do embrião. A presença do conceito no início da prenhez induz a secreção de um conjunto de moléculas específicas por meio do epitélio uterino denominado de histotrofo e gera uma sinalização que promove modificações no ambiente uterino (Mccracken, 1984; Thatcher *et al.*, 2001). O histotrofo é caracterizado como a única fonte nutritiva para a proliferação das células trofoblásticas e alongação do conceito (Thatcher *et al.*, 2001; Inskeep; Dailey, 2005). O intenso desenvolvimento do conceito ocorre devido a elevada atividade secretora das células epiteliais do lúmen uterino e também da acentuada atividade pinocitótica do trofoblasto (Guillomot, 1995). Desse modo, quanto mais enriquecido o histotrofo, maiores são as possibilidades de alongamento e produção de IFN-t pelo conceito. Durante as etapas de pré e peri-implantação o suporte nutritivo ao embrião e conceito é realizado através do histotrofo uterino (Spencer *et al.*, 2006). Para o ambiente intra-uterino sustentar o conceito são necessárias ações dos esteróides ovarianos, controlada principalmente por P4 (Sreenan, 1978).

A MEP está entre as principais causas de falhas reprodutivas, responsável pela baixa taxa de prenhez nos rebanhos e aumento do intervalo entre partos (Hank, 1979; Humblot *et al.*, 2001), caracterizada pela perda da prenhez antes do 24º dia após a fecundação (Santos *et al.*, 2004). Entretanto, sabe-se que o período de maior desafio compreende os dias 15 a 19 após a fecundação, designado de “período crítico” (Binelli *et al.*, 2001).

O RMP é um processo fisiológico que consiste na competência do conceito sinalizar a sua presença no endométrio materno, impedir a luteólise funcional e estrutural do CL, e manter as concentrações de P4 elevadas para o estabelecimento da prenhez (Spencer; Bazer *et al.*, 2004). O sucesso da RMP depende da comunicação competente entre o conceito e o endométrio, onde o conceito deve produzir satisfatoriamente IFN-t para promover o bloqueio da síntese de PGF2 e aumentar a produção de PGE2, sendo a PGE2 de ação luteotrófica, fundamental para manter a liberação de P4 pelo CL (Sholl *et al.*, 1983).

As células epiteliais do endométrio, durante o período crítico possuem programação pré-estabelecida para induzir a liberação pulsátil de PGF2 α e para o sucesso do RMP é necessário que o conceito remeta sinais anti-luteolíticos para impedir a produção de PGF2 α (Binelli; Thatcher, 1999). Ao longo do ciclo estral, as fêmeas bovinas possuem a capacidade de secretar por meio das células endometriais

PGF2 α e PGE2 (Arosh *et al.*, 2016), sendo que na fase lútea dispõe de maior produção de PGE2, qual desempenha ações luteotróficas, anti-luteolíticas e função imunológica concedendo proteção do CL no RMP (Reynolds *et al.*, 2010).

Para executar o bloqueio da luteólise, é fundamental o alongamento do concepto para produzir quantidades crescentes de IFN-t, molécula responsável por sinalizar a presença do concepto no útero materno. O IFN-t é secretado por células mononucleares do trofoblasto, por volta do 7º dia até 22º dia do desenvolvimento embrionário inicial (Thatcher *et al.*, 2001; Bartol *et al.*, 1985; Geisert *et al.*, 1988). Além disso, dispõe de ação supressora sobre a expressão de receptores endometriais de ocitocina (Wathes *et al.*, 1998; Mann *et al.*, 1999), competindo pelos mesmos sítios de ligação, inibindo a síntese de PGF2 α pulsátil (Demmers *et al.*, 2001). O insucesso da ação do IFN-t sobre o bloqueio da liberação PGF2 α e posteriormente a luteólise, são fatores responsáveis em sua maioria, pela MEP, uma vez que influencia negativamente sobre a taxa de prenhez, gerando prejuízos econômicos a pecuária.

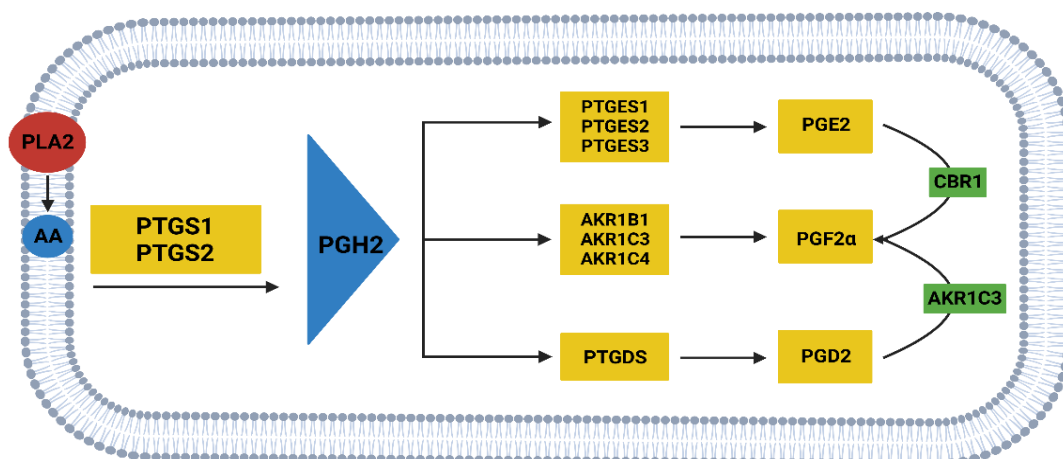
1.2.2 Biossíntese e secreção de prostaglandinas

As PGs estão envolvidas na regulação de processos reprodutivos das fêmeas como mediadores biológicos ativos atuando na ovulação, regressão do CL, implantação, manutenção da prenhez e parto (Karim; Hillier, 1979; Sales; Jabbour, 2003). Os eicosanóides são metabólitos oxigenados dos ácidos graxos essenciais compostos por PGs, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. A maior parte dos eicosanóides relevantes derivam do ácido araquidônico (AA) através de diferentes vias de síntese. O AA é um ácido graxo essencial presente na membrana celular e importante precursor das PGs.

Em fêmeas bovinas o aumento da razão de PGE2/PGF2 α favorece o desenvolvimento e a implantação embrionária (Parent *et al.*, 2002; Arosh *et al.*, 2004). A PGE2 além da ação luteotrófica e antiluteolítica, exerce função imunológica concedendo proteção do CL, condição determinante para RMP. No processo de RMP, o IFN-t secretado pelas células trofoblásticas do concepto de modo competente inibe a liberação pulsátil de PGF2 α e estimula o aumento da secreção de PGE2 (Ben-Ami *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2006; Weems *et al.*, 2007; Whates *et al.*, 2007; Arosh *et al.*, 2016). Hwang *et al.* (1988) constataram que além do endométrio, o embrião e o concepto também apresentam a capacidade de secretar PGs.

A biossíntese e a liberação de PGF2 α endometrial, quando exposta a um ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa (AGPI) é inibida (Cheng *et al.*, 2001). Para a formação de eicosanóides como as PGs é necessário a disponibilidade de um ácido graxo insaturado (AGI). A substituição do AA endógeno por ácido graxo exógeno determina um efeito inibidor competitivo para conversão do AA em prostanóides e todos metabólitos formados a partir de AA levam o sufixo “2”. Segundo descrito por Oliveira (2013) e ilustrado na Figura 1, no endométrio, a enzima fosfolipase citosólica A2 (PLA2) libera o AA da membrana fosfolipídica, assim, o AA livre no citosol é convertido através da ação da cicloxigenase 1 (PTGS1) ou cicloxigenase 2 (PTGS2). A prostaglandina H2 (PGH2) é a molécula precursora de todos os prostanóides. A PGH2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE2. A PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4) é convertida em PGF2 α , a PGD sintase (PTGDS) em PGD2; TXAs sintase (TBXAS2) em TXA2 ou PGI sintase (PTGIS) no produto PGI2. Depois de sintetizadas, a PGD2 pode ser convertida à PGF2 α pela ação da enzima AKR1C3, assim como a PGE2 que pode ser convertida à PGF2 α pela ação da enzima CBR1. Seguidamente, os prostanóides atravessam a membrana plasmática passivamente ou por transporte facilitado. Uma vez no exterior das células, os prostanóides se ligam aos seus receptores específicos: a PGE2 aos receptores PTGER-1, PTGER-2, PTGER-3, PTGER-4; a PGF2 α ao PTGFR; a PGD2 ao PTGDR; a PGI2 ao PTGIR e o tromboxano A2 ao TBXAR2. A PGE2 e PGF2 α possuem a capacidade de adentrar a célula alvo por transporte facilitado utilizando a proteína transportadora de membrana SLCO2A1 ou podem ser inativadas pela enzima PGDH. Contudo, como a PGF2 α e PGE2 são produzidas a partir de PGH2, as concentrações específicas destas PGs dependem da disponibilidade de PGH2 e da atividade específica de PGF e PGE isomerase e sintase (Moussavi *et al.*, 2013).

Figura 1 - Via de síntese, sinalização e metabolismo de eicosanóides no endométrio.



Fonte: Adaptado de Oliveira (2013).

A enzima fosfolipase A2 (PLA2) libera o ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica, esse pode ser convertido pela prostaglandina sintase 1 (PTGS1) ou sintase 2 (PTGS2) à PGH2, precursora de todos os prostanóides. A PGH2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE2. A PGH2 também pode ser convertida pelas PGF sintases (AKR1B1, AKR1C3 ou AKR1C4) em PGF2α. A PGH2 também pode ser convertida pela enzima PTGDS em PGD2. Depois de sintetizadas, a PGD2 pode ser convertida à PGF2α pela ação da enzima AKR1C3, assim como a PGE2 que pode ser convertida à PGF2α pela ação da enzima CBR1.

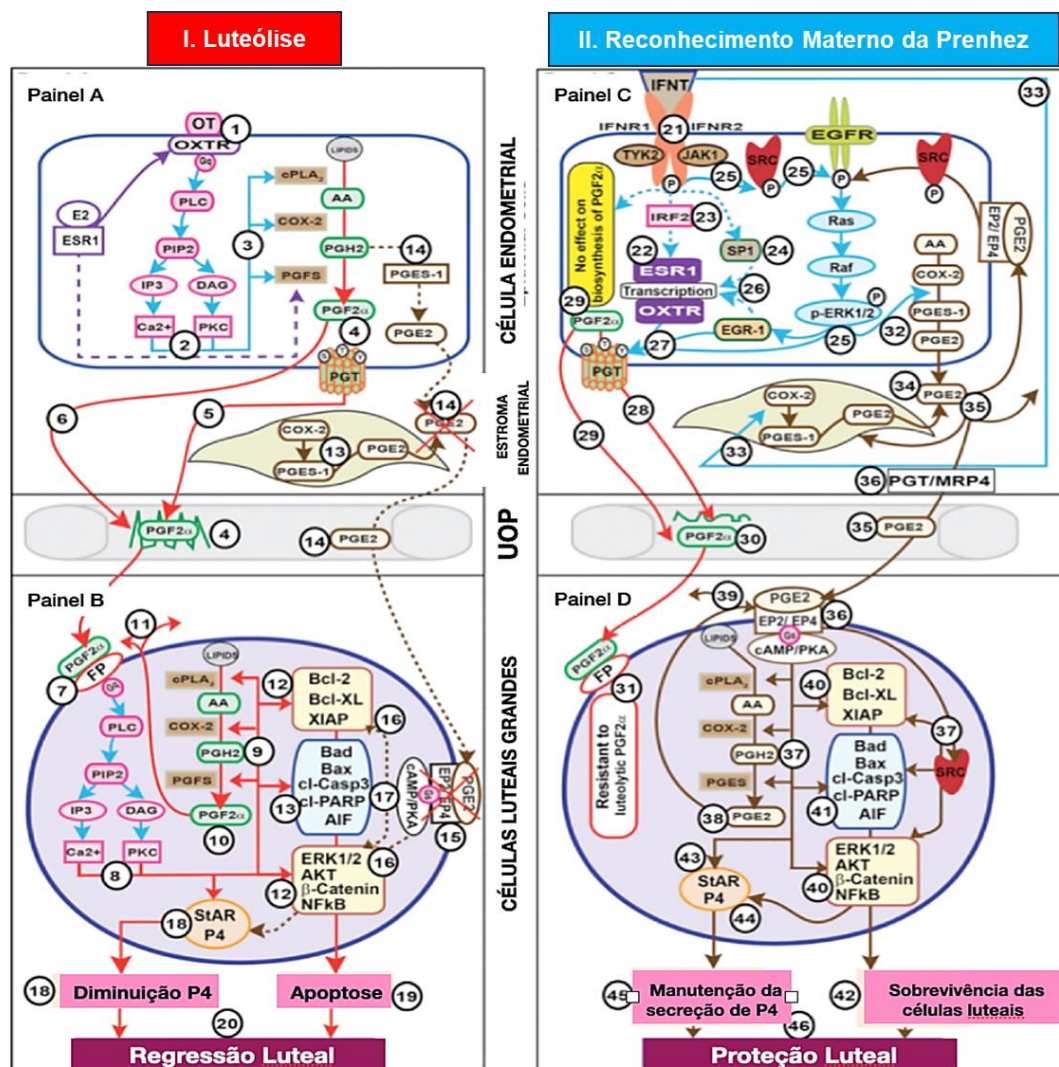
A síntese de PGF2α e PGE2 pode ser alterada, pelos ácidos graxos, por três mecanismos: A) com o aumento da disponibilidade de AA na membrana celular, a qual é a matéria prima para a síntese de ambas as PGs; B) alterando síntese das enzimas (PTGES1, PTGES2, PTGES3, AKR11B1, AKR1C3 E AKR1C4) que participam da síntese de PGF2α e PGE2 e C) alterando a enzima CBR1 que converte PGE2 em PGF2α.

O IFN- γ secretado pelas células trofoblásticas atua de forma parácrina, prevenindo a liberação pulsátil de PGF2α (Spencer *et al.*, 2004b). Suas ações no reconhecimento materno-fetal foram estabelecidas por Arosh *et al.* (2016) e Pate (2020). O IFN- γ se liga aos seus receptores (IFNR) nas células endometriais, ativando a sinalização JAK/STAT e formando ISGF3, que inibe a transcrição gênica do ER, impedindo a formação dos OXTRs. Isso evita que a ocitocina se ligue aos seus receptores, inibindo a síntese e os pulsos de PGF2α, essenciais para evitar a luteólise.

De acordo com Arosh *et al.* (2016) e Pate (2020), na ação endócrina representada na Figura 2, o IFN- γ produzido pelo conceito no lúmen uterino é direcionado para a veia uterina, onde pode seguir dois caminhos: A) se difundir na corrente sanguínea

estimulando uma expressão de genes específicos em células imunes, ou B) é transportada da veia uterina para as artérias ovarianas, ocorrendo no ovário um conjunto de ações no CL. No CL, o IFN- γ desempenha várias funções, incluindo A) o aumento da proliferação celular, B) estímulo à expressão de genes que aumentam a produção de P4, C) manutenção da sobrevivência das células endoteliais para manter a circulação sanguínea no CL e D) regulação positiva de proteínas que mediam a formação de novos vasos sanguíneos. Sendo assim, o IFN- γ age contra a luteólise funcional no CL, A) influenciando a diminuição da síntese de citocinas, B) evitando respostas imunes que resultariam na destruição do CL, C) reduzindo a expressão de proteínas relacionadas à apoptose para proteger o CL contra a morte celular, e D) promove controle celular e redução da expressão de RNAm em células endoteliais para prevenir o luteólise.

Figura 2 - Mecanismos envolvidos na regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (Painel A) e na manutenção estrutural e funcional do corpo lúteo, durante o reconhecimento materno da prenhez (Painel B).



Fonte: Arosh (2016).

(Painel A): 1) A ocitocina (OT) se liga em seu receptor (OXTR); 2) ocorre a liberação de Ca^{2+} no citosol que ativa proteína quinase C (PKC); 3) a maquinaria enzimática para a biossíntese de $PGF_{2\alpha}$ é ativada sequencialmente; 4) ocorre a produção de $PGF_{2\alpha}$ na célula endometrial e pulsos de $PGF_{2\alpha}$ são liberados pela célula endometrial; 5) a $PGF_{2\alpha}$, é transportada através de proteínas transportadoras (PGT) pelo plexo úteroovariano (UOP); 6) a $PGF_{2\alpha}$ também pode ser transportada, por um mecanismo independente de PGT ou por difusão simples, chegando ao corpo lúteo (CL) pelo UOP. **(Painel B):** 7) através dos pulsos a $PGF_{2\alpha}$ endometrial, a $PGF_{2\alpha}$ se liga ao seu receptor (FP) presente nas células luteais grandes; 8) a ligação $PGF_{2\alpha}$ -FP promove a liberação de Ca^{2+} no citosol que ativa PKC; 9) a maquinaria enzimática de biossíntese de $PGF_{2\alpha}$ no CL é ativada sequencialmente; 10) produção de $PGF_{2\alpha}$ pelas células luteais grandes; 11) por mecanismos autócrinos e parácrinos, ocorre uma auto amplificação da produção de $PGF_{2\alpha}$ nas células luteais grandes; 12) $PGF_{2\alpha}$ ligada à FP suprime as vias de sobrevivência do CL; 13) vias envolvidas no mecanismo de apoptose nas células luteais grandes são ativadas; 14) a produção de PGE_2 é suprimida no momento da luteólise; 15) a não ligação de PGE_2 , que teve a produção suprimida, no seu receptor específico promove nas células luteais grandes; 16) supressão da sobrevivência das células luteais grandes; 17) ativação das vias apoptóticas nas células luteais grandes; 18) ativação do FP e supressão do EP2/EP4 sinaliza um decréscimo na biossíntese e secreção de progesterona (P4); 19) indução da apoptose nas células luteais grandes; 20) regressão funcional e estrutural do CL, evento denominado de luteólise. **(Painel C):** 21) o interferon-tau (IFN- τ) se liga aos seus receptores específicos IFNR1 e IFNR2; 22) tal ligação suprime os receptores α de estrogênio (ESR-1) e os receptores de ocitocina (OXTR); 23) o Fator 2 regulador do IFN- τ (IRF-2) ou 24) proteínas específicas tipo 1 (SP1) sinalizam sequencialmente a cascata de IFNR e IRF2 ou SP1. Em paralelo, o IFN- τ ativa; 25) o complexo IFNR-JAK-SRCEGFR-RAS-RAF-ERK1/2-EGR1; 26) o aumento

da resposta da proteína 1 (EGR1), faz com que esta possa competir ou substituir a ligação com SP1 e suprimir OXTR (este mecanismo ainda não foi confirmado); 27) ERK1/2 e EGR1 inibe a função de PGT; 28) com a supressão de PGT o transporte de PGF2 α do endométrio para o CL, através do UOP, não ocorre; 29) interessantemente o IFN-t não inibe a produção basal de PGF2 α endometrial, e a PGF2 α pode ser transportada por um mecanismo independente de PGT ou por difusão simples do endométrio para o UOP; 30) a concentração basal de PGF2 α nesse momento é registrada no UOP; 31) esta PGF2 α atua liga-se aos seus receptores (FP) nas células luteais grandes do CL no início da prenhez torando estas células resistentes a ação luteolítica da PGF2 α ; 32) as células epiteliais do endométrio e; 33) células do estroma endometrial através de múltiplos mecanismos; 34) aumentam a produção de PGE2 endometrial; 35) através da sinalização autócrina e parácrina a PGE2 liga-se em EP2/EP4 determinando uma auto amplificação na produção de PGE2; 36) a PGE2 é transportada do endométrio para o CL através do UOP por via PGT ou por mecanismos mediados pela MRP4. **(Painel D):** 37) a PGE2 se liga no EP2/EP4 das células luteais grandes, ativa cAMP/PKA e via SRC via que se auto amplifica; 38) produção de PGE2 intra luteal; 39) sinalização EP2/EP4 por ação parácrina e autócrina promove; 40) sobrevivência ou anti apoptose do CL; 41) supressão das vias pró apoptóticas protegendo o CL da luteólise funcional; 42) a PGE2 através do cAMP/protein kinase A (PKA); 43) via SRC-ERK1/2 ou SRC-AKT reconduzem; 44) a produção de progesterona na células luteais protegendo o CL da luteólise funcional; 45) coletivamente o IFN-t ou a PGE2 produzida pelo endométrio e CL promove a resistência do CL em relação à PGF2 α através de múltiplos mecanismos intracelulares que protegerão o CL da regressão durante o reconhecimento materno da prenhez.

Sendo assim, o IFN-t desfavorece a luteólise estrutural e aumenta a proliferação celular, também diminui a abundância de RNAm nas células endoteliais prevenindo a luteólise funcional. Um influxo existente de neutrófilos no CL durante o RMP, faz com que o IFN-t altere a funcionalidade das células imunes, desfavorecendo a luteólise funcional e estrutural e os mecanismos de ação da PGE2 que incluem: A) diminuição da sensibilidade do CL à ação da PGF2 α e B) estímulo ao aumento da produção de P4 nas células luteais.

1.2.3 Síntese de prostaglandina pelo embrião

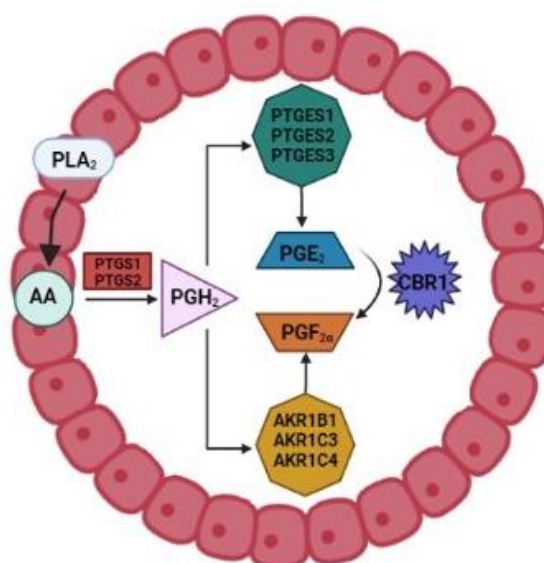
O embrião bovino a partir do dia 13 de desenvolvimento também secreta prostaglandinas, como a PGE2 e a prostaglandina I2 (PGI2) que atuam de forma parácrina no endométrio, regulando a expressão de genes e funções importantes para a receptividade uterina, crescimento e desenvolvimento do concepto durante a fase inicial da prenhez. A PGE2 e PGI2 também desempenham ações luteotróficas importantes no CL, favorecendo a secreção de P4 (Lewis, 1989; Arosh *et al.*, 2016; Pate, 2020).

Segundo Giller *et al.* (2018), após a ação da PTGS2, enzima chave da síntese de PG, ocorre liberação do AA na membrana celular para o citosol, se convertendo em PGH2, precursor comum para PGF2 α , PGE2, PGD2, PGI2 e TXA2 (Figura 3). Para tanto, a síntese de PG pelo embrião, faz com que a concentração de PG luminal uterina é maior durante a prenhez do que durante o ciclo estral (Lewis, 1983). De acordo com Hwang *et al.* (1988), após a avaliação do metabolismo do AA pelo embrião em diferentes fases da prenhez, mostrou que o embrião bovino sintetiza de forma

predominante PGF₂ α antes do dia 12, e a PGE₂ e PGF₂ α entre os dias 13 e 15 e a PGI₂ no dia 15 do desenvolvimento. Desse modo, a síntese de PGF₂ α e PGE₂ no tecido endometrial e células endometriais foi muito bem esclarecida e compreendida. No entanto, a síntese de PGF₂ α e PGE₂ em embriões e conceptos é pouco estudada e compreendida, sendo reconhecido que o uso de diferentes ácidos graxos pode alterar a proporção de PGF₂ α e PGE₂ produzidas nas células trofoblásticas, embriões e conceptos (Whates *et al.*, 2007).

Portanto, a inibição na síntese de PGF₂ α , maior resistência do CL às ações luteolíticas da PGF₂ α e um conjunto de ações luteotróficas desencadeadas pelo IFN- γ e PGE₂, favorecem o RMP. Diante desse contexto, ampliar o entendimento dos mecanismos de biossíntese e secreção de PGF₂ α e PGE₂ pelas células trofoblásticas e embriões bovinos tornam-se de grande interesse para o aumento do RMP.

Figura 3 - Representação esquemática ilustrando a síntese de prostaglandinas no embrião.



Fonte: Lourenço (2022).

A enzima fosfolipase A2 (PLA2) cliva o ácido araquidônico (AA) presente na membrana plasmática, sendo o AA convertido em PGH₂ pelas enzimas PTGS1 e PTGS2; a PGH₂ pode ser convertida em PGE₂ pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3); a PGH₂ pode ser convertida em PGF₂ α pelas enzimas PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4) e a PGE₂ pode ser transformada em PGF₂ α pela ação da enzima CBR1.

1.2.4 Ação dos ácidos graxos insaturados na síntese de prostaglandinas

Os lipídios são sintetizados continuamente pelas células do organismo animal, de modo que a membrana celular passa por remodelação da composição lipídica e incorpora ácidos graxos sendo importante fonte de variabilidade lipídica (Harayama; Riezman, 2018). Os AGI podem ser classificados em monoinsaturados (MUFA) com a existência de apenas uma dupla ligação em sua cadeia carbônica ou AGPI, constituído por múltiplas duplas ligações. A suplementação lipídica em tecidos reprodutivos com AGPI é capaz de aprimorar o desenvolvimento oocitário (Fayezi *et al.*, 2018), desenvolvimento e a qualidade do embrião (Fouladi-Nashta *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 1992; Thangavelu *et al.*, 2007), além de promover melhoria sobre a eficiência da PIVE e modular a biossíntese de eicosanóides, dentre eles a $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 (Maldonado *et al.*, 2023; Mattos *et al.*, 2003; Meier *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2003).

A redução da disponibilidade de AA na membrana celular endometrial para promover a síntese de PG série 2, ocorre pela inibição de PGs por AGPI que viabilizam a substituição do AA endógeno por ácidos graxos exógenos (Lands, 1992; Wathes *et al.*, 2007). Foi evidenciado que AGPI da família ômega-3 (ω -3), como ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) inibem a biossíntese e a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ endometrial, assim como o ácido linoleico (AL) e isômeros de CLA da família ômega 6 (ω -6), estabelecem modulações na biossíntese dos eicosanóides e PGs. No entanto, o efeito exercido pelo AL sobre a biossíntese endometrial é pouco compreendido (Whates *et al.*, 2007). O EPA e DHA detêm a capacidade de inibir a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ em diversos sistemas de cultivos de células, compreendendo as células endometriais bovinas, em que a inibição da secreção de $\text{PGF2}\alpha$ pode impossibilitar a regressão do CL e elevar as taxas de fertilidade (Levine; Worth, 1984; Achard *et al.*, 1997; Mattos *et al.*, 2001; Burke *et al.*, 1997; Staples *et al.*, 1998; Mattos *et al.*, 2000). Mattos *et al.* (2003), observaram que a inibição da síntese de $\text{PGF2}\alpha$ em células endometriais bovinas (BEND) por EPA foi dependente de dose, onde a dose de 10 a 20 μM inibiu a liberação de $\text{PGF2}\alpha$ quando incubadas por 24 horas. Os efeitos dos AGPI na liberação de PG endometriais foram amplamente pesquisados nos últimos anos, porém pouco se sabe sobre como a síntese de PG embrionárias é afetada por tais ácidos graxos. Meier *et al.* (2009), em um estudo incubou o tecido trofoblástico com uma concentração 10 μM de EPA, DHA ou ácido linoleico (AL). Após a cultura por 5 horas a 37°C não apresentou alteração

na síntese de PGF2 α e PGE2 no endométrio de fêmeas prenhes e não prenhes no D16 e D17 e como também não alterou a síntese nas células trofoblásticas. Ainda assim, houve tendência na redução da liberação de PGE2 em cultivo com EPA e DHA, não sendo interessante esse efeito. Os autores relatam que o AL possivelmente não tenha promovido redução na síntese de PGs por consequência do curto período de tratamento que os tecidos foram submetidos.

Segundo Scenna *et al.* (2004) no início da prenhez o aumento na biossíntese de PGF2 α deprimiu o desenvolvimento e a sobrevivência embrionária. Enquanto o aumento de PGE2, favoreceu o aumento da taxa de clivagem e o desenvolvimento dos embriões, exercendo ação protetiva sobre o estresse oxidativo (Gurevich *et al.*, 1993; Wentzel *et al.*, 1999), sendo desfavorável a diminuição da PGE2 no período pré-implantação. Oócitos submetidos ao estresse térmico por calor, ocasiona o aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) provocando efeitos negativos na produção de embriões (Nabenishi *et al.*, 2021), do mesmo modo, o cultivo de embriões bovinos sob estresse oxidativo manifestam altos níveis de metilação (Li *et al.*, 2016). A inclusão de CLA na maturação *in vitro* (MIV) foi benéfico para o desenvolvimento oocitário sobre a taxa de blastocistos expostos ao estresse pelo calor. Dessa maneira, o CLA exerce a ação de eliminar radicais livres, provocando a diminuição de ROS (Basiricò *et al.*, 2015; Lapa *et al.*, 2011; Abazarikia *et al.*, 2021).

O CLA desempenha o papel de regulador metabólico, utilizado para promover a melhoria na qualidade dos embriões, assim como, induzir a inserção do AL e a produção de triacilgliceróis e fosfolípidios para melhorar o perfil lipídico da membrana citoplasmática e celular (Tominaga *et al.*, 2000). O AL possui características antioxidantes, logo, a suplementação do CLA e AL em meio de cultivo como reguladores metabólicos propicia melhor qualidade do embrião (Carro *et al.*, 2013). O AO é um MUFA pertencente à família ômega 9 (ω -9), sendo o principal ácido graxo insaturado presente nos oócitos (Matorras *et al.*, 1998), com a capacidade de neutralizar efeitos negativos provocado pelos ácidos graxos saturados no desenvolvimento oocitário sobre a pré-implantação embrionária (Fayezi *et al.*, 2018).

O AO detém funções importantes que determinam a fluidez da membrana plasmática, a interação entre células, transporte de membrana, sinalização, termorregulação corporal, produção de hormônios sexuais, aumento da absorção de vitamina A, D, E e K e a fonte de funções metabólicas e estruturais (Funari *et al.*, 2003; Warzych; 2017). Apesar disso, segundo Leroy *et al.* (2005) o AO é abundante no fluido

folicular de fêmeas bovinas no pós-parto em conjunto com o ácido palmítico e esteárico, sendo que os últimos, desfrutam de efeitos adversos que são atenuados pela ação do AO em oócitos (Aardema *et al.*, 2011).

Desse modo, os efeitos dos ácidos graxos em oócitos e/ou embriões de acordo com alguns autores, foram sumarizados nas Tabela 1.

Tabela 1 - Sumarização dos efeitos de ácidos graxos em oócitos e/ou embriões segundo a espécie, principais efeitos observados e referência bibliográfica.

ESPÉCIE	ESTRUTURA SUPLEMENTADA	ÁCIDO GRAXO	PRINCIPAIS EFEITOS OBSERVADOS	REFERÊNCIA
Bovino	Oócito e embrião	Ácido linoleico conjugado (CLA)	CLA t10, c12 durante a maturação interferiu no metabolismo lipídico melhorando a competência dos oócitos bovinos para se desenvolverem em embriões de melhor qualidade.	Lapa <i>et al.</i> (2011)
Suíno	Oócito	Ácido linoleico conjugado (CLA)	Suplementação aumentou o nível de GSH e diminuiu o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos maturados, resultando em uma melhor competência de desenvolvimento.	Jia <i>et al.</i> (2014)
Bovino	Embrião	Ácido linoleico conjugado (CLA)	Suplementação de CLA no desenvolvimento e desempenho embrionário bovino foram prejudiciais, especialmente com o isômero t10, c12 e com períodos mais longos em cultura. Quando testados durante procedimentos de criopreservação, os embriões suplementados com 100 µM c9, t11 por 36 horas antes da vitrificação mostraram as maiores taxas de sobrevivência e as maiores contagens de células de blastômeros após o reaquecimento.	Absalón-Medina <i>et al.</i> (2014)

Bovino	Oócito	Ácido linoleico conjugado (CLA)	CLA t10, c12 melhorou o efeito indesejável do estresse térmico na maturação e no desenvolvimento embrionário. Estes efeitos são provavelmente mediados pela melhoria do efeito do CLA no potencial antioxidante dos oócitos, que está associado a níveis mais baixos de ERO e a um maior teor de glutatona intracelular.	Abazarikia <i>et al.</i> (2020)
Bovino	Oócito	Ácido oleico (AO) Ácido linoléico (AL)	Oócito rodeado por células do cumulus, possui a capacidade de incorporar rapidamente ácido graxo do meio de maturação <i>in vitro</i> .	Aardema <i>et al.</i> (2011); Carro <i>et al.</i> (2013)
Bovino	Oócito	Ácido oleico (AO)	Apoio parácrino e neutralização do efeito prejudicial dos ácidos graxos saturados no desenvolvimento de oócitos.	McKeegan; Sturmey, (2011); Dunning, (2014)
Bovino	Embrião	Ácido oleico (AO)	Possui capacidade de compensar o efeito adverso do ácido esteárico durante o desenvolvimento embrionário, quando as concentrações de AO são iguais ou superiores às do ácido esteárico. Ácido esteárico 50 µM e ácido oleico 25 µM.	Nieuwland <i>et al.</i> (2023)
Bovino	Oócito	Ácido linoleico (AL)	Suplementação no meio de cultura reduziu significativamente a porcentagem de COCs exibindo expansão completa das células do cumulus, os oócitos atingiram o estágio de metáfase II e reduziram a taxa de blastocistos.	Khalil <i>et al.</i> (2013)

Bovino	Oócito	Ácido docosahexaenóico (DHA)	1 μ M de DHA induziu aumento significativo na taxa de clivagem de oócitos. 100 μ M de DHA induziu diminuição significativa nos oócitos clivados.	Oseikria <i>et al.</i> (2016)
Bovino	Oócito e embrião	Ácido docosahexaenóico (DHA)	Suplementação no meio de cultura (1–20 μ M) aumenta a proliferação e esteroidogênese das células da granulosa e aumenta a qualidade dos oócitos <i>in vitro</i> e a taxa de blastocistos no D7.	Maillard <i>et al.</i> (2018); Oseikria <i>et al.</i> (2016)
Bovino	Oócito	Ácido eicosapentaenóico (EPA)	Diminuiu a taxa de maturação nuclear na dose de 100 nM, diminuindo os oócitos em MII e aumentando as frequências dos oócitos MI. Diminuiu o conteúdo lipídico do oócito e afetou o padrão de gotículas lipídicas.	Nikoloff <i>et al.</i> (2020)

Fonte: Elaborado pela autora.

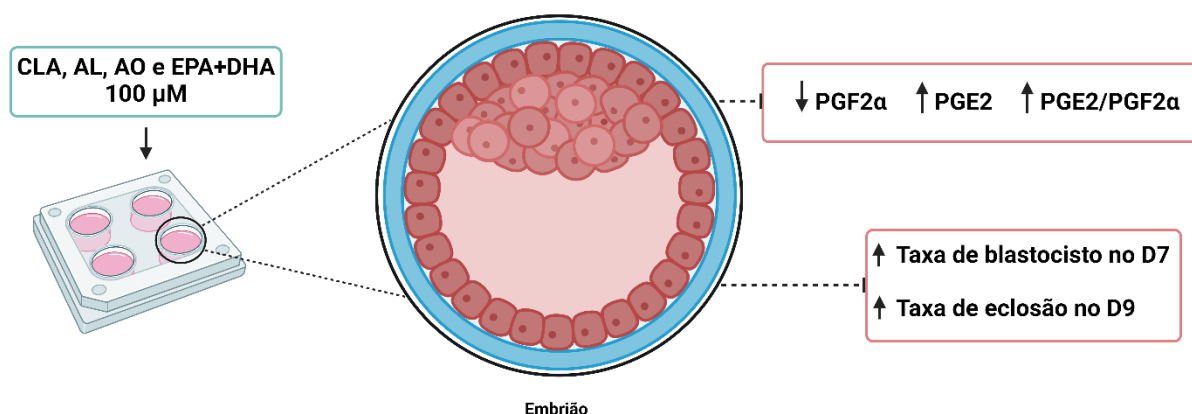
Sabe-se que oócitos e embriões possuem a capacidade de incorporar e metabolizar ácidos graxos quando inseridos ao meio de cultivo e esses manifestam capacidade para fomentar a qualidade dos oócitos e embriões produzidos *in vitro*. Os AGPI foram investigados em modelos *in vivo* e *in vitro*, mas pouco foi esclarecido sobre seus mecanismos de ação. Portanto, é de grande interesse ampliar as investigações acerca dos mecanismos que a suplementação com CLA, AL, AO e EPA + DHA exercem na qualidade dos embriões produzidos *in vitro* e seus efeitos na síntese de PGE2 e PGF2 α , assim como na relação PGE2/PGF2 α sobre a competência dos embriões em estabelecerem a prenhez.

1.3 Hipótese

1.3.1 Estudo 1

A hipótese é que a suplementação com CLA, AL, AO ou EPA + DHA, durante o cultivo *in vitro* de embriões (CIV), reduz a síntese de PGF2 α , aumenta a síntese de PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α , e determina aumento da taxa de blastocistos produzidos no dia 7 e maior taxa de eclosão no dia 9 após a fertilização *in vitro*.

Figura 4 - Modelo hipotético do estudo 1.



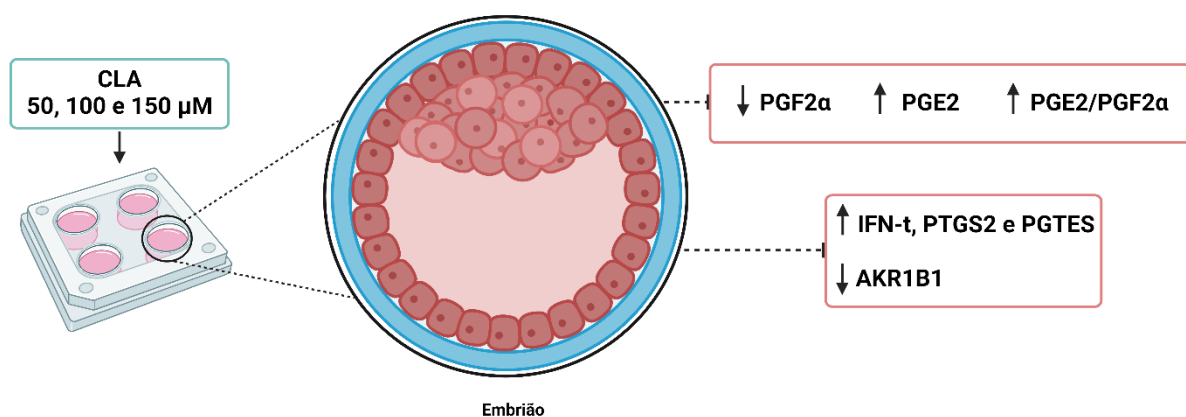
Fonte: Elaborado pela autora.

A suplementação com 100 µM CLA, AL, AO e EPA + DHA no meio de cultura de embriões bovinos diminui a síntese de PGF2 α , aumenta a síntese de PGE2 e aumenta a razão PGE2/ PGF2 α e aumenta a taxa de blastocistos produzidos no D7 e maior taxa de eclosão no D9.

1.3.2 Estudo 2

A hipótese é que a suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA) nos meios de cultura, durante a maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV) ou somente no CIV, reduz a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e aumenta síntese de PGE2 e a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$, por alterar a expressão de transcritos envolvidos na síntese das PGs (PTGS2, PTGES e AKR1B1) e IFN-t ; e também determina aumento da taxa de blastocistos produzidos nos dias 7 e 9 após a fertilização *in vitro*, sendo tal efeito dose-dependente.

Figura 5 - Modelo hipotético do estudo 2.



Fonte: Elaborado pela autora.

A suplementação com 50, 100 e 150 µM de CLA no meio de cultura de embriões bovinos diminui a síntese de $\text{PGF2}\alpha$, aumenta a síntese de PGE2 e aumenta a relação $\text{PGE2/PGF2}\alpha$, aumenta a produção embrionária com 7 e 9 dias de cultivo, e em embriões cultivados por 9 dias aumenta os transcritos envolvidos na síntese de PGE2 (PTGS2, PTGES) e diminui os transcritos envolvidos na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ (AKR1B1), aumenta o transcrito envolvido no reconhecimento materno da prenhez (IFN-t).

1.4 OBJETIVO

1.4.1 Estudo 1

Objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 100 µM de CLA, 100 µM de AL, 100 µM de AO ou 50 µM de EPA + 50 µM de DHA, no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (CIV), sobre a taxa de blastocistos produzidos no D7

e taxa de eclosão no D9, assim como na síntese de $\text{PGF2}\alpha$, PGE2 e a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$ no meio de cultivo no D9.

1.4.2 Estudo 2

Objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 50 μM , 100 μM e 150 μM de CLA, durante a MIV e CIV ou somente no CIV, na taxa de produção de blastocisto no D7 e taxa de eclosão no D9, na síntese de PGE2 e $\text{PGF2}\alpha$ e na expressão de transcritos PTGS2 , AKR1B1 , PTGES e IFN-t em blastocistos no D9, por RT-qPCR.

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; VOS, P. L. A. M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A. J.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biol. Reprod.**, [s.l.], v. 85, p. 62–9, 2011.
- ABAZARIKIA, A. H.; ZHANDI, M.; SHAKERI, M.; TOWHIDI, A.; YOUSEFI, A. R. In vitro supplementation of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid ameliorated deleterious effect of heat stress on bovine oocyte developmental competence. **Theriogenology**, [s. l.], v. 142, p. 296–302, 2020.
- ABAZARIKIA, A.; ZHANDI, M.; TOWHIDI, A.; SHAKERI, M.; YOUSEFI, AR; ALIYAN, A. Conjugated linoleic acid improves meiotic spindle morphology and developmental competence of heat-stressed bovine oocyte. **Theriogenology**, [s. l.], v. 172, p. 67-72, 2021.
- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Exportações brasileiras de carne bovina. [S.l.]: ABIEC, 2022.
- ABSALÓN-MEDINA, V. A.; BEDFORD-GUAUS, S. J.; GILBERT, R. O.; SIQUEIRA, L. C.; ESPOSITO, G.; SCHNEIDER, A.; CHEONG, S. H.; BUTLER, W. R. The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 on *in vitro* bovine embryo production and cryopreservation. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 97, n. 10, p. 6164–6176, 2014.
- ACHARD, F.; GILBERT, M.; BÉNISTANT, C.; SLAMA, S. B.; DEWITT, D. L.; SMITH, W. L.; LAGARDE, M. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids reduce PGH synthase 1 expression in bovine aortic endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, n.2, p. 513-518, 1997.
- ANUALPEC - ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA. 20. ed. [s. l.]: Instituto FNP, 2023. v. 1.
- AROSH, J. A.; BANU, S. K.; KIMMINS, S.; CHAPDELAINE, P.; MACLAREN, L. A.; FORTIER, M. A. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. **Endocrinology**, [s.l.], v. 145, 5280e93, 2004.
- AROSH, J. A.; BANU, S. K.; MCCRACKEN, J. A. Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. **J Dairy Sci.**, [s.l.], v. 99, p. 5926-5940, 2016.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Index ASBIA mercado**, 2022. Disponível em https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index_ASBIA_2022.pdf. Acesso em: 29 jan. 2024.

BARTOL, F. F.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W.; THATCHER, W. W. Characterization of proteins produced *in vitro* by bovine endometrial explants. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 33, p. 745-759, 1985.

BARUSELLI, P.S. **Boletim eletrônico – VRA**. 8. ed. [S.l.]: USP/FMVZ, 2014. Disponível em: [http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico vra/](http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/). Acesso em: 14 mar. 2024.

BARUSELLI, P. S.; CATUSSI, B. L. C.; ABREU, L. Â.; ELLIFF, F. M.; SILVA, L. DA G. DA; BATISTA, E. S.; CREPALDI, G. A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 43, n. 2, p. 308-314, 2019.

BASIRICÒ, L.; MORERA, P.; DIPASQUALE, D.; TRÖSCHER, A.; SERRA, A.; MELE, M. Conjugated linoleic acid isomers strongly improve the redox status of bovine mammary epithelial cells (BME-UV1). **J. Dairy Sci.**, [s. l.], v. 98, p. 7071-82, 2015.

BEN-AMI, I.; FREIMANN, S.; ARMON, L.; DANTES, A.; STRASSBURGER, D.; FRIEDLER, S.; RAZIEL, A.; SEGER, R.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. **Molecular human reproduction**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 593-599, 2006.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W. Conceptus stimulated signal transduction pathway in the endometrium to maintain pregnancy. **Annual Review of Biomedical Sciences**, [s. l.], v. 1, p. 59- 85, 1999.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 56, p. 1451-1463, 2001.

BURKE, J. M.; STAPLES, C. R.; RISCO, C. A.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Effect of ruminant grade menhaden fish meal on reproductive and productive performance of lactating dairy cows. **Journal Dairy Sci.**, [s. l.], v. 80, p. 3386–3398, 1997.

CARRO, M.; BUSCHIAZZO, J.; RIOS, G. L.; ORESTI, G. M.; ALBERIO, R. H. Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. **Theriogenology**, [s. l.], v. 79, p. 687-694, 2013.

CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Contribuição do agronegócio ao PIB**. 2022. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br>. Acesso em: 27 jul. 2024.

CHENG, Z.; ELMES, M.; ABAYASEKARA, D. R. E.; WATHES, D. C. Effects of conjugated linoleic acid on prostaglandins produced by cells isolated from maternal intercotyledonary endometrium, fetal allantochorion and amnion in late pregnant ewes. **Biochim Biophys Acta**, [s.l.], v. 1633, p. 170–178, 2003.

- CHENG, Z.; ROBINSON, R. S.; PUSHPAKUMARA, P. G. A. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 171, p. 463-473, 2001.
- DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, [s. l.], v. 121, p. 41-49, 2001.
- DUNNING, K. R. Paracrine support and the neutralization of detrimental effects of saturated fatty acids on oocyte development. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 90-98, 2014.
- EALY, A. D.; YANG Q. E. Control of Interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. **American Journal of Reproductive Immunology**, [s. l.], v. 61, p. 95-106, 2009.
- FAPRI - FOOD AND AGRICULTURAL POLICY RESEARCH INSTITUTE. **W. A. O. Database**. Ames: Ed. Iowa State University; Columbia: University of Missouri-Columbia, 2023.
- FAYEZI, S.; LEROY, J. L.; NOVIN, M. G.; DARABI, M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development. **Zygote**, [s. l.], p. 1-13, 2018.
- FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biol. Reprod.**, [s. l.], v. 77, p. 9-17, 2007.
- FUNARI, S. S.; BARCELO, F.; ESCRIBA, P. V. Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes. **J. Lipid Res.**, [s. l.], v. 44, p. 567-75, 2003.
- GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; BIGGERS, B. G. Effect of heat stress on conceptus and uterine secretion in the bovine. **Theriogenology**, [s. l.], v. 10, p. 82-75, 1988.
- GILLER, K.; DREWS, B.; BERARD, J.; KIENBERGER, H.; SCHMICKE, M.; FRANK, J.; SPANIER, B.; DANIEL, H.; GEISSLINGER, G.; ULBRICH, S. E. Bovine embryo elongation is altered due to maternal fatty acid supplementation. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 600-610, 2018. DOI 10.1093/biolre/ioy084
- GRUNERT, E.; BIRGE, H. E.; VALE G. W. **Patologia clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia**. São Paulo: Varela, 2005.
- GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, [s. l.], v. 49, p. 39-51, 1995.
- GUREVICH, M.; HAREL-MARKOWITZ, E.; MARCUS, S.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M. Prostaglandin production by the oocyte *cumulus* complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the

development of the early bovine embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, [s.l.], v. 5, p. 281-283, 1993.

HANK, H. W. Infertility in dairy cattle. **Animal Reproduction**, [s.l.], v. 3, p. 19-29, 1979.

HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Compreender a diversidade da composição lipídica da membrana. **Nature revisa Biologia Celular Molecular**, [s.l.], v. 19, n. 5, p. 281-296, 2018.

HUMBLLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, [s.l.], v. 56, n. 9, p. 1413-1433, 2001.

HWANG, D. H.; POOL, S. H.; RORIE, R. W.; BOUDREAU, M.; GODKE, R. A. Transitional changing in arachidonic acid metabolism by bovine embryos at different developmental stages. **Prostaglandins**, [s.l.], v. 35, p. 387-402, 1988.

INSKEEP E. K.; DAILEY, R. A. Embryonic death in cattle. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, [s.l.], v. 21, p. 437-461, 2005.

JIA, B.; WU, G.; FU, X.; MO, X.; DU, M.; HOU, Y.; ZHU, S. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid enhances in vitro maturation of porcine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, [s.l.], v. 81, p. 20-30, 2014.

KARIM, S. M.; HILLIER, K. **Prostaglandins in the control of animal and human reproduction**. [S.l.]: Br Med Bull, 1979.

KHALIL, W. A.; MAREI, W. F. A.; KHALID, M. Protective effects of antioxidants on linoleic acid-treated bovine oocytes during maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 161–168, 2013.

LANDS, W. E. M. Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. **FASEB Journal**, [s.l.], v. 6, p. 2530-2536, 1992.

LAPA, M.; MARQUES, C. C.; ALVES, S. P.; VASQUES, M. I.; BAPTISTA, M. C.; CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A. E. M.; BESSA, R. J. P.; PEREIRA, R. M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on Bovine Oocyte Competence and Fatty Acid Composition. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 904–910, 2011.

LEROY, J. L.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, [s.l.], v. 130, p. 485-495, 2005.

LEVINE, L.; WORTH, N. Eicosapentaenoic acid: its effects on arachidonic acid metabolism by cells in culture. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s.l.], v. 74, n. 3, p. 430-436, 1984.

LEWIS, G. S. Prostaglandin secretion by the blastocyst. **J. Repro. Fertil.**, [s.l.], (Suppl.), v. 37, p. 261-267, 1989.

LEWIS, G. S.; WATERMAN, R. A. Effects of endometrium on metabolism arachidonic acid by bovine blastocysts. **Prostaglandins**, [s.l.], v. 25, p. 881–889, 1983.

LEWIS, G. S.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C. Prostaglandin F2 α Upregulates Uterine Immune Defenses in the Presence of the Immunosuppressive Steroid Progesterone. **American Journal of Reproductive Immunology**, [s.l.], v. 56, n. 2, p. 102–111, 2006.

LI, X.; ZHANG, Y.; WANG, J. Bovine embryos cultured under oxidative stress exhibit high levels of methylation. **Journal of Animal Science**, [s.l.], v. 94, n. 2, p. 345-356, 2016.

LOURENÇO, V. C. **Efeitos da suplementação com ácido oleico e linoleico conjugado na secreção de prostaglandina E2 e F2 α em células trofoblásticas bovinas**. 2022. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Dracena, 2022.

MAILLARD, V.; DESMARCHAIS, A.; DURCIN, M.; UZBEKOVA, S.; ELIS, S. Docosahexaenoic acid (DHA) effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 1–18, 2018.

MALDONADO, M. B. C.; LOURENCO, V. C.; BEZERRA, L. O.; FELTRIN, I. R.; MENDES, A. F.; ROCHA, C. C.; PUGLIESI, G.; EALY, A.; MEMBRIVE, C. M. B.; NOGUEIRA, M. F. G. Conjugated linoleic acid supplementation changes prostaglandin concentration ratio and alters the expression of genes involved in maternal-fetal recognition from bovine trophoblast cells *in vitro*. **Theriogenology**, [s.l.], p. 87-95, 2023.

MANN, G. E.; ROBISON, R. S.; WHATES, D. C. The regulation of interferon - τ . Production and uterine receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, [s.l.], v. 54, p. 317-328. 1999.

MATORRAS, R.; RUIZ, J.; MENDOZA, R.; RUIZ, N.; SANJURJO, P.; RODRIGUEZ-ESCUADERO, F. J. Composição de ácidos graxos de oócitos humanos com falha na fertilização. **Reprodução Humana**, v. 13, n. 8, p. 2227–2230, ago. 1998.

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v. 69, p. 780-787, 2003.

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; THATCHER, W.W. Effect of polyunsaturated fatty acids on secretion of PGF2 α from bovine endometrial (BEND) cells stimulated with phorbol 12, 13 dibutyrate (PDBu). **Theriogenology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 326, 2001.

MATTOS, R.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of reproduction**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 38-45, 2000.

MCCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; EINER-JENSEN, N. The structure of steroids and their diffusion through blood vessel walls in a counter-current system. **Steroids**, [s.l.], v. 43, n. 3, p. 293-303, 1984.

MCKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. Paracrine support and the neutralization of detrimental effects of saturated fatty acids on oocyte development. **Reproduction**, [s.l.], v. 142, n. 6, p. 731-741, 2011.

MEIER, S.; LEDGARD, A. M.; SATO, T. A.; PETERSON, A. J.; MITCHELL, M. D. Polyunsaturated fatty acids differentially alter PGF2 α and PGE2 release from bovine trophoblast and endometrial tissues during short-term culture. **Animal Reproduction Sciences**, [s.l.], v. 111, p. 353-360, 2009.

MOUSSAVI, A. H.; BUTLER, W. R.; BAUMAN, D. E.; GILBERT, R. O. Effects of conjugated linoleic acids on prostaglandin secretion by bovine endometrial epithelial cells *in vitro*. **Am. J. Vet. Res.**, [s.l.], v. 74, p. 491-498, 2013.

NABENISHI, H.; NEGISHI, N.; YAMAZAKI, A. Predicting the start of calving in Japanese Black cattle using camera image analysis. **The Journal of reproduction and development**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 53–58, 2021.

NIEUWLAND, K.; GADELLA, B. M.; VOS, P. L. A. M.; OEI, C. H. Y.; AARDEMA, H. Oleic acid dose-dependently compensates for the negative effect of stearic acid on early bovine embryos. **Animal - Science Proceedings**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 480, 2023.

NIKOLOFF, N.; CAMPAGNA, A.; LUCHETTI, C.; CARRANZA-MARTÍN, A. C.; PASCUA, A. M.; ANCHORDOQUY, J. M.; ANCHORDOQUY, J. P.; LOMBARDO, D. M.; SEOANE, A.; FURNUS, C. C. Effects of EPA on bovine oocytes matured *in vitro* with antioxidants: Impact on the lipid content of oocytes and early embryo development. **Theriogenology**, [s.l.], v. 146, p. 152–161, 2020.

NOGUEIRA, E.; MINGOTI, G. Z.; NICACIO, A. C. Biotécnicas reprodutivas para aceleração do melhoramento genético. **Melhoramento genético aplicado em gado de corte: programa Geneplus-Embrapa**. Brasília, DF: [s.n.], 2013. p. 195–211.

OLIVEIRA, M. L. **Efeito do ambiente periovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos: biossíntese e sinalização de eicosanóides**. 2013. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

OSEIKRIA, M.; ELIS, S.; MAILLARD, V.; CORBIN, E.; UZBEKOVA, S. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental

competence in cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 85, n. 9, p. 1625- 1634.e2, 2016.

PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; SIROIS, J.; FORTIER, M. A. Expression of microsomal prostaglandin E synthase in bovine endometrium: coexpression with cyclooxygenase type 2 and regulation by interferon-tau. **Endocrinology**, [s.l.], v. 143, 2936e43, 2002;

PATE, J. L. Roadmap to pregnancy during the period of maternal recognition in the cow: changes within the corpus luteum associated with luteal rescue. **Theriogenology**, [s.l.], v. 150, p. 294-301, 2020.

REYNOLDS, L. P.; BOROWICZ, P. P.; CATON, J. S. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. **The International Journal of Developmental Biology**, [s.l.], v. 54, p. 355-365, 2010.

ROBINSON, R. S.; FRAY, M. D.; WATHES, D. C.; LAMMING, G. E.; MANN, G. E. In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations interferon tau during early pregnancy in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, [s.l.], v. 73, p. 470-474, 2006.

RYAN, D. P.; SPOON, R. A.; WILLIAMS, G. L. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. **Journal of animal science**, [s.l.], v. 70, n. 11, p. 3505-3513, 1992.

SADEGHI, M. R. Present and Prospective Diagnostic and Therapeutic Options for Repeated IVF Failures. **Journal of Reproduction & Infertility**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 1–2, 2012.

SALES, K. J.; JABBOUR, H. N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. **Reproduction-Cambridge**, [s.l.], v. 126, n. 5, p. 559 567, 2003.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; BALLOU, M. A.; HIGGINBOTHAM, G. E.; KIRK, J. H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, [s.l.], v. 80, p. 31-45, 2004.

SCENNA, F. N.; EDWARDS J. L.; ROHRBACH, N. R.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F.N. Detrimental effects of prostaglandin F2 α on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [s.l.], v. 73, p. 215-226, 2004.

SHOLL, S. A.; ORSINI, M. W.; HITHINS D. J. Estrogen synthesis and metabolism in the hamster blastocyst, uterus, and liver near the time of implantation. **Journal. Steroid Biochemistry**, [s.l.], v. 19, p. 1153, 1983.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reproduction Biology Endocrinology**, [s.l.], v. 2, p. 49, 2004.

SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Conceptus signal signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, [s.l.], v. 82-83, p. 537-550, 2004b.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Fetal maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTION DOMESTIC RUMINANTS, 7., 2006, Wellington. **Proceedings** [...]. Wellington: [s.n.], , 2006. p. 379-396.

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

SREENAN, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 9, p. 69-83, 1978.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal Dairy Sci.**, [s.l.], v. 81, p. 856-871, 1998.

THANGAVELU, G.; COLAZO, M. G.; AMBROSE, D. J.; OBA, M.; OKINE, E. K.; DYCK, M. K. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, [s. l.], v. 68, p. 949-957, 2007.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 56, p. 1435-1450, 2001.

TOMINAGA, K; SHIMIZU, M; OYAMA, S; IZAIKE Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine *in vitro* produced 16-cell embryos. **Theriogenology**, [s.l.], v. 53, p. 1669-80, 2000.

VIANA, J. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: a new milestone has been reached: transfers of IVP embryos were over one million worldwide. **Embryo Technology Newsletter**, [s.l.], v. 40, n. 4, p. 22-40, 2022.

WARZYCH, E.; PAWLAK, P.; PSZCZOLA, M.; CIESLAK, A.; LECHNIAK, D. Prepubertal heifers versus cows: the differences in the follicular environment. **Theriogenology**, [s.l.], v. 87, p. 36-47, 2017.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 77, p. 190-201, 2007.

WEEMS, C. W.; WEEMS, Y. S.; LEWIS, A. W.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Effects of agonist on bovine luteal or caruncular endometrial

secretion of prostaglandin E2 and F2 α (PGE2; PGF2 α) or progesterone (P4). **Soc. Reprod. Fertil.**, [s.l.], Suppl. 64, p. 552, 2007.

WENTZEL, P.; WELSH, N.; ERICKSSON, U. J. Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered prostaglandin E2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. **Diabetes**, [s.l.], v. 48, p. 813-820, 1999.

WHATHES, D. C.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The establishment of early pregnancy in cows. **Reproduction of Domestic Animals**, [s.l.], v. 33, p. 279-284, 1998.

CAPÍTULO 2 – ESTUDO 1

SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS NO MEIO DE CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* ALTERA A BIOSÍNTESE DE PGF2 α E PGE2 E A PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA

Laura Chuba Machado Rolniche¹, Lucas de Oliveira Bezerra², Adriano Felipe Mendes², Maria Eduarda Rocha Pinto¹, Emily Silva do Nascimento¹, Amanda Guimarães³, Isabella Rio Feltrin², Vitor Rodrigues Gomes Mercadante⁴, Alan Ealy⁴, Guilherme Pugliesi³, Claudia Maria Bertan Membrive^{1,2}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros (SP 294), Km 651, Dracena, São Paulo, 17915-899, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências (IB), Rua Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, 18618-689, Brasil.

³ Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Departamento de Reprodução Animal, Avenida Duque de Caxias Norte, 255, Pirassununga, São Paulo, 13635-900, Brasil.

⁴ Escola de Ciências Animais, Virginia Tech, Blacksburg, VA, 24061, EUA.

RESUMO

A mortalidade embrionária precoce, ocasionada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP) entre os dias 15 e 19 após a fecundação, constitui uma das maiores causas de falhas reprodutivas. Diante desse contexto, estratégias que visam favorecer o RMP tornam-se de grande interesse econômico. A hipótese é que a suplementação com CLA, AL, AO ou EPA + DHA, durante o cultivo *in vitro* de embriões (CIV), reduz a síntese de $\text{PGF2}\alpha$, aumenta a síntese de PGE2 e a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$, e determina aumento da taxa de blastocistos produzidos no dia 7 e maior taxa de eclosão no dia 9 após a fertilização *in vitro*. Objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 100 μM de CLA, 100 μM de AL, 100 μM de AO ou 50 μM de EPA + 50 μM de DHA, no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (CIV), sobre a taxa de blastocistos produzidos no D7 e taxa de eclosão no D9, assim como na síntese de $\text{PGF2}\alpha$, PGE2 e a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$ no meio de cultivo no D9. Assim, ovários de fêmeas *Bos taurus indicus* foram obtidos em abatedouros, onde os oócitos com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células do cumulus, foram alocados aleatoriamente em gotas de 100 μL de meio de maturação, suplementados com 5% de SFB sob óleo mineral. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO_2 , durante 24 horas. Em seguida, os oócitos foram submetidos a fertilização *in vitro* (FIV; considerado D0) utilizando apenas uma partida de sêmen criopreservado de um único touro da raça Nelore, incubado durante 18 horas nas mesmas condições da MIV. Após a FIV, os prováveis zigotos foram alocados em placas de 4 poços contendo 700 μL de meio de cultivo acrescido de 1,25% de SFB, contendo os respectivos tratamentos 100 μM de CLA, AL, AO ou EPA + DHA e o grupo controle (0 μM de CLA) em cada poço, sendo mantidos no CIV até o D9. A suposição de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os grupos tratados com ácidos graxos não apresentaram aumento na taxa de clivagem no D3 ($P = 0,9758$) e na produção de blastocistos no D7 e D9, quando comparados ao grupo controle. O grupo EPA + DHA determinou uma menor taxa de blastocistos no D7 ($P = 0,0378$) e no D9 ($P = 0,0036$), quando comparado aos demais grupos. A síntese de $\text{PGF2}\alpha$ foi maior em embriões suplementados com AL quando comparado aos demais grupos. O grupo AO apresentou maiores concentrações de $\text{PGF2}\alpha$ quando comparado aos grupos controle, CLA e EPA + DHA; enquanto grupos CLA e EPA + DHA apresentaram menores concentrações de $\text{PGF2}\alpha$ quando comparado aos demais grupos. A síntese de PGE2 não diferiu entre os grupos controle, AL e AO, enquanto os grupos suplementados com CLA e EPA + DHA apresentaram diminuição nas concentrações de PGE2 ($P = 0,0001$). As razões de $\text{PGE2/PGF2}\alpha$ não diferiu nos grupos controle, CLA, AL e AO, enquanto o EPA + DHA teve sua razão diminuída ($P = 0,0336$) em relação aos demais grupos. Conclui-se que a suplementação com CLA, AL, AO ou EPA + DHA, durante o cultivo *in vitro* de embriões (CIV) altera a síntese das prostaglandinas, no entanto não estimula a menor síntese de $\text{PGF2}\alpha$, a maior síntese de PGE2 , a maior razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$ e não promove maior produção embrionária no D7 e D9.

Palavras chaves: Embriões. Prostaglandinas. Ácidos graxos. Bovinos.

ABSTRACT

Early embryonic mortality, caused by failures in maternal recognition of pregnancy (MRP) between days 15 and 19 post-fertilization, constitutes one of the major causes of reproductive failures. In this context, strategies aimed at favoring MRP become of great economic interest. The hypothesis is that supplementation with CLA, LA, AO, or EPA + DHA during the in vitro culture of embryos (IVC) reduces PGF2 α synthesis, increases PGE2 synthesis and the PGE2/PGF2 α ratio, leading to an increased blastocyst rate on day 7 and a higher hatching rate on day 9 post in vitro fertilization. The objective was to determine the effects of supplementing 100 μ M of CLA, 100 μ M of LA, 100 μ M of AO, or 50 μ M of EPA + 50 μ M of DHA during the in vitro culture of bovine embryos (IVC) on the blastocyst rate on day 7, the hatching rate on day 9, as well as on the synthesis of PGF2 α , PGE2, and the PGE2/PGF2 α ratio in the culture medium on day 9. Ovaries from *Bos taurus indicus* females were obtained from slaughterhouses, where oocytes with homogeneous cytoplasm and multiple cumulus cell layers were randomly allocated in 100 μ L drops of maturation medium supplemented with 5% FBS under mineral oil. In vitro maturation (IVM) was performed in an incubator at 38.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 24 hours. Subsequently, the oocytes were subjected to in vitro fertilization (IVF; considered day 0) using a single batch of cryopreserved semen from a single Nelore bull, incubated for 18 hours under the same IVM conditions. After IVF, the presumptive zygotes were allocated into 4-well plates containing 700 μ L of culture medium supplemented with 1.25% FBS, containing the respective treatments of 100 μ M CLA, LA, AO, or EPA + DHA, and the control group (0 μ M CLA) in each well, and maintained in IVC until day 9. The assumption of normality of residuals and homogeneity of variances was verified using the Shapiro-Wilk test. The groups treated with fatty acids did not show an increase in cleavage rate on day 3 ($P = 0.9758$) and in blastocyst production on days 7 and 9, compared to the control group. The EPA + DHA group showed a lower blastocyst rate on day 7 ($P = 0.0378$) and day 9 ($P = 0.0036$) compared to the other groups. PGF2 α synthesis was higher in embryos supplemented with LA compared to the other groups. The AO group showed higher concentrations of PGF2 α compared to the control, CLA, and EPA + DHA groups; whereas the CLA and EPA + DHA groups showed lower concentrations of PGF2 α compared to the other groups. PGE2 synthesis did not differ between the control, LA, and AO groups, while the groups supplemented with CLA and EPA + DHA showed decreased concentrations of PGE2 ($P = 0.0001$). The PGE2/PGF2 α ratios did not differ among the control, CLA, LA, and AO groups, while the EPA + DHA group had a decreased ratio ($P = 0.0336$) compared to the other groups. It is concluded that supplementation with CLA, LA, AO, or EPA + DHA during the in vitro culture of embryos (IVC) alters prostaglandin synthesis; however, it does not stimulate lower PGF2 α synthesis, higher PGE2 synthesis, or a higher PGE2/PGF2 α ratio, and does not promote higher embryo production on days 7 and 9.

Keywords: Embryos. Prostaglandins. Fatty acids. Cattle.

2.1 Introdução

Biotecnologias reprodutivas como a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) aliada a transferência de embrião em tempo fixo (TETF), são ferramentas valiosas para intensificar o melhoramento genético e a produtividade, proporcionando a multiplicação exponencial de matrizes com alto valor genético. Contudo, as taxas de concepção após TETF nas receptoras, raramente ultrapassam taxa de sucesso de 50%. Um dos maiores problemas na performance reprodutiva de fêmeas bovinas de corte referem-se à mortalidade embrionária precoce (MEP) ocasionadas por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP), que acontece entre os dias 15 e 19 após a fecundação, este designado de “período crítico” (Binelli *et al.*, 2001). Segundo Taverne *et al.* (2002), de 46 a 63% das perdas gestacionais da PIVE acontecem nos primeiros 30 dias que decorrem da TETF e maior MEP é evidenciada em embriões produzidos *in vitro* (Ealy *et al.*, 2019).

Para o êxito no RMP, o conceito (embrião e membranas anexas) deve produzir de forma competente o interferon-tau (IFN-t), que interage diretamente com o endométrio materno, inibindo da síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α) pulsátil e a luteólise, consequentemente preservando a estrutura e funcionalidade do corpo lúteo (CL) e as elevadas concentrações circulantes de progesterona (P4) (Goff, 2002; Spencer *et al.*, 2007). O IFN-t secretado pelas células trofoblásticas do embrião inibe, por mecanismos endócrinos e parácrinos, a secreção pulsátil de PGF2 α e favorece o aumento de receptores de PGE2 (Arosh *et al.* 2016; Pate, 2020; Spencer *et al.*, 2004b; Spencer *et al.*, 2007). Após o processo de eclosão do blastocisto, no 13º dia após a fertilização, inicia-se um processo de alongamento do mesmo, transpondo de um formato esférico para filamentoso, ocupando o corno uterino ipsilateral da ovulação (Hafez, 2004; Robinson *et al.*, 2006). Assim, foi observado que quanto maior é o alongamento do conceito, maior será a expansão das células trofoblásticas e a biossíntese e a secreção de IFN-t (Robinson *et al.*, 2006). O embrião, assim como o endométrio, possui a capacidade de sintetizar as prostaglandinas (PGs). Para tanto, o ácido araquidônico (AA) por meio da enzima PTGS2 é convertido em PGH2, o qual é o precursor comum de PGs importantes como PGF2 e PGE2 (Giller *et al.*, 2018). A PGE2 desempenha papéis fundamentais durante o

processo de RMP, atuando sobre a síntese de P4 para manutenção do CL e nas interações iniciais entre embrião e endométrio, por meio de ação anti-luteolítica, contribuindo para o sucesso do RMP e o estabelecimento da prenhez (Wijayagunawardane *et al.*, 2001; Marei *et al.*, 2009).

A biossíntese das PGs endometrial e embrionária podem ser moduladas por ácidos graxos (AG). Os AGs da família ômega 6, como o ácido linoleico (AL) e isômeros de ácido linoleico conjugado do CLA *cis*-9, *trans*-11 (c9, t11) e *trans*-10, *cis*-12 (t10, c12), proporciona alterações na biossíntese de eicosanóides incluindo as PGs. A suplementação do meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μ M de CLA gerou redução da síntese de PGF2 α com 24, 48 e 72 horas de cultivo, assim como, no período de 48 e 72 horas pôde observar aumento da razão PGE2/PGF2 α em todos os grupos suplementados (Lourenço, 2022). O AL possui a capacidade de ser convertido em AA, de modo a estimular a biossíntese de PGF2 α , ou ainda, pode transcorrer por mais processo de desnaturação, se tornando precursor de ácidos graxos da família ômega 3 (Whates *et al.*, 2007). O ácido oleico (AO) é o principal ácido graxo insaturado presente nos oócitos (Matorras *et al.*, 1998), encontrado de modo abundante no fluido folicular de fêmeas bovinas no pós-parto, juntamente com o ácido palmítico e esteárico. Esses, desfrutam de efeitos adversos que são atenuados pela ação do AO em oócitos (Leroy *et al.*, 2005; Aardema *et al.*, 2011), com a capacidade de neutralizar efeitos negativos provocado pelos ácidos graxos saturados no desenvolvimento oocitário sobre a pré-implantação embrionária (Fayezi *et al.*, 2018). Os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) são capazes de inibir a secreção de PGF2 α em diferentes sistemas de cultivos de células, como as células endometriais bovinas (Levine; Worth, 1984; Achard *et al.*, 1997; Mattos *et al.*, 2001; Burke *et al.*, 1997; Staples *et al.*, 1998; Mattos *et al.*, 2000).

A síntese de PGF2 α e PGE2 em embriões é pouco compreendida, mas sabe-se que ácidos graxos específicos podem alterar a síntese dessas PGs. Portanto, compreender a ação de tais ácidos graxos na síntese de PGs nos embriões, torna-se de interesse. A hipótese é que a suplementação com CLA, AL, AO ou EPA + DHA, durante o cultivo *in vitro* de embriões (CIV) diminui a síntese de PGF2 α , aumenta a síntese de PGE2, aumenta razão PGE2/PGF2 α

e aumenta a taxa de blastocistos no D7 e no D9. Objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 100 μ M de CLA, 100 μ M de AL, 100 μ M de AO ou 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA, no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (CIV), sobre a taxa de blastocistos produzidos no D7 e taxa de eclosão no D9, assim como na síntese de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α no meio de cultivo no D9.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Local do experimento

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Endométrio e Embrião (LIFE), sediado no Departamento de Produção Animal (DPA), da Faculdade de Ciência e Tecnologia Animal (FCAT), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Dracena, São Paulo, Brasil. As análises por ELISA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), em Pirassununga, São Paulo, Brasil. Os Princípios Éticos da Experimentação Animal, foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP de Dracena (Protocolo nº 18/2022 – CEUA), estado de São Paulo, Brasil.

2.2.2 Recuperação dos complexos *cumulus*-oócito e seleção

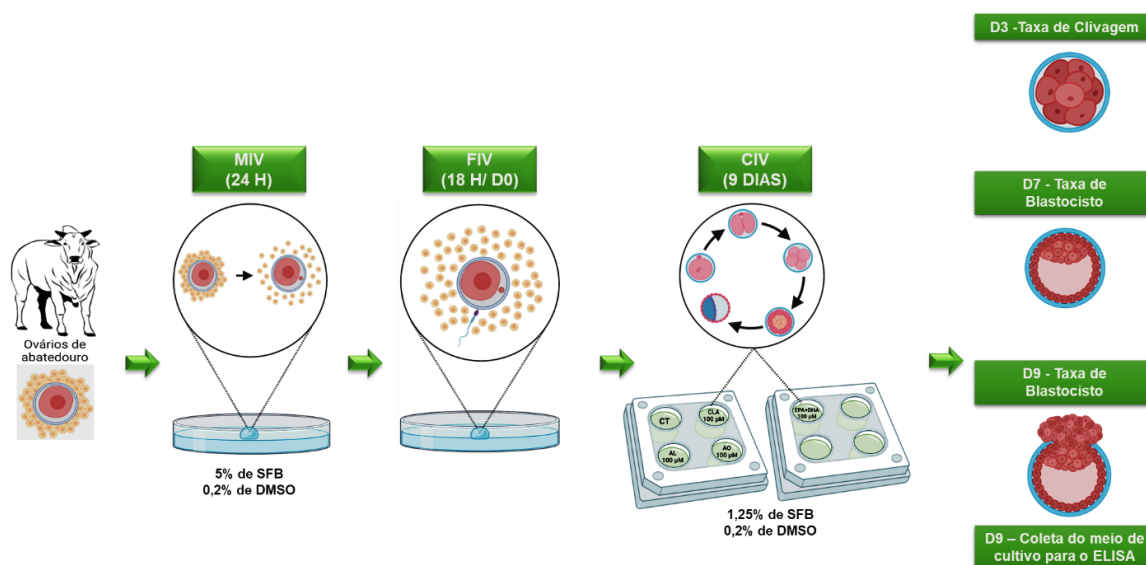
Ovários de fêmeas *Bos taurus indicus* foram obtidos em abatedouros e imediatamente após o abate, foram transportados ao laboratório imersos em solução salina (0,9% NaCl) a 36°C em caixa térmica, de forma que a temperatura fosse mantida durante todo o transporte. No laboratório, folículos com o diâmetro de 2 a 8 mm foram aspirados com o uso de uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 18-G. O fluído folicular obtido da aspiração dos folículos foi depositado em um tubo cônico estéril de 15 mL que foi mantido a 37,5°C até que a decantação dos oócitos fosse formada no fundo do tubo. O sobrenadante foi

removido e o sedimento foi transferido para placas de poliestireno 100 x 20 mm de diâmetro (*Corning Incorporated*, NY, USA), contendo meio de lavagem. Utilizando um estereomicroscópio (Nikon SMZ800, Tokyo, Japão), os complexos *cumulus-oócito* (COCs) foram avaliados e categorizados em graus I, II ou III; de acordo com as características morfológicas (Scenna et al., 2004). Foram utilizados somente COCs com citoplasma homogêneo e circundado por múltiplas camadas de células do cumulus (graus I e II).

2.2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental está apresentado na Figura 6. Os oócitos bovinos foram distribuídos equitativamente entre os cinco grupos de tratamentos, contendo número igual de complexos *cumulus-oócito* (COCs) entre tratamentos (14 a 25 oócitos / tratamento) em cada repetição, em um total de 10 repetições. A seleção e distribuição dos oócitos entre os grupos experimentais foram ao acaso, evitando efeito de seleção. Ao término das repetições, foram avaliados 1117 COCs, subdivididos: grupo controle (n= 223; nenhuma suplementação), grupo CLA (n= 223; 100 µM CLA), grupo AL (n= 227; 100 µM AL), grupo AO (n= 225; 100 µM AO) e EPA + DHA (n= 219; 50 µM EPA + 50 µM DHA). A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos foram realizadas em placas de Petri, em sistema de gotas, com a suplementação de 5% de SFB e 0,2% de DMSO sob óleo mineral, durante 24 horas. A fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada em sistema de gotas, por 18 horas em óleo mineral, o dia da FIV foi considerado como D0. O cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões foi realizado em placas de 4 poços, contendo 700 µL de meio suplementado de acordo com cada tratamento com 1,25% de SFB e 0,2% de DMSO. No D3 foi avaliada a taxa de clivagem dos embriões. No D7 e D9, avaliou-se blastocistos totais e por categoria de blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e taxa de blastocisto geral. Para mensuração das concentrações de PGE2 e PGF2α por ELISA; foram coletados o meio de cultivo dos embriões no D9 (D0 = dia da FIV).

Figura 6 - Delineamento Experimental.



Fonte: Elaborado pela autora.

Complexos *cumulus*-oócito (COCs) obtidos de ovários de fêmeas bovinas Nelore (n= 1117) foram divididos aleatoriamente e equitativamente entre os cinco grupos de tratamentos, 14 a 25 oócitos / tratamento em cada repetição, em um total de 10 repetições. A seleção e distribuição dos oócitos entre os grupos experimentais foram ao acaso, evitando efeito de seleção. Ao término das repetições, foram avaliados 1117 COCs, subdivididos: grupo controle (n= 223; nenhuma suplementação), grupo CLA (n= 223; 100 µM CLA), grupo AL (n= 227; 100 µM AL), grupo AO (n= 225; 100 µM AO) e EPA + DHA (n= 219; 50 µM EPA + 50 µM DHA). A MIV foi realizada em sistema de gotas, com a suplementação de 5% de SFB e 0,2% de DMSO sob óleo mineral, durante 24 horas. A FIV foi realizada em sistema de gotas, por 18 horas em óleo mineral, o dia da FIV foi considerado como D0. O CIV dos embriões foi realizado em placas de 4 poços, contendo 700 µL de meio suplementado de acordo com cada tratamento com 1,25% de SFB e 0,2% de DMSO, por 9 dias. No D3 (D0 = dia da FIV) foi avaliada a taxa de clivagem dos embriões. No D7 e D9, avaliou-se blastocistos totais e por categoria de blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e taxa de blastocisto geral. Para mensuração das concentrações de PGE2 e PGF2α por ELISA; foram coletados o meio de cultivo dos embriões no D9.

2.2.4 Maturação *in vitro* dos complexos *cumulus*-oócito (COCs)

Os COCs selecionados foram lavados três vezes em gotas de 50 µL de meio de lavagem H-199, constituído por TCM-199 (Gibco BRL) suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 75 µg de Gentamicina/mL. Posteriormente foram lavados uma vez em meio de maturação B-199, constituído de TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg de Gentamicina/ml, 0,5 µg de FSH/ml (Pluset®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil), 100 UI de hCG/ml (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) acrescido de 5% de SFB (Gibco

BRL) de acordo com o grupo de tratamento. Posteriormente, os COCs selecionados foram distribuídos aleatoriamente em gotas de 100 µL de meio de maturação sob óleo mineral. A MIV foi realizada em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂, durante 24 horas. Todos os meios utilizados na para a produção de embriões foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil).

2.2.5 Fertilização *in vitro* (FIV)

Os grupos de COCs foram alocados aleatoriamente em gotas contendo 100 µL de meio de fertilização sob óleo mineral para receberem o sêmen. Foi utilizado o sêmen criopreservado de um único touro Nelore e única partida (PRO PHELPS BAL, Central Bela Vista, partida NE 543114BAL), com fertilidade *in vitro* previamente comprovada. A palheta de sêmen foi descongelada a 36°C por 30 segundos em um descongelador automático de sêmen (WTA, modelo INPI/D1710561-9, Cravinhos, São Paulo, Brasil) e em seguida foi avaliada a qualidade espermática. Ao sêmen foi adicionado o gradiente composto por meio *Select Sperm* acrescido de CAP. Logo após, esta mistura foi centrifugada a 5000 x g, durante 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a centrifugação o sedimento contendo os espermatozoides foi avaliado, em microscópio óptico (Zeiss, Axiostar Plus), quanto a motilidade e concentração espermática em câmara de Neubauer. Após a MIV, os COCs foram lavados três vezes em gotas de 50µL de meio FIV comercial. Assim, os COCs foram colocados no meio FIV em gotas de 100 µL de meio de fertilização dispostas em placas de Petri de 35 mm cobertas com óleo siliconado para receberem o sêmen diluído. O sêmen foi diluído na concentração final ajustada para 2×10^6 espermatozoides viáveis /mL. O *pellet* de espermatozoides foi ressuspendido em meio FIV de acordo com o resultado do cálculo. Foram utilizados 6 µL desse conteúdo para fertilizar cada gota de 100 µL de meio de fertilização. Os oócitos foram submetidos a FIV durante 18 horas em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

2.2.6 Preparo das soluções de ácidos graxos

A suplementação dos meios de cultivos foi realizada com ácido linoléico conjugado (CLA; Sigma-Aldrich, EUA, Cat n°. O5507), ácido linoleico (AL; Sigma-Aldrich, USA, Cat n°L1376), ácido oleico (AO; Sigma-Aldrich, USA, Cat n°. O1383), ácido eicosapentaenóico (EPA Sigma-Aldrich, USA, Cat n°. PHR1790) e docosahexaenóico (DHA Sigma-Aldrich, USA, Cat n°. D2532). Uma solução estoque de cada ácido graxo foi preparada na concentração de 1.000.000 $\mu\text{M}/\text{mL}$ para o CLA, AL, AO e EPA, e 200.000 $\mu\text{M}/\text{mL}$ para o DHA, todas as soluções foram preparadas em Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. D2650) conforme descrito por Cheng *et al.* (2003). Para o preparo da suplementação, o estoque de cada ácido graxo foi diluído em meio CIV (Botufiv) suplementado com 1,25% de SFB, no final todos os ácidos graxos ficaram na concentração de 100 μM , exceto para o grupo EPA + DHA que foram utilizados em associação, na concentração de 50 μM para cada um deles, tendo uma concentração final da associação de 100 μM . Todas as soluções de tratamentos e o controle tinham quantidades semelhantes de DMSO, balanceados com a mesma concentração de 0,2%.

2.2.7 Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV)

Após a FIV, os prováveis zigotos foram colocados em 50 μL do meio de lavagem, e foram submetidos ao desnudamento, pelo procedimento de turbilhonamento do meio por sucessivas pipetagens. Posteriormente, foram lavados três vezes sucessivamente em gotas de 50 μL de meio de cultivo. Após este processo, as estruturas foram alocadas nas placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 700 μL de meio de cultivo CIV acrescido de 1,25% de SFB (Gibco BRL) com os respectivos tratamentos. Os prováveis zigotos com os respectivos tratamentos foram mantidos em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO_2 durante 9 dias (D0 ao D9).

2.2.8 Avaliação da taxa de clivagem e produção embrionária

A taxa de clivagem foi avaliada no D3, e a produção embrionária no D7 e D9 (D0 = dia da fertilização *in vitro*). Determinou-se a taxa de produção de

embriões (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100) quando os blastocistos foram classificados em blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido.

2.2.9 Coleta do meio de cultivo

O meio de cultivo do embrião, aproximadamente 700 µL de meio de cada poço, foi coletado no D9 para mensuração das concentrações de PGE2 e PGF2 α por ELISA, a acondicionado em microtubos livres de DNase e RNase. O meio foi centrifugado a 12.000 *g* por 2 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, livres de DNase e RNase, e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA.

2.2.10 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

As concentrações de PGE2 e PGF2 α foram mensuradas a partir do meio de cultura utilizando os kits *Prostaglandin E2 ELISA kit – Monoclonal*, N° 514010 (*Cayman Chemical*) e *Prostaglandin F2 α ELISA kit*, N° 516011 (*Cayman Chemical*) com 80% de sensibilidade, de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.11 Análise estatística

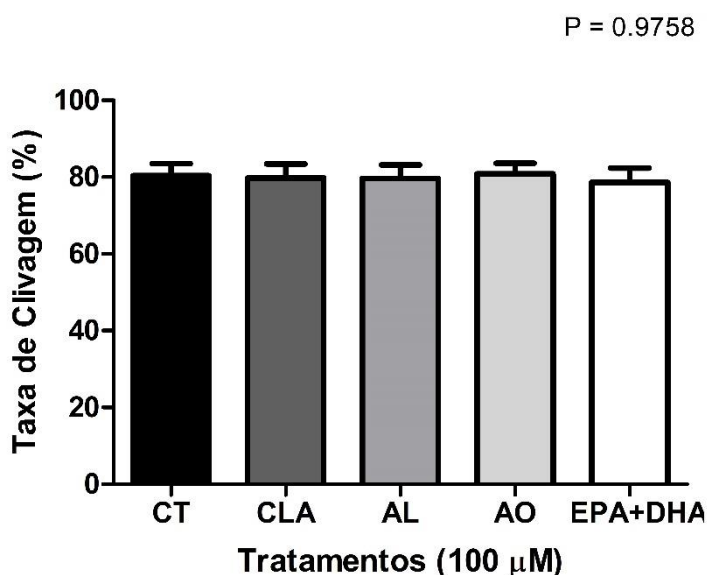
As análises estatísticas foram realizadas utilizando PROC MIXED do SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), considerando cada poço como unidade experimental. A suposição de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio do teste de Shapiro-Wilk. Quando essas premissas não foram atendidas, transformações logarítmicas foram aplicadas nos dados brutos. Para as respostas de PGF2 α e PGE2, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) considerando o efeito principal do grupo de tratamento. Os resultados estão apresentados com média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para todas análises, a significância foi considerada quando $P \leq 0,05$.

2.3 Resultados

2.3.1 Taxa de clivagem no D3

Conforme ilustrado na Figura 7, observou-se que a taxa de clivagem no D3 não foi diferente ($P = 0,9758$) quando se comparou os diferentes grupos experimentais.

Figura 7 - Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL), Ácido Oleico (AO), Ácido Eicosapentanóico (EPA), Ácido Docosahexanóico (DHA) ou não suplementado (grupo Controle; CT) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro* sobre a taxa de clivagem

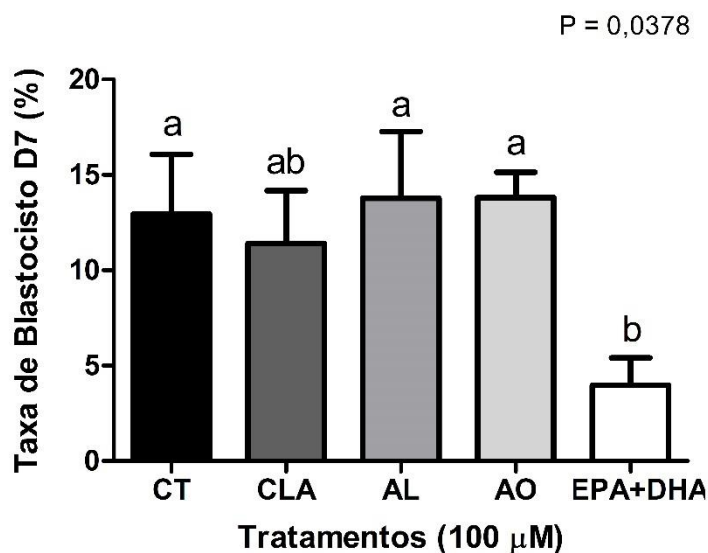


Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

2.3.2 Taxa de blastocisto no D7

Conforme ilustrado na Figura 8, foi evidenciado que nenhum dos ácidos graxos utilizados aumentou a taxa de blastocistos no D7 quando comparados ao grupo controle. Ainda foi observado que no grupo EPA + DHA houve menor taxa de blastocistos ($P = 0,0378$) comparado aos grupos CT, AL e AO.

Figura 8 - Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanoico (EPA) e Ácido Docosahexanoico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sobre a porcentagem da taxa de blastocistos no D7

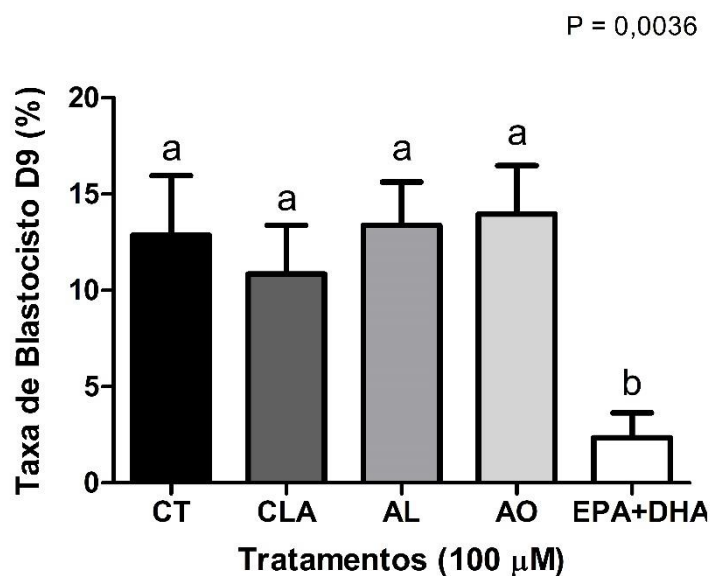


Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM); ^{a,b} Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

2.3.3 Taxa de blastocisto no D9

Conforme ilustrado na Figura 9, foi evidenciado que nenhum dos ácidos graxos utilizados aumentou a taxa de blastocistos no D9 quando comparados ao grupo CT e ainda no grupo EPA + DHA observou-se menor taxa de blastocistos ($P = 0,0036$) comparado aos demais grupos.

Figura 9 - Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro* na taxa de blastocistos no D9

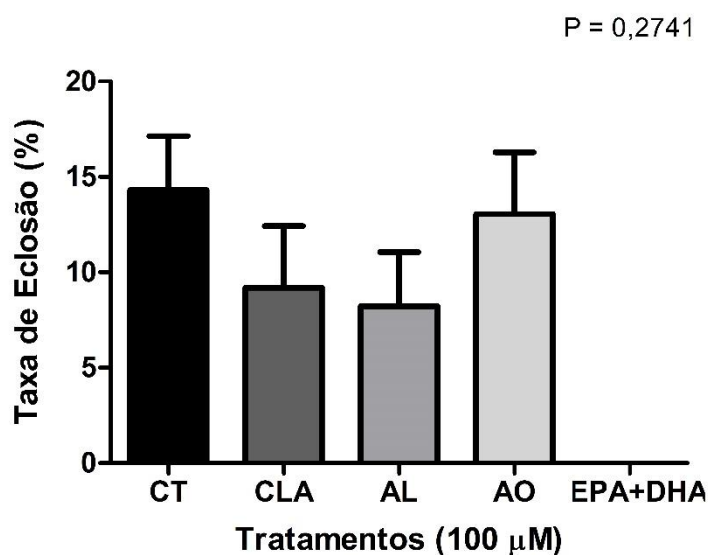


Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM); ^{a,b} Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

2.3.4 Taxa de eclosão

Conforme ilustrado na Figura 10, a taxa de eclosão não diferiu entre os diferentes grupos de tratamento ($P = 0,2741$). No grupo suplementado com EPA + DHA não houve a produção de blastocistos eclodidos em todas as repetições realizadas.

Figura 10 - Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, na taxa de blastocistos eclodidos no D9

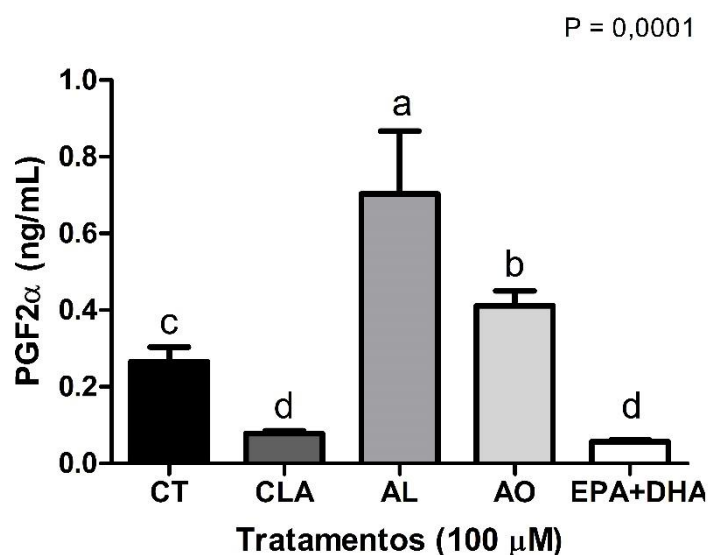


Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

2.3.5 Concentrações de PGF2 α no D9

Conforme ilustrado na Figura 11, foi evidenciado efeito significativo entre os grupos experimentais ($P = 0,0001$). O grupo suplementado com AL promoveu uma maior concentração de PGF2 α ($0,7026 \pm 0,1644$ ng/mL) comparado a todos os demais grupos. O grupo AO ($0,4110 \pm 0,0391$ ng/mL) apresentou maiores concentrações de PGF2 α quando comparado aos grupos CT, CLA e EPA + DHA. Os grupos CLA e EPA + DHA apresentaram menores concentrações de PGF2 α quando comparado aos demais grupos.

Figura 11 - Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, na síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α) no D9



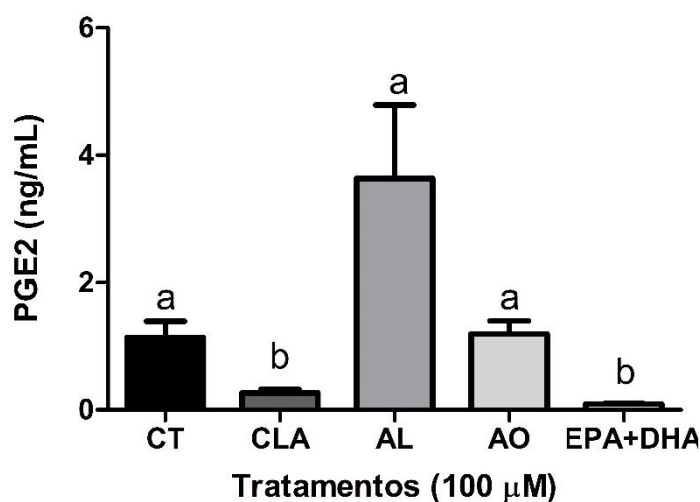
Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM); ^{a,b,c,d} Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

2.3.6 Concentrações de PGE2 no D9

Conforme ilustrado na Figura 12, as concentrações de PGE2 foram maiores ($P = 0,0001$) no grupo CT, AL e AO quando comparado aos grupos CLA e EPA + DHA.

Figura 12 - Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanoico (EPA) e Ácido Docosahexanoico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, na síntese de prostaglandina E2 (PGE2) no D9

P = 0,0001

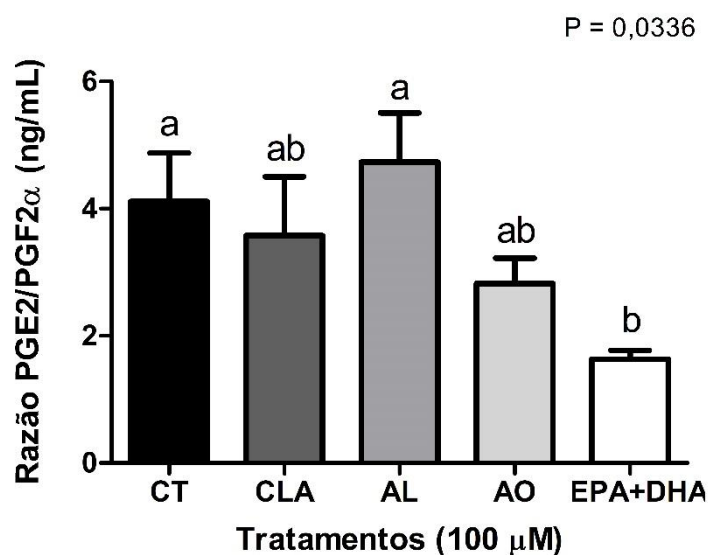


Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM); ^{a,b} Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

2.3.7 Efeitos sobre a Razão de PGE2/PGF2 α no D9

Na Figura 13 está representada as razões de PGE2/PGF2 α dos meios de cultivos dos embriões suplementados com os ácidos graxos. Os grupos CT e AL apresentaram maior razão quando comparado ao grupo EPA + DHA.

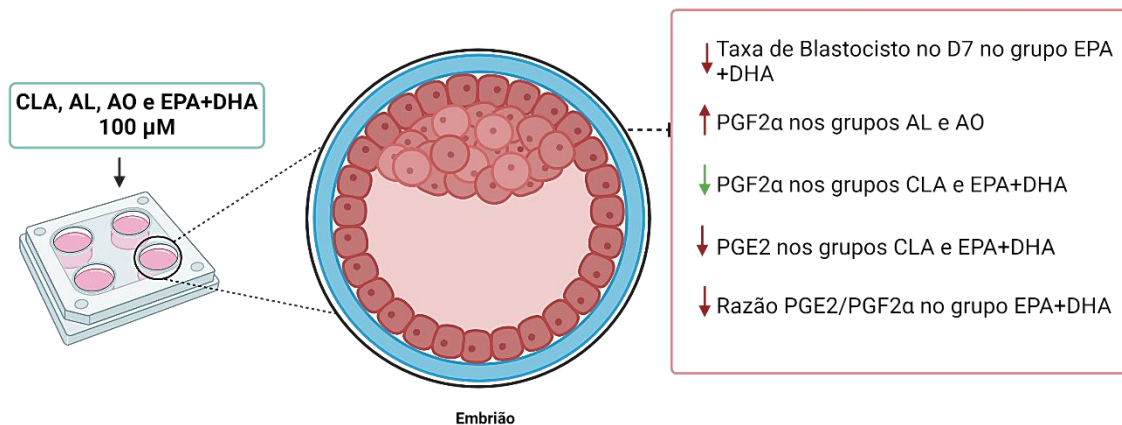
Figura 13 - Efeitos da suplementação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA), Ácido Linoleico (AL); Ácido Oleico (AO); Ácido Eicosapentanóico (EPA) e Ácido Docosahexanóico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, na razão de PGE2/PGF2 α no D9



Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM); ^{a,b} Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

Os principais resultados estão sumarizados na Figura 14.

Figura 14 - Sumarização dos resultados apresentados com a suplementação com 100 μ M de CLA, AL, AO ou EPA + DHA, durante o cultivo *in vitro* de embriões (CIV) na síntese de PGE2 e PGF2 α e na produção embrionária



Fonte: Elaborado pela autora.

O grupo EPA+DHA diminuiu a produção embrionária no D7, assim como diminuiu a síntese de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α . O grupo AL e AO diminuiu a síntese de PGF2 α e o grupo CLA diminuiu a síntese da PGE2 e PGF2 α .

2.4 Discussão

No presente trabalho foi realizada a investigação do efeito da suplementação do meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*, com AL ou CLA (ômega 6), EPA e DHA (ômega 3) ou AO (ômega 9); na síntese de PGF2 α e PGE2 e no desenvolvimento embrionário. Verificou-se que os grupos tratados com ácidos graxos não apresentaram aumento na taxa de clivagem no D3 e na produção de blastocistos no D7 e D9, quando comparados ao grupo controle. O grupo EPA + DHA determinou uma menor taxa de blastocistos no D7 e no D9, quando comparado aos demais grupos. A síntese de PGF2 α foi maior em embriões suplementados com AL quando comparado aos demais grupos. O grupo AO apresentou maiores concentrações de PGF2 α quando comparado aos grupos controle, CLA e EPA + DHA; enquanto grupos CLA e EPA + DHA apresentaram menores concentrações de PGF2 α quando comparado aos demais grupos. A síntese de PGE2 não diferiu entre os grupos controle, AL e AO, enquanto os grupos suplementados com CLA e EPA + DHA apresentaram diminuição nas concentrações de PGE2. As razões de PGE2/PGF2 α não diferiu

nos grupos controle, CLA, AL e AO, enquanto o EPA + DHA teve sua razão diminuída em relação aos demais grupos. Esses resultados confirmam que os ácidos graxos alteram a síntese de prostaglandinas.

Quanto ao desempenho do CLA, nossos dados corroboram os achados de Heravi et al. (2013), quando observaram que a síntese de PGE2 e PGF2 α foi diminuída em meio de cultivo de células endometriais incubadas por 24 horas com dois tipos de CLA; o cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12. Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, Maldonado *et al.* (2023) suplementaram células trofoblásticas bovinas (CT1) com o mesmo CLA utilizado no referido estudo e verificaram que após 48 horas de cultivo a síntese de e PGF2 α foi reduzida embora não tenha alterado a síntese de PGE2 em células tratadas com 50 e 100 μ M de CLA, quando foram comparadas ao grupo controle. Os mesmos autores, também verificaram que em CT1 tratadas com 10 μ M de CLA mostraram significativa redução na concentração de PGE2. Os autores observaram que o CLA aumentou a razão PGE2/PGF2 α em 2,6 vezes comparado ao grupo controle. No nosso estudo não encontramos tal razão aumentada quando utilizamos a dose de 100 μ M semelhante a dose utilizada nas CT1. Devemos considerar que em nosso estudo, avaliamos tal efeito em embriões que possuem um número muito maior de células que as células endometriais ou trofoblásticas contidas em um poço de cultivo; o que torna difícil correlacionar a mesma concentração de CLA a estruturas com um número de células bastante diferentes. Acreditamos que o aumento da razão PGE2/PGF2 α seria o principal efeito no favorecimento do RMP, no entanto nenhum dos ácidos graxos aqui utilizados na suplementação se mostraram promissores em aumentar tal razão, mas dentre todos os utilizados o EPA + DHA foram evidenciados como os menos promissores.

Stinshoff *et al.* (2014) que relataram que a suplementação do meio de cultivo com 50 μ M e 100 μ M de CLA t10, c12 não aumentou a taxa de clivagem e reduziu a taxa de embriões produzidos quando comparado ao grupo controle. Nossos achados quanto a taxa de clivagem foram semelhantes mas não quanto a produção embrionária, pois não verificamos um decréscimo na produção embrionária quando utilizamos CLA. Ainda verificamos que a suplementação com EPA + DHA quando comparado ao grupo controle diminuiu a taxa de

blastocisto no D7 e D9, além de inviabilizar a taxa de eclosão. O grupo suplementado com EPA + DHA não produziu nenhum blastocisto eclodido em todas as 10 repetições realizadas ao longo do experimento. Esses resultados são apoiados por Darwich *et al.* (2010), que observaram que o DHA (1,10 ou 100 μ M) fornecido ao longo do cultivo *in vitro* de embriões, na maior concentração de 100 μ M promoveu uma diminuição na sobrevivência embrionária. No entanto, Oseikria *et al.* (2016) e Maillard *et al.* (2018) constataram que 1 μ M de DHA no meio de cultivo proporcionou aumento da qualidade de oócitos e blastocistos *in vitro* no D7. Desse modo, nesse estudo era esperado que a associação de EPA + DHA favorecesse a produção embrionária, no entanto tal associação afetou negativamente a produção embrionária, podendo ter desencadeado efeito antagônico, causando toxicidade as estruturas.

O grupo suplementado com AO e AL induziram o aumento tanto da síntese de PGF2 α , como também instigaram uma maior síntese de PGE2 em comparação como o grupo controle. Cheng *et al.* (2015), observaram que células endometriais de ovelhas expostas a baixas concentrações de AO (20 e 100 μ M) por 24 horas aumentou na síntese de PGE2, reduziu PGF2 α e duplicou a razão PGE2/PGF2 α . Em um estudo realizado por nosso grupo em que efeito positivo foi evidenciado em células trofoblásticas na maior concentração utilizada de 1000 μ M de AO, promovendo aumento na síntese de PGE2 e redução da síntese de PGF2 α , apesar de não alterar a razão PGE2/PGF2 α (Lourenço, 2022). Os grupos suplementados com CLA e EPA + DHA tiveram a concentração de PGF2 α diminuída quando comparados ao controle e em um estudo realizado por Mattos *et al.* (2003), quando o EPA foi utilizado em células endometriais bovinas (BEND) por 24 horas, na concentração de 10 a 20 μ M, foi evidenciado a inibição da síntese de PGF2 α , semelhante ao que verificamos em nosso estudo com embriões. No que diz a respeito aos efeitos das suplementações sobre a síntese de PGE2, os grupos suplementados com AL e AO não aumentaram a síntese de PGE2 comparado ao grupo controle e o grupo com CLA e EPA + DHA promoveram uma redução na síntese de PGE2 quando comparado ao grupo controle.

Esses resultados sugerem que os ácidos graxos podem ter diferentes efeitos dependendo do tipo de célula e da concentração utilizada. A diferença na modulação da síntese de PGE2 pode estar diretamente relacionada aos tipos de

ácidos graxos utilizados, já que os grupos tratados com AL e AO não apresentaram modulação significativa na biossíntese em relação ao controle. As concentrações de PGE2 e PGF2 α comportaram-se de forma semelhante após a suplementação com os diferentes ácidos graxos, sugerindo que esses ácidos podem exercer seus efeitos em uma etapa comum da síntese de ambas as prostaglandinas. Isso ocorre porque PGE2 e PGF2 α compartilham os mesmos sistemas enzimáticos desde a liberação do ácido araquidônico da membrana fosfolipídica até a síntese de PGH2 ou, simultaneamente, nas vias de síntese de PGE2 e PGF2 α de forma independente.

Segundo Meier *et al.* (2009), o tecido trofoblástico incubado com uma concentração final de 10 μ M de EPA, DHA ou AL após a cultura por 5 horas a 37°C, não promoveu alteração na síntese de PGF2 α e PGE2 no endométrio de fêmeas prenhes e não prenhes no D16 e D17 e também em células trofoblásticas. Ainda assim, houve tendência de que EPA e DHA reduzissem a liberação de PGE2, assim como em nossos achados. Talvez, o AL não tenha alterado a síntese de prostaglandinas por consequência do curto período de 5 horas de tratamento que os tecidos foram submetidos, no entanto é reconhecido que o AL apresenta uma ação inibidora da enzima COX-2, fundamental para a síntese de PGF2 α (Mattos *et al.*, 2003). O aumento da PGE2 no desenvolvimento embrionário, especificamente na proliferação das células embrionárias e trofoblásticas permitem maior êxito no RMP, a qual possui ação luteotrófica e anti-luteolítica, mantendo a funcionalidade do CL e as concentrações de progesterona (P4) elevadas para manutenção da prenhez (Spencer *et al.*, 2007; Niringiyumukiza, Cai; Xiang, 2018) e Arosh *et al.*, (2016), por sua vez, encontraram evidências que indicam que o incremento de PGE2 é tão significativo quanto a supressão de PGF2 α .

Efeitos das suplementações sobre a razão de PGE2/PGF2 α em meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* observados nos grupos controle, CLA, AL e AO, não influenciaram a razão. Por outro lado, EPA + DHA teve suas concentrações reduzidas. Segundo Bazer *et al.* (1986), salientaram que a razão PGE2/PGF2 α é mais importante que as concentrações absolutas no contexto reprodutivo de bovinos, onde não evidenciamos o aumento de tal razão. Caldari-Torres *et al.* (2006), verificaram que o EPA na concentração de 100 μ M por 24 horas diminuiu a biossíntese de PGF2 α endometrial, sendo semelhante ao que

observamos nos embriões. Em nosso estudo, o grupo suplementado com EPA + DHA produziu poucos blastocistos durante todo o experimento, podendo sugerir que a diminuição de PGF2 α seja influenciada pela baixa produção de embriões.

Como descrito nesse trabalho, podemos verificar que ácidos graxos específicos possuem a capacidade de modular a síntese das PGs. Bezerra *et al.* (2024) (dados ainda não publicados), avaliou por meio da técnica de PCR, em embriões suplementados com os mesmos ácidos graxos e na mesma concentração (CLA, AL, AO e EPA + DHA a 100 μ M) a abundância de transcritos envolvidos no processo de RMP foi alterada, onde observou que a expressão da Prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGS2) no grupo suplementado com AO apresentou maior expressão ($P = 0,0286$) em relação ao controle e o AL ($1,1090 \pm 0,0833$ vs. $0,7109 \pm 0,0748$ e $0,7068 \pm 0,0577$; respectivamente). Para o Interferon-tau (IFN-t), houve tendência ($P = 0,1148$) entre os grupos tratados, onde CLA e AO apresentaram a maior expressão em relação ao controle ($0,1544 \pm 0,0293$ vs $0,1750 \pm 0,0465$ vs $0,0344 \pm 0,0073$, respectivamente), desse gene importante no RMP e para o sucesso da prenhez. Assim, tanto IFN-t quanto PGE2 são moléculas essenciais para o RMP. O IFN-t não só exerce ações anti-luteolíticas, mas também aumenta a expressão de genes específicos no endométrio, conhecidos como ISGs, que regulam a receptividade uterina para a implantação e o desenvolvimento do embrião. Um aumento na produção de PGE2 pelo embrião pode tornar a sinalização mais eficiente durante o estabelecimento da prenhez e em células endometriais bovinas, o IFN-t promove a síntese de PGE2 e reduz a de PGF2 α , favorecendo o RMP e aumentando as chances de sucesso na prenhez.

Como pode ser visto, em conjunto com os achados por outros autores, os ácidos graxos poliinsaturados possuem efeitos sobre as células que variam de acordo com a característica do tecido, as concentrações e o tipo de ácido graxo utilizado, sendo observado resultados discrepantes quanto aos seus potenciais efeitos na síntese de PGs. Perante o exposto, é possível concluir que embora existam diversos estudos onde foi investigado o uso dos ácidos graxos em modelos *in vivo* e *in vitro*, na maior parte deles o mecanismo de ação foi muito pouco esclarecido, mas que exercem influência no metabolismo das PGs. A partir desse pressuposto, evidenciamos que a suplementação de AL e AO no

meio de cultivo dos embriões induziram o aumento da síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e instigaram juntamente com o controle a maior produção de PGE2 , fator esse interessante para a manutenção da prenhez, apesar de não alterar a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$, carecendo de mais estudos para compreender os mecanismos pelos quais esses ácidos graxos demonstraram esse comportamento.

2.5 Conclusão

Em conclusão, a suplementação com CLA, AL, AO ou EPA + DHA, durante o cultivo *in vitro* de embriões (CIV) altera a síntese das prostaglandinas, no entanto não estimula a menor síntese de $\text{PGF2}\alpha$, a maior síntese de PGE2 , a maior razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$ e não promove maior produção embrionária no D7 e D9.

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; VOS, P. L. A. M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A. J.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biol. Reprod.**, [s.l.], v. 85, p. 62–9, 2011.
- ACHARD, F.; GILBERT, M.; BÉNISTANT, C.; SLAMA, S. B.; DEWITT, D. L.; SMITH, W. L.; LAGARDE, M. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids reduce PGH synthase 1 expression in bovine aortic endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 241, n. 2, p. 513-518, 1997.
- AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M. H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKalpha phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 93, p. 30–36, 2010.
- AROSH, J. A.; BANU, S. K.; MCCRACKEN, J. A. Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. **J Dairy Sci.**, [s.l.], v. 99, p. 5926-5940, 2016.
- BAZER, F. W.; VALLET, J. L.; ROBERTS, R. M.; SHARP, D. C.; THATCHER, W. W. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 76, n. 2, p. 841-850, 1986.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 56, p. 1451-1463, 2001.
- BURKE, J. M.; STAPLES, C. R.; RISCO, C. A.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Effect of ruminant grade menhaden fish meal on reproductive and productive performance of lactating dairy cows. **Journal Dairy Sci.**, v. 80, p. 3386–3398, 1997.
- CALDARI-TORRE, C.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.; GREENE, E.S.; BADINGA, L. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F2 production by bovine endometrial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.971–977, 2006.
- CHENG, Z.; ABAYASEKARA, D. R. E.; ELMES, M.; KIRKUP, S.; WATHES, D.C. Effect of oleic acid supplementation on prostaglandin production in maternal endometrial and fetal allantochorion cells isolated from late gestation ewes. **Pregnancy**, [s.l.], v. 36, p. 1011–1017, 2015.
- CHENG, Z.; ELMES, M.; ABAYASEKARA, D. R. E.; WATHES, D. C. Effects of conjugated linoleic acid on prostaglandins produced by cells isolated from

maternal intercotyledonary endometrium, fetal allantochorion and amnion in late pregnant ewes. **Biochim Biophys Acta**, [s.l.], v. 1633, p. 170–178, 2003.

EALY, A. D.; WOOLDRIDGE, L. K.; McCOSKI, S. R. Board invited review: post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle. **J. Anim. Sci.**, [s.l.], v. 97, p. 2555–2568, 2019.

FAYEZI, S.; LEROY, J. L.; NOVIN, M. G.; DARABI, M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development. **Zygote**, [s.l.], p. 1-13, 2018.

GILLER, K.; DREWS, B.; BERARD, J.; KIENBERGER, H.; SCHMICKE, M.; FRANK, J.; SPANIER, B.; DANIEL, H.; GEISLINGER, G.; ULBRICH, S. E. Bovine embryo elongation is altered due to maternal fatty acid supplementation. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 99, n. 3, p. 600–610, 2018.

GOFF, A. K. Embryonic signals and survival. **Reprod. Domest Anim.**, [s.l.], v. 37, p. 133-139, 2002.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Manole: São Paulo. p. 513, 2004.

LEROY, J.L.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction**, [s.l.], v. 130, p. 485-495, 2005.

LEVINE, L.; WORTH, N. Eicosapentaenoic acid: its effects on arachidonic acid metabolism by cells in culture. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 74, n. 3, p. 430-436, 1984.

LOURENÇO, V. C. **Efeitos da suplementação com ácido oleico e linoleico conjugado na secreção de prostaglandina E2 e F2α em células trofoblásticas bovinas**. 2022. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Dracena, 2022.

MAILLARD, V.; DESMARCHAIS, A.; DURCIN, M.; UZBEKOVA, S.; ELIS, S. Docosahexaenoic acid (DHA) effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–18, 2018.

MAREI, W. F.; WATHES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 81, n. 6, p. 1064-1072, 2009.

MATORRAS, R.; RUIZ, JI.; MENDOZA, R.; RUIZ, N.; SANJURJO, P.; RODRIGUEZ-ESCUADERO, F. J. Composição de ácidos graxos de oócitos humanos com falha na fertilização. **Reprodução Humana**, v. 13, 8 ed., p. 2227–2230, 1998.

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of

prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 69, p. 780-787, 2003.

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; THATCHER, W.W. Effect of polyunsaturated fatty acids on secretion of PGF2 α from bovine endometrial (BEND) cells stimulated with phorbol 12, 13 dibutyrate (PDBu). **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 326, 2001.

MATTOS, R.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of reproduction**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 38-45, 2000.

MEIER, S.; LEDGARD, A. M.; SATO, T. A.; PETERSON, A. J.; MITCHELL, M. D. Polyunsaturated fatty acids differentially alter PGF2 α and PGE2 release from bovine trophoblast and endometrial tissues during short-term culture. **Animal Reproduction Sciences**, [s.l.], v. 111, p. 353-360, 2009.

MOUSSAVI, A. H.; BUTLER, W.R.; BAUMAN, D.E.; GILBERT R.O. Effects of conjugated linoleic acids on prostaglandin secretion by bovine endometrial epithelial cells in vitro. **Am J Vet Res.**, v. 74, p. 491-8, 2013.

NIRINGIYUMUKIZA, J. D.; CAI, H.; XIANG, W. Prostaglandin E2 involvement in mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early implantation. **Reprod. Biol. Endocrinol**, [s.l.], v. 16, n. 43, 2018.

OSEIKRIA, M.; ELIS, S.; MAILLARD, V.; CORBIN, E.; UZBEKOVA, S. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. **Theriogenology**, [s. l.], v. 85, n. 9, p. 1625-1634, 2016.

PATE, J. L. Roadmap to pregnancy during the period of maternal recognition in the cow: changes within the corpus luteum associated with luteal rescue. **Theriogenology**, [s.l.], v. 150, p. 294-301, 2020.

REYNOLDS, L.P.; BOROWICZ, P.P.; CATON, J.S.; VONNAHME, K. A.; LUTHER, J. S.; BUCHANAN, D. S.; HAFEZ, S. A.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 355-365, 2010.

ROBINSON, R. S.; FRAY, M. D.; WATHES, D. C.; LAMMING, G. E.; MANN, G. E. In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations interferon tau during early pregnancy in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, [s.l.], v. 73, p. 470-474, 2006.

SCENNA, F.N.; EDWARDS J.L.; ROHRBACH, N.R.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M.; SCHRICK, F.N. Detrimental effects of prostaglandin F2 α on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 73, p. 215-226, 2004.

SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Conceptus signal signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, [s.l.], v. 82-83, p. 537-550, 2004b.

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

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal Dairy Sci.**, v. 81, p. 856–871, 1998.

STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BOLLWEIN, H.; WRENZYCKI, C. Dimethylsulfoxide and conjugated linoleic acids affect bovine embryo development *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 502–510, 2014.

TAVERNE, M. A. M.; BREUKELMAN, S. P.; PERENYI, Z.; DIELEMAN, S. J.; VOS, P.; JONKER, H. H.; DE RUIGH, L.; VAN WAGTENDONK- DE LEEUW, J. M. The monitoring of bovine pregnancies derived from transfer of *in vitro* produced embryos. **Reprod. Nutr. Dev.**, [s.l.], v. 42, p. 613–624, 2002.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 77, p. 190-201, 2007.

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P.; MIYAMOTO, A.; TAQUAHASHI, Y.; GABLER, C.; ACOSTA, T. J.; NISHIMURA, M.; KILLIAN, G.; SATO, K. *In vitro* regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. **J. Endocrinol**, [s.l.], v. 168, 117-130, 2001.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO 2

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO NA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA E NA BIOSÍNTESE DE PGF2 α E PGE2 EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Laura Chuba Machado Rolniche¹, Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado², Lucas de Oliveira Bezerra³, Adriano Felipe Mendes³, Amanda Guimarães⁴, Isabella Rio Feltrin³, Guilherme Pugliesi⁴, Vitor Rodrigues Gomes Mercadante⁵, Alan Ealy⁵, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira⁶, Claudia Maria Bertan Membrive^{1,3}

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros (SP 294), Km 651, Dracena, São Paulo, 17915-899, Brasil.

² University of Florida, Department of Animal Sciences, Bovine Embryo Laboratory, 2250 Shealy Drive, Gainesville, Florida, 32608, United States of America.

³ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências (IB), Rua Prof. Dr. Antônio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, 18618-689, Brasil.

⁴ Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Departamento de Reprodução Animal, Avenida Duque de Caxias Norte, 255, Pirassununga, São Paulo, 13635-900, Brasil.

⁵ Escola de Ciências Animais, Virginia Tech, Blacksburg, VA, 24061, EUA.

⁶ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Avenida Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis, São Paulo, 19806-900, Brasil.

RESUMO

Em rebanhos bovinos a mortalidade embrionária precoce (MEP) ocasionada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP), entre os dias 15 e 19 após a fecundação, constitui uma das maiores causas de falhas reprodutivas. Dentre as estratégias utilizadas para favorecer o RMP, inclui-se a redução da capacidade de síntese de PGF2 α e o aumento da produção de PGE2 pelo embrião. O ácido linoleico conjugado (CLA), especialmente cis-9, trans-11 (c9, t11) e o trans-10, cis-12 (t10, c12), reconhecidamente determina modificações na via metabólica da biossíntese de eicosanóides, incluindo as prostaglandinas. Portanto, objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de CLA (c-9,11 t-10,12) durante a maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV) (Experimento 1) ou somente durante a CIV (Experimento 2) na produção de blastocistos no D7 e na taxa de eclosão no D9, na síntese de PGE2 e PGF2 α e na abundância de transcritos envolvidos no RMP (IFN-t, AKR1B1, PTGS2 e PTGES). Para isso, ovários de fêmeas *Bos taurus indicus* foram obtidos em abatedouros, onde oócitos grau 1 e grau 2 com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células do *cumulus*, foram coletados e alocados aleatoriamente em placas de 4 poços contendo 500 μ L de meio MIV sem SFB e não suplementado com CLA (grupo controle) ou meio MIV suplementado com 50 μ M, 100 μ M ou 150 μ M de CLA. Após a MIV e fertilização *in vitro* (FIV; considerado o D0), as estruturas foram alocadas nas placas de 4 poços contendo 500 μ L de meio CIV acrescido de 2,5% de SFB, não suplementado ou suplementado com 50 μ M, 100 μ M ou 150 μ M de CLA por 9 dias. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para a análise da síntese de PGF2 α , PGE2, razão PGE/PGF2 α , e da abundância dos transcritos. No Experimento 1, a suplementação de CLA no momento da MIV e CIV não aumentou a taxa de produção de blastocistos no D7 ($P = 0,2462$). A concentração de PGE2 na MIV ($P = 0,3856$) e a razão PGE2/PGF2 α no CIV ($P = 0,1902$), em ambos os momentos não apresentaram diferenças. A razão PGE2/PGF2 α na MIV ($P = 0,0003$) houve redução da proporção, do mesmo modo que, PGE2 e PGF2 α no CIV ($P = 0,0034$; $<,0001$, respectivamente) tiveram redução nos grupos suplementados com 50, 100 e 150 μ M de CLA. A PGF2 α na MIV, na concentração de 100 μ M foi maior quando comparada com a concentração de 50 μ M, mas não diferiram da concentração de 150 μ M. No Experimento 2, quando a suplementação com CLA ocorreu somente na CIV, a taxa de blastocisto no D7 não diferiu entre os grupos ($P = 0,5847$). No D9, a taxa de blastocistos eclodidos na concentração de 50 μ M foi maior quando comparada a concentração de 150 μ M ($P = 0,0267$), mas não apresentou diferença entre o grupo tratado com 100 μ M de CLA e o controle. A síntese de PGE2, PGF2 α e a razão PGE2/PGF2 α tiveram redução em todas concentrações quando comparados ao controle ($P = 0,0046$; $0,0005$; $0,9087$, respectivamente). A abundância dos transcritos para IFN-t, AKR1B1, PTGES e PTGS2 submetidos as suplementações de CLA no CIV, não tiveram alterações em suas expressões. Em conclusão, a suplementação de CLA na MIV e CIV ou somente no CIV não promoveu aumento na produção embrionária no D7 e D9, aumentou a síntese de PGF2 α na MIV e reduziu a síntese de PGE2, PGF2 α e a razão PGE2/PGF2 α em embriões até o 9º dia do desenvolvimento sem alterar a abundância dos transcritos IFN-t, AKR1B1, PTGES e PTGS2.

Palavras chaves: Embriões. Maturação de oócitos *in vitro*. Prenhez. Prostaglandinas. Bovinos.

ABSTRACT

In bovine herds, early embryonic mortality (EEM) caused by failures in maternal recognition of pregnancy (MRP) between days 15 and 19 post-fertilization constitutes one of the major causes of reproductive failure. Among the strategies used to improve MRP are reducing the synthesis capacity of PGF2 α and increasing the production of PGE2 by the embryo. Conjugated linoleic acid (CLA), particularly cis-9, trans-11 (c9, t11) and trans-10, cis-12 (t10, c12), is known to cause modifications in the metabolic pathway of eicosanoid biosynthesis, including prostaglandins. Therefore, the objective was to determine the effects of supplementation with 50 μ M, 100 μ M, and 150 μ M of CLA (c-9,11 t-10,12) during in vitro maturation of oocytes (IVM) and in vitro culture of embryos (IVC) (Experiment 1) or only during IVC (Experiment 2) on blastocyst production on D7 and hatching rate on D9, PGE2 and PGF2 α synthesis, and the abundance of transcripts involved in MRP (IFN- τ , AKR1B1, PTGS2, and PTGES). For this, ovaries from *Bos taurus indicus* females were obtained from slaughterhouses, where grade 1 and grade 2 oocytes with homogeneous cytoplasm and multiple layers of cumulus cells were collected and randomly allocated into 4-well plates containing 500 μ L of IVM medium without FBS and not supplemented with CLA (control group) or IVM medium supplemented with 50 μ M, 100 μ M, or 150 μ M of CLA. After IVM and in vitro fertilization (IVF; considered D0), the structures were allocated into 4-well plates containing 500 μ L of IVC medium supplemented with 2.5% FBS, not supplemented or supplemented with 50 μ M, 100 μ M, or 150 μ M of CLA for 9 days. Analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the synthesis of PGF2 α , PGE2, the PGE2/PGF2 α ratio, and transcript abundance. In Experiment 1, CLA supplementation during IVM and IVC did not increase the blastocyst production rate on D7 ($P = 0.2462$). The concentration of PGE2 in IVM ($P = 0.3856$) and the PGE2/PGF2 α ratio in IVC ($P = 0.1902$) at both times showed no differences. The PGE2/PGF2 α ratio in IVM ($P = 0.0003$) showed a reduction in proportion, as did PGE2 and PGF2 α in IVC ($P = 0.0034$; <0.0001 , respectively) in the groups supplemented with 50, 100, and 150 μ M of CLA. PGF2 α in IVM at the concentration of 100 μ M was higher compared to the concentration of 50 μ M but did not differ from the concentration of 150 μ M. In Experiment 2, when CLA supplementation occurred only during IVC, the blastocyst rate on D7 did not differ among the groups ($P = 0.5847$). On D9, the hatching blastocyst rate at the concentration of 50 μ M was higher compared to the concentration of 150 μ M ($P = 0.0267$), but there was no difference between the group treated with 100 μ M of CLA and the control. The synthesis of PGE2, PGF2 α , and the PGE2/PGF2 α ratio were reduced at all concentrations compared to the control ($P = 0.0046$; 0.0005 ; 0.9087 , respectively). The abundance of transcripts for IFN- τ , AKR1B1, PTGES, and PTGS2 subjected to CLA supplementation in IVC showed no changes in their expressions. In conclusion, CLA supplementation during IVM and IVC or only during IVC did not promote increased embryonic production on D7 and D9, increased the synthesis of PGF2 α in IVM, and reduced the synthesis of PGE2, PGF2 α , and the PGE2/PGF2 α ratio in embryos up to the 9th day of development without altering the abundance of IFN- τ , AKR1B1, PTGES, and PTGS2 transcripts.

Keywords: Embryos. In vitro oocyte maturation. Pregnancy. Prostaglandins. Cattle.

3.1 Introdução

A mortalidade embrionária precoce (MEP), causada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP), leva ao insucesso no estabelecimento da prenhez. Esse evento acontece entre os dias 15 e 19 após a fecundação, designado de “período crítico” (Binelli *et al.*, 2001). No presente trabalho as avaliações foram realizadas em embriões com 9 dias de desenvolvimento (D9), pelo fato da produção de prostaglandina (PG) iniciar a partir do dia 3º de seu desenvolvimento. O sucesso do RMP depende da manutenção da funcionalidade do corpo lúteo (CL) e de elevadas concentrações plasmáticas de progesterona (P4) (Goff, 2002; Spencer *et al.*, 2007). A MEP é estabelecida principalmente pela incompetência do concepto em inibir da síntese pulsátil de prostaglandina F2 α (PGF2 α) endometrial e consequentemente a luteólise. Dessa forma, estratégias que possam favorecer o RMP tornam-se de fundamental interesse econômico. Tais estratégias usualmente objetivam reduzir a capacidade de síntese de PGF2 α e aumentar a síntese de PGE2 pelo endométrio materno e embrião e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo concepto, incluindo o aumento da capacidade de síntese de PGE2 e de interferon-t (IFN-t) pelo concepto.

O ácido linoleico conjugado (CLA), especialmente *cis*-9, *trans*-11 (*c9, t11*) e *trans*-10, *cis*-12 (*t10, c12*), determina modificações na via metabólica do ácido graxo poliinsaturado n-6 na biossíntese de eicosanóides, incluindo as PGs. É reconhecido que o uso de diferentes ácidos graxos, incluindo o CLA, pode alterar a proporção de PGF2 α e PGE2 produzidas em células endometriais, embriões e conceptos (Hwang *et al.*, 1988; Cheng *et al.*, 2003; Moussavi *et al.* 2013). A suplementação do meio de cultura de células epiteliais endometriais bovinas em concentrações maiores que 50 μ M de CLAs por 24 horas, diminuiu significativamente as concentrações de PGE2 e PGF2 α . O CLA *t10, c12* promoveu diminuição na produção de PGs de forma mais acentuada do que o CLA *c9, t11* (Moussavi *et al.* 2013). Estudos com células endometriais de ovelhas, com ou sem ocitocina ou lipopolissacarídeo, o CLA de forma dose-dependente suprimiu a síntese de PGF2 α e a concentração de 20 μ M de CLA aumentou a síntese de PGE2 (Cheng *et al.*, 2003). Adicionalmente, o estudo

revelou que o CLA aumentou a razão de PGE2/PGF2 α em células endometriais, destacando potencial do CLA na regulação das PGs. Lourenço (2022), constatou que a suplementação do meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μ M de CLA (uma mistura de ácido *cis*-e *trans*-9,11 e -10,12-octadecadienoico) promoveu redução da síntese de PGF2 α com 24, 48 e 72 horas de cultivo, e o aumento na síntese de PGE2 no período de 48 e 72 horas foi observado, bem como o aumento da razão PGE2/PGF2 α em todos os grupos suplementados. Indicando um efeito promissor da suplementação do CLA no aumento da síntese de PGE2 e redução de da PGF2 α .

Reportou-se que a suplementação lipídica com AGPI favorece o desenvolvimento embrionário (Fouladi-Nashta *et al.*, 2007) e melhorar qualidade dos embriões (Ryan *et al.*, 1992; Thangavelu *et al.*, 2007). O CLA induz a incorporação ácido linoleico (AL) e a produção de triacilgliceróis e fosfolipídios, melhorando o perfil lipídico das membranas citoplasmáticas e celulares dos embriões (Tominaga *et al.*, 2000). O AL também foi associado a propriedades antioxidantes, além de melhorar o perfil lipídico dos embriões bovinos inclusive para a criopreservação (Karashin *et al.*, 2015). Portanto, a suplementação do meio de cultura com AL e CLA, pode melhorar a qualidade do embrião. Assim, objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de CLA, durante a MIV e CIV ou somente no CIV, na produção *in vitro* de embriões bovinos sobre a taxa de produção de blastocisto no D7, taxa de eclosão no D9, síntese de PGE2, PGF2 α e na expressão de transcritos *PTGS2*, *AKR1B1*, *PTGES* e *IFN-t*, envolvidos na síntese de PGs e no RMP.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Local do experimento

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Endométrio e Embrião (LIFE), sediado no Departamento de Produção Animal (DPA), da Faculdade de Ciência e Tecnologia Animal (FCAT), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em Dracena, São Paulo, Brasil. As análises por ELISA foram

realizadas no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), em Pirassununga, São Paulo, Brasil. Todas as práticas foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP de Dracena (Protocolo nº 07/2021 – CEUA), estado de São Paulo, Brasil.

3.2.2 Recuperação dos complexos *cumulus*-oócito e seleção

Ovários de fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) foram obtidos de abatedouro e imediatamente, após o abate, transportados ao laboratório imersos em uma solução salina (0,9% NaCl) a 36°C. Folículos com o diâmetro de 2 a 8 mm foram aspirados com o uso de seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 18-G. O fluido folicular obtido foi depositado em um tubo cônico estéril de 15 mL que foi mantido a 37,5°C até que um *pellet* fosse formado no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi transferido para placas de poliestireno 100 x 20 mm de diâmetro (Corning Incorporated, NY, USA), contendo meio de lavagem. Utilizando um estereomicroscópio (Nikon SMZ800, Tokyo, Japão), os complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram avaliados e classificados em graus I, II ou III; de acordo com as características morfológicas (Scenna *et al.*, 2004). Foram utilizados somente COCs com citoplasma homogêneo e circundado por múltiplas camadas de células do *cumulus* (graus I e II).

3.2.3 Preparo da solução estoque de CLA

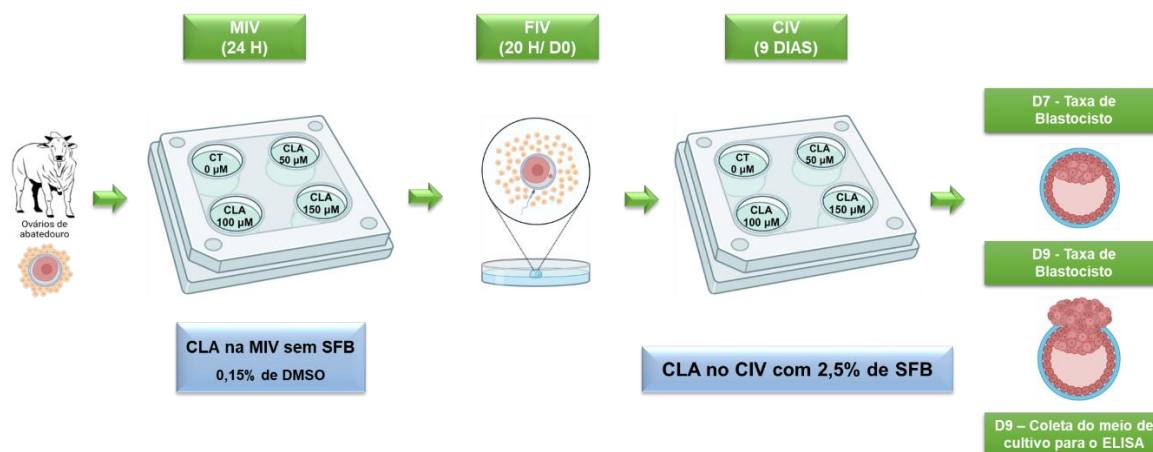
Uma solução estoque de CLA (Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. O5507) foi preparada em Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma #D2650), na concentração inicial de 100 mM/mL, e armazenada a - 20°C. Imediatamente antes do uso, a solução foi diluída em meio MIV ou CIV para atingir as concentrações de 50 µM, 100 µM e 150 µM. Todos os meios contendo o tratamento foram balanceados para conterem a mesma concentração de DMSO de 0,15%.

3.2.4 Delineamento experimental

Oócitos foram divididos aleatoriamente e equitativamente para compor os diferentes grupos experimentais. Utilizou-se um poço da placa para cada tratamento, contendo número igual de oócitos entre tratamentos em cada repetição, variando entre 11 a 28 oócitos entre repetições. A seleção e distribuição dos oócitos entre os grupos experimentais foi ao acaso, evitando efeito de seleção. Conforme ilustrado na Figura 15, no Experimento 1 a suplementação com 0, 50, 100 e 150 μM de CLA foi realizada durante a MIV e CIV, com total de 9 repetições. Conforme ilustrado na Figura 16, no Experimento 2, a suplementação com 0, 50, 100 e 150 μM de CLA foi realizada apenas no CIV, no total de 9 repetições experimentais. Ao final do Experimento 1 foram avaliados um total de 593 COCs, sendo 148 ou 149 COCs por grupo experimental quando o tratamento com CLA foi adicionado na MIV e no CIV. No Experimento 2, foram avaliados um total de 604 COCs, sendo de 150 a 152 COCs por grupo experimental quando o tratamento com CLA foi adicionado somente na CIV. O SFB por ser um produto biológico bastante heterogêneo em sua composição, em função da empresa de produção, código e partida, pode afetar os ensaios, dessa forma, no referido estudo o SFB foi totalmente retirado do meio MIV, porém mantido em baixa concentração (2,5%) no meio CIV, considerando que sua total retirada foi previamente testada e resultou em baixa taxa de blastocistos no D9 após a fertilização. É importante ressaltar que como solução estoque de CLA foi preparada em DMSO todos os meios foram balanceados para conterem a mesma concentração de DMSO (0,15%). Os grupos experimentais foram para MIV e CIV ou somente no CIV: Controle 0 μM - tratamento sem CLA e com 0,15% de DMSO, na MIV e 2,5% de SFB no CIV; CLA 50 μM - tratamento com CLA a 50 μM e 0,15% de DMSO na MIV e 2,5% de SFB no CIV; CLA 100 μM - tratamento com CLA a 100 μM e 0,15% de DMSO na MIV e 2,5% de SFB no CIV; e CLA 150 μM - tratamento com CLA a 150 μM e 0,15% de DMSO na MIV e 2,5% de SFB no CIV. A produção embrionária foi avaliada no D7 e D9 (D0 = dia da fertilização). No D7, avaliou-se os blastocistos totais e por categoria de blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e taxa de blastocisto geral. No D9, avaliou-se os blastocistos

totais, blastocistos por categoria e taxa de eclosão. Para a RT-qPCR, foram utilizados *pools* de três blastocistos eclodidos coletados no D9.

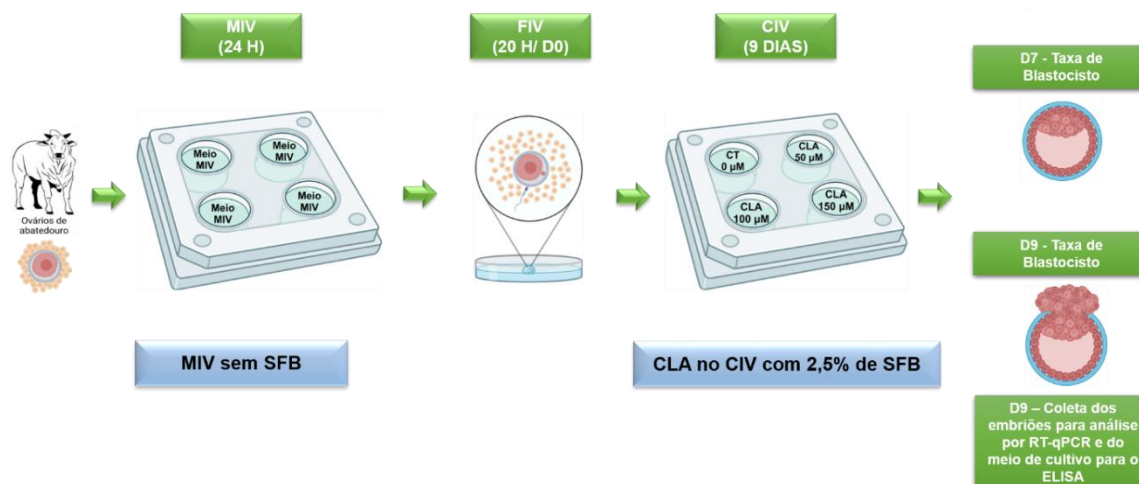
Figura 15 - Representação esquemática dos tratamentos com CLA realizados na maturação e cultivo *in vitro* de embriões bovinos (Experimento 1).



Fonte: Elaborado pela autora.

Oócitos foram divididos aleatoriamente e equitativamente para compor um dos seguintes grupos de tratamento com CLA: tratamento com CLA na maturação *in vitro* (MIV) e no cultivo *in vitro* (CIV). A MIV de oócitos e o CIV dos embriões foram realizados em placas de 4 poços contendo 500 µL de meio de acordo com cada tratamento. A fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada em sistema de gotas, por 20 horas. Utilizou-se um poço por tratamento, com número semelhante de oócitos (11 a 28 oócitos) entre tratamentos, em cada repetição. Foram realizadas 9 repetições experimentais. Ao término da MIV (24 horas) e do CIV (dia 9 pós-fertilização) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. A produção embrionária foi avaliada no D7 e D9 (D0 = dia da fertilização).

Figura 16 - Representação esquemática dos tratamentos com CLA realizados somente no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (Experimento 2).



Fonte: Elaborado pela autora.

Oócitos foram divididos aleatoriamente e equitativamente para compor um dos seguintes grupos de tratamento com CLA: tratamento com CLA somente no cultivo *in vitro* (CIV). O CIV dos embriões foi realizado em placas de 4 poços contendo 500 µL de meio de acordo com cada tratamento. A fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada em sistema de gotas, por 20 horas. Utilizou-se um poço por tratamento, com número semelhante de oócitos (11 a 28 oócitos) entre tratamentos, em cada repetição. Foram realizadas 9 repetições experimentais. Ao término do CIV (dia 9 pós-fertilização) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA e os embriões foram congelados em nitrogênio líquido para posterior análise por RT-qPCR. A produção embrionária foi avaliada no D7 e D9 (D0 = dia da fertilização).

3.2.5 Maturação *in vitro* (MIV)

Os COCs selecionados foram lavados três vezes em gotas de 50 µL de meio de lavagem [Gibco™ Medium 199 - Gibco 31100035 com bicarbonato, contendo albumina sérica bovina (5 mg/mL), piruvato (2 µl/mL de solução a 100 mM), amicacina (75 µl/mL)] e três vezes em gotas de 50 µL de meio de maturação. Posteriormente, grupos contendo um número igual de COCs foram alocados aleatoriamente em placas de 4 poços (Nunc IVF multidish, Ref. 179830) contendo 500 µL de meio MIV (Gibco™ Medium 199) com bicarbonato, contendo albumina sérica bovina (5 mg/mL), piruvato (2 µl/mL de solução a 100 mM), amicacina (75 µl/mL), hormônio folículo estimulante (20 µl/mL) e hormônio luteinizante (2 µl/mL) suplementado ou não com 50 µM, 100 µM ou 150 µM de

CLA. A MIV foi realizada em incubadora com atmosfera umidificada a 38,5°C e 5% de CO₂, por 24 horas.

3.2.6 Fertilização *in vitro* (FIV)

Foi utilizado sêmen criopreservado de um único touro Nelore e única partida (Rai da MN, CRV Lagoa, Partida 0601211OEI), sendo sua fertilidade *in vitro* previamente comprovada. A palheta de sêmen foi descongelada a 36°C por 30 segundos e o sêmen foi avaliado quanto a qualidade espermática. Ao sêmen foi adicionado o gradiente composto por meio Meio FIV BotuFIV® Sperm Select (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) com partículas de sílica coloidal. Em seguida, esta mistura foi centrifugada a 5000 x g, durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sedimento contendo os espermatozoides foi avaliado em microscópio óptico (Zeiss, Axiostar plus) quanto a motilidade e concentração espermática em câmara de Neubauer. Após a MIV, os COCs referentes a cada grupo experimental foram separadamente lavados três vezes em gotas de 50 µL de meio FIV [TL Stock acrescido de albumina sérica bovina (6mg/mL), piruvato (2 µl/mL de solução a 100 mM), gentamicina (75 µg/mL), heparina (3 µg/mL) e solução de penicilamina, hipotaurina e epinefrina (44 µl/mL)]. Posteriormente, os COCs foram colocados em gotas de 100 µL de meio FIV dispostas em placas de petri de 35 mm cobertas com óleo siliconado para receberem o sêmen diluído. O sêmen foi diluído para que a concentração final fosse ajustada para 2×10^6 espermatozoides viáveis/mL. A FIV foi realizada e em seguida as placas foram levadas para a incubadora com atmosfera umidificada a 38,5°C e 5% de CO₂, onde permaneceram por 20 horas. Todos os meios utilizados foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil).

3.2.7 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a FIV, os prováveis zigotos foram desnudados com pipetagens seriadas nas gotas de 90 µL e, posteriormente, lavados três vezes em gotas de 50 µL de meio lavagem (Gibco™ Medium 199 - Gibco 31100035) com

bicarbonato, contendo albumina sérica bovina (5mg/ml), piruvato (2 µl/mL de solução a 100 mM), amicacina (75 ul/mL)], para completa remoção das células do *cumulus*, e três vezes em gotas de 50 µL de meio CIV. Após esse processo, as estruturas foram alocadas nas placas de 4 poços contendo 500 µL de meio CIV [fluido sintético de oviduto, acrescido de soro fetal bovino (2,5%) e piruvato (2 µl/mL de solução a 100 mM)] suplementado ou não com 50 µM, 100 µM ou 150 µM de CLA, de acordo com cada tratamento. O CIV foi realizado em incubadora com alta tensão de oxigênio com atmosfera umidificada a 38,5°C e 5% de CO₂, por 9 dias após a FIV. A taxa de clivagem foi avaliada no dia 3 (D3) do CIV, sendo o dia da FIV considerado o D0, e o desenvolvimento embrionário foi avaliado nos dias 7 (D7) e nove (D9) quando os blastocistos foram classificados morfológicamente em blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido (Rios-Esteves; Resh, 2013).

3.2.8 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para PGF2 α e PGE2

Após 24 horas da MIV (término da MIV) e no D9 do CIV (término do CIV), os meios de cultura de cada tratamento foram coletados e centrifugados a 12.000 x g, durante 2 minutos para a remoção dos detritos celulares. O sobrenadante foi armazenado a - 20°C até a realização do ELISA. As concentrações de PGE2 e PGF2 α foram mensuradas a partir do meio de cultura utilizando os kits *Prostaglandin E2 ELISA kit – Monoclonal*, N° 514010 (*Cayman Chemical*) e *Prostaglandin F2 α ELISA kit*, N° 516011 (*Cayman Chemical*) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.9 Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)

No experimento 1, onde o tratamento com CLA foi adicionado na MIV e no CIV não houve produção suficiente de blastocistos que possibilitasse a formação de *pools*, de cada grupo experimental, para extração de RNA. No Experimento 2, para a RT-qPCR foram utilizados pools blastocistos eclodidos (BE) no D9. O grupo experimental contendo o tratamento de 150 µM de CLA no

CIV também não produziu quantidade suficiente de blastocistos para extração de RNA. Dessa forma, o RNA total foi extraído de 3 *pools* de 3 BE em cada *pool* de 3 grupos experimentais (Controle 0 μ M, CLA 50 μ M, e CLA 100 μ M), usando *PicoPure RNA Isolation Kit* (ThermoFisher Scientific KIT0204/KIT0214), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza das amostras de RNA total extraídas foram determinadas usando espectrofotometria (*NanoVue*; GE Healthcare) e os valores das razões de absorbância (A260/280) variaram entre 1,7 e 2,0. Amostras de RNA (100 ng) de embriões foram tratadas com DNase I (*Invitrogen, DNase I Amplification Grade*, Ref. 18068-015, CA, USA) e reações de transcrição reversa de cDNA (*Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, Ref. 4368814, Foster City, CA). A RT-qPCR foi realizada utilizando corante SYBR Green (Applied Biosystems Inc.) para avaliar os transcritos descritos *IFN- τ* , *AKR1B1*, *PTGES* e *PTGS2*. As reações de RT-qPCR e a detecção de fluorescência foram realizadas no termociclador *StepOne Plus Real-Time PCR System* programado para iniciar com estágio de espera (95°C por 10 minutos), seguido por 40 ciclos compostos por fase de desnaturação (95°C por 15 segundos), anelamento e extensão (60°C por 1 minuto). A curva de dissociação (*melting*) foi obtida imediatamente após a amplificação permanecendo a 95°C por 15 minutos, passando a 60°C por 1 minuto e voltando a 95°C por 15 minutos. Para cada gene, a concentração de primers na reação (150 nM, 300 nM, 450 nM ou 600 nM) foi testada – usando um *pool* de amostras de cDNA diluído em 1:20 – e selecionada de acordo com a eficiência de amplificação, falta de amplificação no controle negativo e análise da curva de *melting*. Depois de escolhida a concentração do primer, foi feita uma curva padrão composta por cinco pontos de *pool* de cDNA diluído em série de 1:5 a 1:80. Cada ponto da curva foi testado em duplicata. A eficiência de amplificação foi calculada pela equação: $Eficiência = -1 + 10^{(-1/inclinação)}$. Foram consideradas validadas as curvas padrão com eficiência entre 70 e 100% e coeficiente de determinação da equação de regressão (R^2) $\geq 0,93$. Os genes *ACTB* e *RPS9* foram validados e utilizados como *housekeeping* após determinação da estabilidade de expressão por meio do software *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002). A média geométrica da abundância destas duas referências foi usada para a normalização da abundância dos genes alvo. Os primers dos genes alvo *IFN- τ* , *AKR1B1*, *PTGES* e *PTGS2* e dos 2 genes

referência ACTB e RPS9, validados e analisados neste experimento, estão apresentados na Tabela 2. Os dados de validação dos primers e da concentração das amostras para os genes alvo e referência estão descritos, respectivamente, na Tabela 3.

Tabela 2 -Símbolo dos genes alvo e genes referência, sequência de pares de primer *forward* e *reverse*, número de acesso no GenBank e a referência utilizada para gerar os primers.

Gene alvo	Sequência do Primer	Número GenBank	Referência
PTGES	Forward: GCTGCGGAAGAAGGCTTTTGCC	NM_174443.2	PrimerQuest
	Reverse: GGGCTCTGAGGCAGCGTTCC		
	Forward: ATACAAGCCGGCGGTTAAC		
AKR1B1	Reverse: TGTCTGCAATCGCTTTGATC	NM_001012519	Ulbrich <i>et al.</i> (2009)
	Forward: CATCTTCCCATGGCCTTCG		
	Reverse: TCATCTCAAAGTGAGTTCAG		
IFN- γ	Forward: CCAGAGCTCTTCCTCCTGTG	AF238613	Bai <i>et al.</i> (2011)
	Reverse: GGCAAAGAATGCAAACATCA		
	Forward: GAGCTGGGTTTGTGCAAA		
PTGS2	Reverse: GGTCGAGGCGGGACTTCT	NM_174445.2	PrimerQuest
	Forward: GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA		
	Reverse: TCGTCCCAGTTGGTGACGAT		
*RPS9	Forward: GAGCTGGGTTTGTGCAAA	DT860044	Hughes <i>et al.</i> (2017)
*ACTB	Reverse: GGTCGAGGCGGGACTTCT		
	Forward: GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA		
	Reverse: TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	NM_173979.3	Bettegowda <i>et al.</i> (2006)

Fonte: Elaborado pela autora.

*Genes de referência.

Tabela 3 - Dados de validação dos primers e da concentração das amostras dos genes alvo e de referência para RT-qPCR.

Gene	PTGES	AKR1B1	IFN- τ	PTGS2	*RPS9	*ACTB
Concentração do primer (nM)	150	300	300	300	300	300
Diluição da amostra	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
Eficiência de amplificação (%)	110,00	109,05	111,00	96,50	103,70	99,42
Coeficiente de determinação (R^2)	0,84	0,95	0,99	0,92	0,94	0,99

Fonte: Elaborado pela autora.

*Genes de referência.

3.2.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) considerando o poço da placa de tratamentos como unidade experimental. A suposição de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas para cada modelo por meio do teste de Shapiro-Wilk. Considerou-se cada poço como unidade experimental. Quando tais premissas não foram atendidas, transformações logarítmicas foram aplicadas nos dados brutos. Para as respostas de PGF2 α e PGE2, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) considerando o efeito principal do grupo de tratamento e o efeito aleatório das réplicas de cultura. Os dados de abundância de transcritos foram analisados por ANOVA utilizando o efeito fixo do tratamento. Os resultados estão apresentados com médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para todas as análises, significância foi considerada quando $P \leq 0,05$.

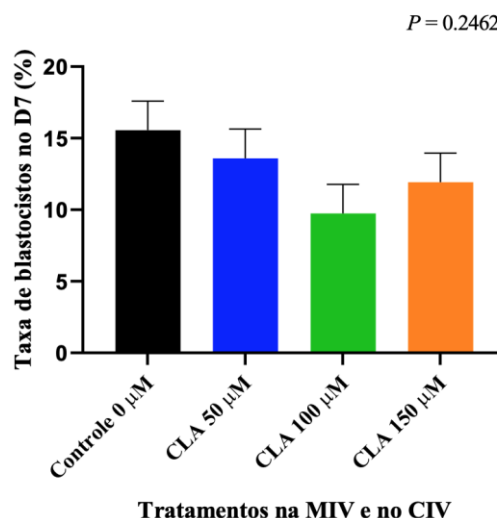
3.3 Resultados

3.3.1 Experimento 1 (Tratamentos na MIV e CIV)

3.3.1.1 Efeito na produção de embriões o D7

Conforme representado na Figura 17, a taxa de blastocisto no D7 após a fertilização *in vitro* não diferiu ($P = 0,2462$) entre o grupo controle e os grupos suplementados com 50, 100 ou 150 μ M de CLA.

Figura 17 - Experimento 1 - Efeito da suplementação com 50, 100 e 150 μ M de CLA durante a MIV e CIV na da taxa de blastocistos no D7.

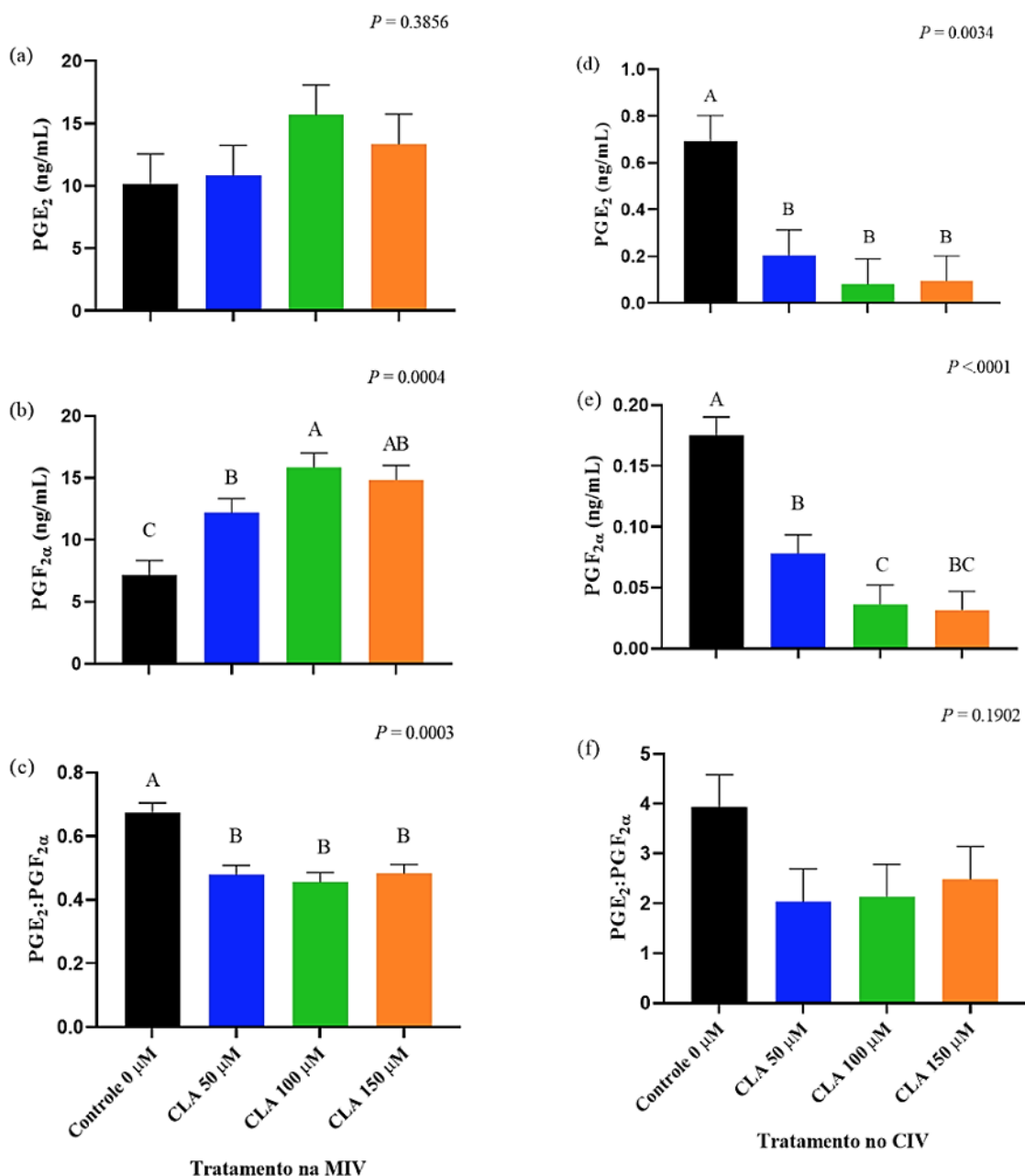


Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

3.3.1.2 Efeito na síntese de PGE2, PGF2 α e razão PGE2/PGF2 α

Conforme representado na Figura 18, ao final da MIV não foi observado efeito do CLA na síntese de PGE2 ($P = 0,3856$). O CLA aumentou a síntese de PGF2 α em todas as concentrações quando comparadas ao grupo controle ($P = 0,0004$) e reduziu a razão PGE2/PGF2 α para todas concentrações quando comparadas ao grupo controle ($P = 0,0003$). A concentração de PGF2 α ao término da MIV foi maior no grupo suplementado com 100 μ M de CLA comparado ao grupo suplementado com 50 μ M de CLA. A concentração de PGE2 no CIV foi menor em todas as concentrações de CLA comparado ao grupo controle ($P = 0,0034$). A concentração de PGF2 α no CIV foi menor nos grupos suplementados com CLA, onde a concentração de 100 μ M foi menor em relação ao grupo suplementado com 50 μ M ($P < 0,0001$). Em relação a razão PGE2/PGF2 α no CIV, não apresentou diferença entre os grupos suplementados com CLA e o grupo controle ($P = 0,1902$).

Figura 18 - Experimento 1 - Efeitos da suplementação com 50, 100 e 150 μ M de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) em meio de maturação (MIV) e de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro* na síntese de PGE₂, PGF₂ α e razão PGE₂/PGF₂ α .



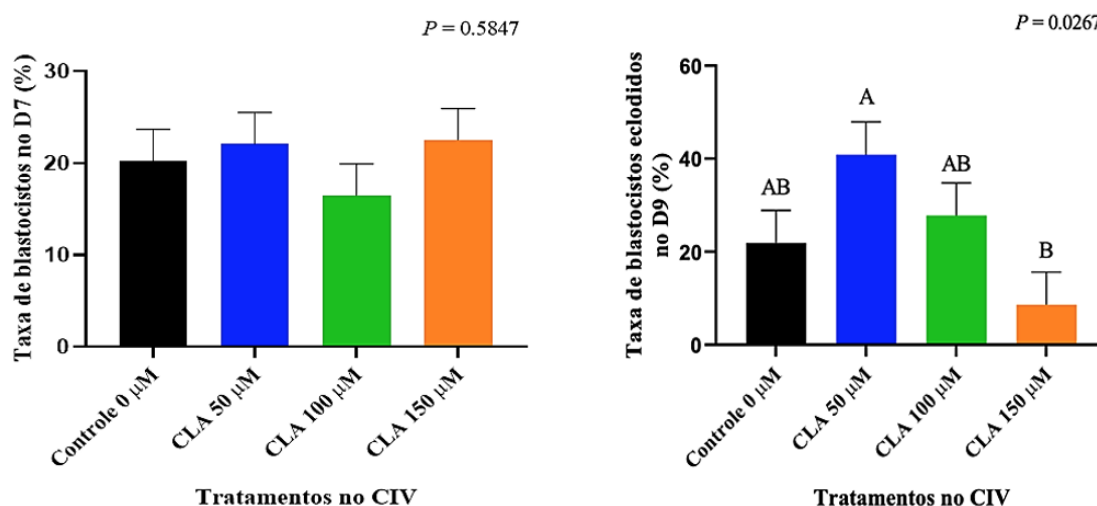
Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM); ^{A, B, C} Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

3.3.2 Experimento 2 (Tratamentos somente no CIV)

3.3.2.1 Efeito na produção de embriões o D7 e D9

Conforme representado na Figura 19, a taxa de blastocisto no D7 após a fertilização *in vitro* não diferiu ($P = 0,5847$) entre o grupo controle ($20,28 \pm 3,39$) e os grupos que foram suplementados com 50, 100 ou 150 μM de CLA ($22,14$ vs. $16,52$ vs. $22,56 \pm 3,39$; respectivamente). Porém, a taxa de blastocistos eclodidos no D9 após a fertilização *in vitro* foi maior ($P = 0,0267$) para o grupo suplementado com 50 μM de CLA ($40,90 \pm 7,00$) em comparação com 150 μM de CLA ($8,64 \pm 7,00$).

Figura 19 - Experimento 2 - Efeitos da suplementação com 50, 100 e 150 μM de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sobre a porcentagem da taxa de blastocistos no D7 e taxa de blastocistos eclodidos no D9.

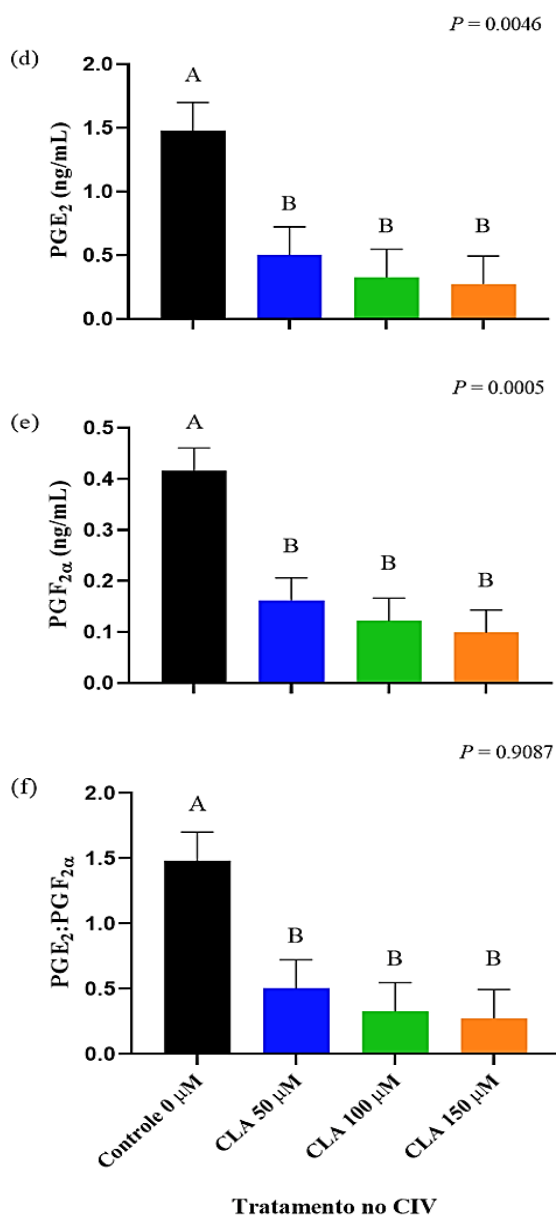


Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM); ^{A,B} Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

3.3.2.2 Efeito na síntese de PGE2, PGF2 α e razão PGE2/PGF2 α

Conforme representado na Figura 20, quando o CLA foi utilizado somente na CIV, as concentrações de PGE2 ($P = 0,0046$), PGF2 α ($P = 0,0005$) e a razão PGE2/PGF2 α ($P = 0,9087$) foram menores em todos os grupos suplementados com CLA quando comparados ao grupo controle, independente da concentração de CLA utilizada.

Figura 20 - Experimento 2 - Efeitos da suplementação com 50, 100 e 150 μM de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) em meio cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro* na síntese de PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ e razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$.



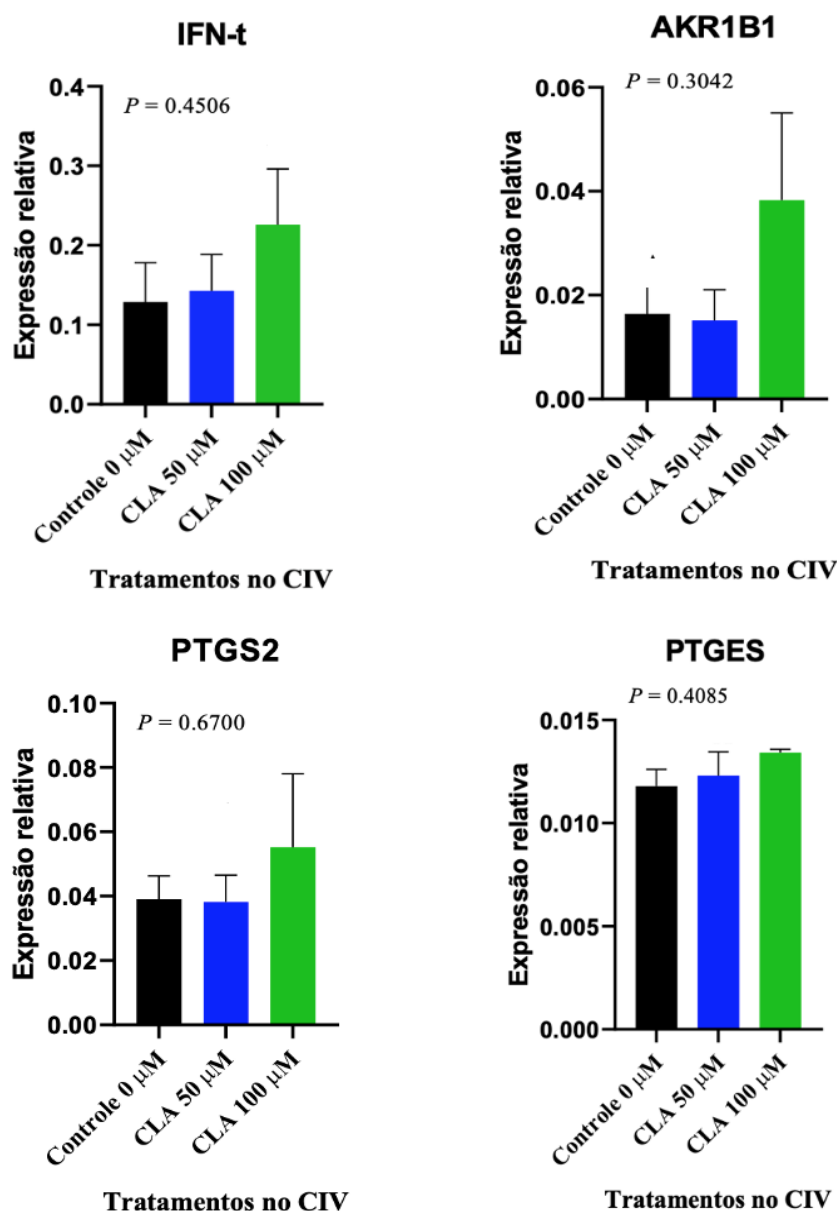
Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM); ^{A,B} Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

3.3.2.3 Efeito na expressão de *IFN- γ* , *AKR1B1*, *PTGES* e *PTGS2*

Conforme representado na Figura 21, a suplementação com 50 e 100 μM de CLA no meio de CIV de embriões bovinos produzidos *in vitro* com CLA não alterou ($P \leq 0,05$) a abundância dos transcritos para *IFN- γ* , *AKR1B1*, *PTGES* e

PTGS2. Uma vez que, os grupos experimentais suplementados com 150 μM de CLA não produziram embriões suficientes para tal análise.

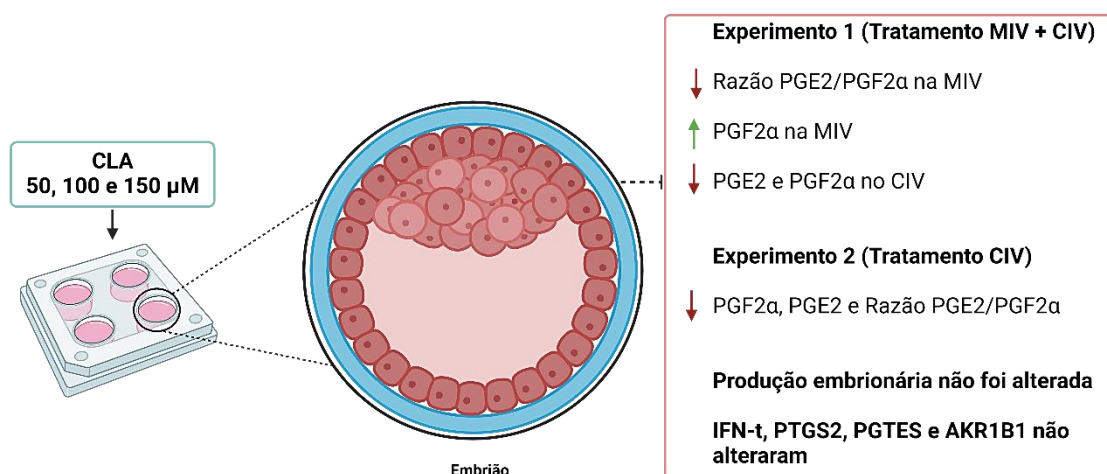
Figura 21 - Experimento 2 - Efeitos da suplementação com 50, 100 μM de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) em embriões bovinos produzidos *in vitro* na expressão de transcritos para IFN- τ , AKR1B1, *PTGS2* e *PTGES*.



Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

Os principais resultados estão sumarizados na Figura 22.

Figura 22 - Sumarização dos resultados apresentados da suplementação com 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de CLA nos meios de cultura durante a MIV e CIV ou somente no CIV de embriões bovinos produzidos *in vitro*.



Fonte: elaborado pela autora.

O experimento 1 proporcionou uma diminuição sobre a razão da PGE2/PGF2 α na MIV e ocorreu uma diminuição na síntese de PGF2 α , contudo ocorreu no CIV uma diminuição na síntese de PGE2 e PGF2 α . O experimento 2 reduziu a síntese e a razão de PGE2 e PGF2 α . Em ambos experimentos a produção embrionária não foi alterada. No experimento 2, não houve diferença entre os tratamentos na expressão de transcritos envolvidos na síntese de PGF e PGE, assim com do Reconhecimento Materno da Prenhez (RMP).

3.4 Discussão

No presente trabalho foi realizada a suplementação de 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M de CLA (cis- e trans-9,11- e -10,12) na produção *in vitro* de embriões bovinos sobre a síntese de PGF2 α e PGE2 e a expressão de transcritos envolvidos na dinâmica do RMP. A suplementação com CLA nas concentrações de 50 μ M, 100 μ M e 150 μ M durante a MIV e CIV, não promoveu aumento ($P = 0,2462$) na taxa de produção de blastocistos no D7, ainda a taxa de blastocistos no D7 não apresentou diferença ($P = 0,5847$) entre o grupo controle quando as suplementações foram realizadas somente na CIV. No entanto, a taxa de blastocistos eclodidos no D9 foi maior ($P = 0,0267$) no grupo suplementado com 50 μ M de CLA em comparação ao grupo suplementado com 150 μ M, embora ambos não tenham diferido do grupo controle. Sendo assim, esses resultados indicam que a suplementação do meio de cultivo de embriões bovinos

produzidos *in vitro* com doses de CLA maiores que 100 μ M podem não ser benéficas ao desenvolvimento embrionário. Portanto, a suplementação com baixas doses de CLA (≤ 50 μ M) pode ser favorável ao desenvolvimento do embrião após 7 dias de CIV. Absalón-Medina *et al.* (2014), observaram que a suplementação de CLA *t* 10, *c* 12 na concentração de 15 e 100 μ M aumentou a taxa de clivagem, contudo ocasionou diminuição na taxa de blastocisto de 5 a 20% respectivamente de maneira dose-dependente. Ainda verificou que, independentemente do isômero de CLA inserido em altas doses, aumentou a produção de P4 no meio de maturação, apesar disso, reduziu a taxa de desenvolvimento embrionário. Hughes *et al.* (2011), constataram que longa suplementação com *isômeros t* 10, *c* 12 ou *c* 9, *t* 11 em concentrações de 25 a 200 μ M levou ao prejuízo no desenvolvimento embrionário, como também na presença de outros AGPI obteve produção de embriões de baixa qualidade.

Em relação a produção de PGs quando as suplementações dos meios foram realizadas em dois momentos, MIV e CIV (experimento 1), pode-se observar que a concentração de PGE2 na MIV e a razão PGE2/PGF2 α no CIV não apresentou diferença ($P = 0,3856$; $P = 0,1902$, respectivamente) entre os grupos. Em contrapartida, a razão PGE2/PGF2 α na MIV, e a síntese de PGE2 e PGF2 α no CIV ocasionaram redução da produção das prostaglandinas. Indicando que a suplementação pode ter efeitos inibitórios sobre a síntese de PGE2 e PGF2 α , o que pode impactar negativamente o desenvolvimento embrionário e a manutenção da prenhez. Contudo, a concentração de PGF2 α na MIV aumentou no grupo suplementado com CLA a 100 μ M em relação ao grupo suplementado com 50 μ M. Esse resultado é consistente com estudos anteriores que mostram que diferentes concentrações de ácidos graxos podem ter efeitos variados na produção de prostaglandinas. Cheng *et al.* (2003) relataram que a suplementação com CLA em células endometriais ovinas aumentou a razão PGE2/PGF2 α , sugerindo que concentrações mais elevadas de CLA podem promover a síntese de PGF2 α .

Reconhecidamente diferentes ácidos graxos podem modular a biossíntese de PGE2 e PGF2 α , incluindo o CLA, produzido por células endometriais e trofoblásticas de embriões e conceptos (Hwang *et al.*, 1988; Cheng *et al.*, 2003; Moussavi *et al.* 2013). Neste estudo, essa modulação foi

observada quando as suplementações ocorreram somente no momento do CIV (experimento 2), onde as concentrações de PGE2, PGF2 α e a razão PGE2/PGF2 α sofreram redução ($P = 0,0046$; $P = 0,0005$; $P = 0,9087$, respectivamente) em todos os grupos experimentais. Segundo Cheng *et al.* (2003), células epiteliais endometriais bovinas que foram submetidas ao cultivo com CLA em concentrações maiores que 50 μM por 24 horas, tiveram diminuição significativa das concentrações de PGE2 e PGF2 α , sendo mais acentuada por CLA *t10*, *c12*, como evidenciado em nosso estudo, em embriões como modelo biológico. Ainda os mesmos autores, relataram que em ovelhas com prenhez tardia, com ou sem ocitocina ou lipopolissacarideo, a produção de PGF2 α foi reduzida de maneira dose-dependente, ao passo que a PGE2 foi aumentada quando foram utilizadas concentrações baixas de CLA (20 μM) e em células endometriais o CLA aumentou a razão de PGE2/PGF2 α . No presente estudo, as suplementações de CLA resultaram em uma modulação diferente, possivelmente devido às diferentes condições experimentais e ao modelo biológico utilizado.

A abundância dos transcritos para *IFN-t*, *AKR1B1*, *PTGES* e *PTGS2* envolvidos na dinâmica do reconhecimento materno de embriões bovinos submetidos as suplementações de CLA no CIV, não se observou alterações nas suas expressões. Do mesmo modo, Ricciotti; Fitzgerald, (2011) observaram que o CLA não promoveu alterações sobre a enzima AKR1B1, envolvida nos processos de metabolismo de ácidos graxos e na regulação da produção de prostaglandinas PGF2 α , assim como nas enzimas PTGES e PTGS2 que implicam na síntese de prostaglandinas, desempenhando papel importante sobre a regulação da prenhez, modulando respostas inflamatórias e a manutenção do CL.

Maldonado *et al.* (2023) verificou que adição de CLA promove efeito sobre a expressão de transcritos PTGES2, PTGER4 e MMP9, diminuindo a atividade de MMP9, cessando a produção de mRNA, regulando negativamente a expressão de MMP9, conferindo essa ação a PTGES2 e PTGER4. Já em nossos achados, o CLA não apresentou efeito sobre a abundância dos transcritos avaliados. Em síntese, os isômeros de CLA exercem diversos efeitos sobre as vias metabólicas e a expressão gênica, com implicações significativas na regulação de processos fisiológicos, como a síntese de prostaglandinas e a

manutenção do CL durante a prenhez. O entendimento mais detalhado desses mecanismos permite o desenvolvimento de novas estratégias que visam maior sucesso do RMP e estabelecimento da prenhez.

Ácidos graxos poliinsaturados quando adicionados ao meio de cultivo de células, podem exercer efeitos diferentes sobre a síntese das PGs de acordo com o metabolismo celular, tecido, concentração e ácido graxo. O CLA pode diminuir a síntese de eicosanoides por competição por dessaturação e sistemas enzimáticos de alongamento de cadeia. Todavia, enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase são inibidas por metabolitos do CLA (Moussavi *et al.*, 2013). Em células trofoblásticas, o acúmulo de CLA compete com AA pelas enzimas COX e a incorporação de fosfolipídios na membrana celular, promovendo a modulação da síntese de prostaglandinas e a expressão de genes associados a biossíntese dos eicosanoides PTGES2 e PTGER4 (Maldonado *et al.*, 2023).

Como descrito anteriormente, diversos estudos indicam que o CLA aumenta a concentração da razão PGE2/PGF2 α em células endometriais de ovelhas com prenhez tardia. Na atividade metabólica das prostaglandinas, as enzimas COX-1 e COX-2 desempenham um papel crucial ao catalisar a conversão do AA em prostaglandina intermediária H2 (PGH2) (Cheng *et al.*, 2003). Uma vez que, tanto a PGF2 α quanto a PGE2 são derivadas do PGH2, a concentração específica dessas prostaglandinas é fortemente influenciada pela disponibilidade de PGH2 e pela atividade específica das enzimas isomerase e sintase associadas à produção de PGF e PGE (Moussavi *et al.*, 2013). Assim, a quantidade e a razão de PGF2 α e PGE2 produzidas dependem não apenas da atividade das COX, mas também da especificidade das enzimas isomerase e sintase de PGF e PGE. Desse modo, em nosso estudo, o CLA não foi capaz de alterar a expressão dessas enzimas de maneira que aumentasse a concentração de PGE2 ou da razão PGE2/PGF2 α em embriões bovinos.

De acordo com os resultados, a suplementação com CLA nas concentrações utilizadas nesse estudo não influenciou significativamente a taxa de produção de blastocistos no D7, sugerindo que doses superiores a 100 μ M podem não ser benéficas ao desenvolvimento embrionário. Além disso, a análise das PGs revelou que a suplementação com CLA afetou a produção desses mediadores, com concentrações mais elevadas induzindo uma redução na produção de PGE2 e PGF2 α . Notavelmente, a expressão dos transcritos

relacionados ao RMP bovino não foi alterada pela suplementação com CLA. Esses resultados destacam a complexidade dos efeitos desse ácido graxo no desenvolvimento embrionário e na regulação da produção de PGs, sugerindo que doses mais baixas de CLA ($< 50 \mu\text{M}$) podem ser mais favoráveis ao desenvolvimento do embrião. O melhor entendimento dos mecanismos pelos quais os ácidos graxos utilizados alteram a síntese de PGE2 no embrião torna-se fundamental para elucidar os mecanismos envolvidos no processo de RMP por meio da modulação das prostaglandinas E2 e F2 α para estabelecer o sucesso da prenhez.

3.5 Conclusão

Em conclusão, a suplementação de CLA na MIV e CIV ou somente no CIV não promoveu aumento na produção embrionária no D7 e D9, aumentou a síntese de PGF2 α na MIV e reduziu a síntese de PGE2, PGF2 α e a razão PGE2/PGF2 α em embriões até o 9º dia do desenvolvimento sem alterar a abundância dos transcritos *IFN-t*, *AKR1B1*, *PTGES* e *PTGS2*.

REFERÊNCIAS

ABSALÓN-MEDINA, V. A.; BEDFORD-GUAUS, S. J.; GILBERT, R. O.; SIQUEIRA, L. C.; ESPOSITO, G.; SCHNEIDER, A.; CHEONG, S. H.; BUTLER, W. R. The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 on *in vitro* bovine embryo production and cryopreservation. **J. Dairy Sci.**, v. 97, p. 6164–6176, 2014.

BAI, H.; SAKURAI, T.; SOMEYA, Y.; KONNO, T.; IDETA, A.; AOYAGI, Y.; IMAKAWA, K. Regulation of Trophoblast-Specific Factors by GATA2 and GATA3 in Bovine Trophoblast CT-1 Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 4, p. 518–525, 2011.

BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta- actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 3, p. 267-278, 2006.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 56, p. 1451-1463, 2001.

CHENG, Z; ELMES, M.; ABAYASEKARA, D. R.; WATHES, D. C. Effects of conjugated linoleic acid on prostaglandins produced by cells isolated from maternal intercotyledonary endometrium, fetal allantochorion and amnion in late pregnant ewes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1633, p. 170-178, 2003.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biol. Reprod.**, [s.l.], v. 77, p. 9–17, 2007.

GOFF, A. K. Embryonic signals and survival. **Reprod. Domest Anim.**, [s.l.], v. 37, p. 133-139, 2002.

HUGHES, C. K.; XIE, M. M.; MCCOSKI, S. R.; EALY, A. D. Activities for leptin in bovine trophoblast cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 58, p. 84–89, 2017.

HUGHES, J.; KWONG, W. Y.; LI, D.; SALTER, A. M.; LEA, R. G.; SINCLAIR, K. D. Effects of omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids on ovine follicular cell steroidogenesis, embryo development and molecular markers of fatty acid metabolism. **Reproduction**, [s.l.], v. 141, p. 105-118, 2011.

HWANG, D. H.; POOL, S. H.; RORIE, R. W.; BOUDREAU, M.; GODKE, R. A. Transitional changing in arachidonic acid metabolism by bovine embryos at different developmental stages. **Prostaglandins**, [s.l.], v. 35, p. 387-402, 1988.

KARASHIN, T.; ARIKAN, S. The effect of oleic and linoleic acids on *in vitro* bovine embryonic development and embryo quality. **Turk. J. Vet. Anim. Sci**, [s.l.], v. 39, p. 154–159, 2015.

MALDONADO, M. B. C.; LOURENCO, V. C.; BEZERRA, L. O.; FELTRIN, I. R.; MENDES, A. F.; ROCHA, C. C.; PUGLIESI, G.; EALY, A.; MEMBRIVE, C. M. B.; NOGUEIRA, M. F. G. Conjugated linoleic acid supplementation changes prostaglandin concentration ratio and alters the expression of genes involved in maternal-fetal recognition from bovine trophoblast cells *in vitro*. **Theriogenology**, [s. l.], p. 87-95, 2023.

MOUSSAVI, A. H.; BUTLER, W. R.; BAUMAN, D. E.; GILBERT, R. O. Effects of conjugated linoleic acids on prostaglandin secretion by bovine endometrial epithelial cells *in vitro*. **Am. J. Vet. Res.**, [s.l.], v. 74, p. 491-498, 2013.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

RIOS-ESTEVEZ, J.; RESH, M. D. Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins. **Cell Rep.**, [s.l.], v. 4, p. 1072–1081, 2013.

RYAN, D. P. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. **Journal of Animal Science**, [s.l.], v. 70, p. 3505-3513, 1992.

SCENNA, F. N.; EDWARDS, J. L.; ROHBACH, N. R.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N. Detrimental effects of prostaglandin F₂α on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, [s.l.], v. 73, p. 215-226, 2004.

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

THANGAVELU, G.; COLAZO, M. G.; AMBROSE, D. J.; OBA, M.; OKINE, E. K.; DYCK, M. K. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, [s. l.], v. 68, p. 949–957, 2007.

TOMINAGA, K.; SHIMIZU, M.; OYAMA, S.; IZAIKE, Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine *in vitro* produced 16-cell embryos. **Theriogenology**, [s. l.], v. 53, p. 1669–80, 2000.

ULBRICH, S. E.; SCHULKE, K.; GROEBNER, A. E.; REICHENBACH, H. D.; ANGIONI, C.; GEISLINGER, G.; MEYER, H. H. D. Quantitative characterization of prostaglandins in the uterus of early pregnant cattle. **Reproduction**, [s. l.], v. 138, n. 2, p. 371–382, 2009.