

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS - FCAT
CAMPUS DE DRACENA**

Gabriel Souza da Silva

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO OLEICO ALTERA A
SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS EM CÉLULAS
TROFOBLÁSTICAS BOVINAS CULTIVADAS *IN VITRO***

Dracena

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS - FCAT
CAMPUS DE DRACENA**

Gabriel Souza da Silva

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO OLEICO ALTERA A
SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS EM CÉLULAS
TROFOBLÁSTICAS BOVINAS CULTIVADAS *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso em Zootecnia (TCZ) apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus de Dracena, como parte das exigências para obtenção do título de Zootecnista.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Felipe Mendes

Dracena

2024

Certificado de aprovação.



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
UNESP – CÂMPUS DE DRACENA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO OLEICO ALTERA A SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS BOVINAS CULTIVADAS *IN VITRO*.

Modalidade: Trabalho de **Atividades de pesquisa**

Autor: Gabriel Souza da Silva

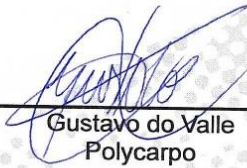
Orientador (a): Claudia Maria Bertan Membrive

Co-orientador(es): Adriano Felipe Mendes

Número de Créditos: 15

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 12/06/2024


Claudia Maria Bertan
Membrive


Gustavo do Valle
Polycarpo


Ricardo da Fonseca

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Jorivaldo Docca da Silva*** e ***Claudia Luzia de Souza Silva***, que me educaram e possibilitaram mais essa conquista, exemplos fundamentais para a minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, pois sem ele não seria possível superar os desafios que surgiram no caminho.

Agradeço aos **meus pais**, por me apoiarem e tornarem possível a minha trajetória na graduação.

Ao **Programa de Educação Tutorial (PET)**, grupo que agregou de forma relevante para a minha formação durante a graduação por meio dos pilares de Ensino, Pesquisa e Extensão. Agradeço a tutora **Profa. Dra. Carolina Batista dos Santos Bonini** pelos ensinamentos e pela oportunidade de participar do grupo.

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

Em especial agradeço a **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**, minha orientadora, pelas oportunidades e também por todo o auxílio durante a jornada.

À **Dra. Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado**, da University of Florida, pelos ensinamentos e contribuição científica.

À **Ms. Valeska de Castro Lourenço**, pelo total apoio na condução dos experimentos realizados.

Ao **Prof. Dr. Alan Ealy**, do Department of Animal and Poultry Science da Virginia Tech, Blacksburg, VA, Estados Unidos, pela doação das células trofoblásticas bovinas e pela imensa colaboração científica 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.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Pugliesi**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na realização das mensurações por ELISA e pela valiosa ajuda nas análises estatísticas.

A **Dra. Isabella Rio Feltrin**, do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pelo valioso auxílio nas análises estatísticas.

A **Ms. Amanda Guimarães da Silva**, do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pela colaboração, disposição e atenção dispensada para auxiliar nas análises de mensurações por ELISA.

Ao **Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE)** e a todos os seus integrantes. Agradeço o apoio, companheirismo e principalmente por todo trabalho que desenvolvemos juntos durante esse tempo. Em especial, aos meus amigos e companheiros de equipe **Adriano Felipe Mendes, Laura Chuba Machado Rolniche, Lucas de Oliveira Bezerra, Maria Eduarda Rocha Pinto, Emily Silva do Nascimento, Mariana Berlato Casagrande, Catarina Lazarevicius Prestes e Eduardo Carvalho Bernardo**; agradeço pelo apoio e amizade durante o desenvolvimento de todo experimento.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/UNESP)**, Câmpus de Dracena, pelo apoio técnico-administrativo e logístico ao desenvolvimento do referido estudo.

“O ser humano é aquilo que a educação faz dele”

Immanuel Kant

RESUMO

Em bovinos a mortalidade embrionária precoce, ocasionada por falhas no reconhecimento materno-fetal (RMF), é uma das maiores causas de falhas reprodutivas. O ácido oleico (OA) determina modificações na síntese de prostaglandinas que podem favorecer o RMF. A hipótese é que a suplementação com OA, no meio de cultura de CT-1 aumenta a síntese de PGE_2 , diminui a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e aumenta a relação $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo tal efeito dose-dependente. O objetivo foi determinar os efeitos da suplementação com OA (Sigma, O1383) no cultivo *in vitro* de células trofoblásticas bovinas (CT-1) sobre a síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2) e prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$). As CT-1 foram cultivadas por 24 dias, incubadas a $38,5^\circ\text{C}$ em atmosfera umidificada, com 5% de CO_2 em garrafas de cultivo. Após essa etapa, as CT-1 foram transferidas para placas de cultivo contendo meio acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB), onde foram cultivadas por 5 dias e, em seguida, receberam meio de cultivo isento de SFB durante 24 horas. Finalmente, as CT-1 foram suplementadas com diferentes concentrações de OA (0, 50, 100, 200, 500 e 1000 μM) durante 48 e 72 horas em meio sem SFB. As concentrações de PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram determinadas por ensaio de imunoabsorção enzimática. A análise estatística foi realizada pelo PROC MIXED do SAS. A concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no tempo de 48 horas foi maior ($P < 0,0001$) nos tratamentos com 50 μM , 100 μM , 200 μM e 500 μM de OA ($88,97 \pm 7,11$; $95,31 \pm 7,11$; $114,88 \pm 7,11$ e $107,83 \pm 7,11$ ng/ml; respectivamente) comparado ao grupo controle ($61,52 \pm 7,11$ ng/ml), o tratamento de 1000 μM de OA ($58,44 \pm 7,11$ ng/ml) não diferiu do grupo controle. A concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no tempo de 72 horas foi maior ($P < 0,0001$) nos tratamentos com 50 μM , 100 μM , 200 μM e 500 μM de OA ($64,08 \pm 2,89$; $76,45 \pm 2,89$; $70,31 \pm 2,89$ e $59,31 \pm 2,89$ ng/ml; respectivamente) comparado ao grupo controle ($49,40 \pm 2,89$ ng/ml), no tratamento de 1000 μM de OA ($39,41 \pm 2,89$ ng/ml) foi menor que no grupo controle. As CT-1 suplementadas com 200 μM , 500 μM e 1000 μM de OA apresentaram um aumento ($P = 0,0151$) na síntese de PGE_2 no tempo de 48 horas ($20,61 \pm 3,39$; $20,11 \pm 3,39$ e $19,11 \pm 3,39$ ng/ml; respectivamente) comparado ao grupo controle ($4,80 \pm 2,93$ ng/ml). Com 72 horas, houve tendência ($P = 0,0872$) no aumento da síntese de PGE_2 ($P = 0,0872$), quando as CT-1 suplementadas com 50 μM , 200 μM e 1000 μM de OA ($18,60 \pm 3,60$; $20,20 \pm 3,60$ e $19,00 \pm 3,60$ ng/ml; respectivamente) foram comparadas ao grupo controle ($5,40 \pm 3,60$ ng/ml). Nos grupos tratados com OA por 48 horas, a razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ foi menor ($P = 0,0460$) quando as CT-1 foram suplementadas com 200 μM e 500 μM de OA ($0,62 \pm 0,06$ e $0,56 \pm 0,06$) comparado ao grupo controle ($0,82 \pm 0,06$ ng/ml). Com 72 horas, houve tendência na diminuição da razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ ($P = 0,0834$) apenas quando as CT-1 foram suplementadas com 500 μM de OA ($0,62 \pm 0,10$) comparado ao grupo controle ($0,93 \pm 0,09$ ng/ml). Em conclusão, a suplementação de OA na concentração de 1000 μM , diminui a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com 72 horas e aumenta a síntese de PGE_2 com 48 horas no cultivo *in vitro* de CT-1.

Palavras chaves: ácido graxo, trofotoderma, blastocisto.

ABSTRACT

In cattle early embryonic mortality, caused by failures in maternal recognition of pregnancy (MRP), is one of the major causes of reproductive failures. Oleic acid (OA) determines modifications in the synthesis of prostaglandins that may favor MRP. The hypothesis is that supplementation with OA in the CT-1 culture medium increases PGE₂, decreases PGF_{2α} and increases the PGE₂/PGF_{2α} ratio, with this effect being dose-dependent. The objective was to determine the effects of supplementation with OA (Sigma, O1383) in the *in vitro* culture of bovine trophoblastic cells (CT-1) on the synthesis of prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}). The CT-1 were cultured for 24 days, incubated at 38.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in culture bottles. After this step, the CT-1 were transferred to culture plates containing medium added with 10% fetal bovine serum (FBS), where they were cultivated for 5 days and then received culture medium free of FBS for 24 hours. Finally, CT-1 were supplemented with different concentrations of OA (0, 50, 100, 200, 500 and 1000 μM) for 48 and 72 hours in medium without FBS. PGE₂ and PGF_{2α} concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Statistical analysis was performed using PROC MIXED from SAS. The concentration of PGF_{2α} at 48 hours was higher ($P < 0.0001$) in treatments with 50 μM, 100 μM, 200 μM and 500 μM of OA (88.97 ± 7.11 ; 95.31 ± 7.11 ; 114.88 ± 7.11 and 107.83 ± 7.11 ng/ml; respectively) compared to the control group (61.52 ± 7.11 ng/ml), the 1000 μM OA treatment (58.44 ± 7.11 ng/ml) did not differ from the control group. The concentration of PGF_{2α} at 72 hours was higher ($P < 0.0001$) in treatments with 50 μM, 100 μM, 200 μM and 500 μM of OA (64.08 ± 2.89 ; 76.45 ± 2.89 ; 70.31 ± 2.89 and 59.31 ± 2.89 ng/ml; respectively) compared to the control group (49.40 ± 2.89 ng/ml), the 1000 μM OA treatment (39.41 ± 2.89 ng/ml) was lower than in the control group. CT-1 supplemented with 200 μM, 500 μM and 1000 μM of OA showed an increase ($P = 0.0151$) in PGE₂ synthesis within 48 hours (20.61 ± 3.39 ; 20.11 ± 3.39 and 19.11 ± 3.39 ng/ml, respectively) compared to the control group (4.80 ± 2.93 ng/ml). At 72 hours, there was a tendency ($P = 0.0872$), towards an increase in PGE₂ synthesis, when CT-1 supplemented with 50 μM, 200 μM and 1000 μM of OA (18.60 ± 3.60 ; 20.20 ± 3.60 and 19.00 ± 3.60 ng/ml; respectively) were compared to the control group (5.40 ± 3.60 ng/ml). In groups treated with OA for 48 hours, the PGE₂/PGF_{2α} ratio was lower ($P = 0.0460$) when CT-1 was supplemented with 200 μM and 500 μM of OA (0.62 ± 0.06 and 0.56 ± 0.06 ng/ml) compared to the control group (0.82 ± 0.06 ng/ml). At 72 hours, there was a tendency to decrease the PGE₂/PGF_{2α} ratio ($P = 0.0834$) only when the TC-1 were supplemented with 500 μM of OA (0.62 ± 0.10 ng/ml) compared to the control group (0.93 ± 0.09 ng/ml). In conclusion, OA supplementation at a concentration of 1000 μM decreases PGF_{2α} synthesis with 72 hours and increases PGE₂ synthesis with 48 hours in the *in vitro* culture of CT-1.

Keywords: fatty acid, trophectoderm, blastocyst.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos tratamentos de OA realizados nas CT-1.....	18
Figura 2 - Células trofoblásticas bovinas durante a primeira troca de meio após 3 dias do descongelamento.	20
Figura 3 - Transferência das células trofoblásticas bovinas para o cultivo em 2 garrafas para o uso de matrigel 1:10.	21
Figura 4 - Células trofoblásticas bovinas durante a troca de meio em 2 garrafas após 3 dias da transferência para 2 garrafas.	21
Figura 5 - Células trofoblásticas bovinas após 12 dias de cultivo, visualizadas em microscópio Nikon no aumento de 10X, como podemos observar as referidas células apresentam formato cuboide.	22
Figura 6 - Placa de 6 poços no cultivo das células trofoblásticas bovinas antes da suplementação dos tratamentos.	23
Figura 7 - Células trofoblásticas bovina após 24 horas de cultivo em 6 poços	23
Figura 8 - Efeito da suplementação com 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M e 1000 μ M de OA e um grupo controle em meio de cultivo de CT-1 cultivadas in vitro na síntese de PGF2 α por 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).	27
Figura 9 - Efeito da suplementação com 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M e 1000 μ M de OA e um grupo controle em meio de cultivo de CT-1 cultivadas in vitro na síntese de PGE2 por 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).	28
Figura 10 - Efeito da suplementação com 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M e 1000 μ M de OA e um grupo controle em meio de cultivo de CT-1 cultivadas in vitro na razão de PGE2/PGF2 α por 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Características do Ácido Oleico	15
2.2 Participação das Células Trofoblásticas no Reconhecimento Materno da Prenhez....	15
3 HIPÓTESE	16
4 OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo Geral	16
4.2 Objetivos Específicos	17
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5.1 Local do experimento	17
5.2 Delineamento experimental.....	17
5.3 Multiplicação e congelamento das células trofoblásticas para formação de estoque..	18
5.4 Descongelamento e propagação das células trofoblásticas	19
5.5 Cultivo das células trofoblásticas	22
5.6 Preparo da solução estoque de ácido oleico e das diferentes concentrações utilizadas nos tratamentos	24
5.7 Coleta do meio de cultivo das CT-1	24
5.8 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).....	25
5.9 Análise estatística	25
6 RESULTADOS	26
6.1 Efeito da suplementação com OA sobre a síntese de PGF2 α após 48 e 72 horas.....	26
6.2 Efeito da suplementação com OA sobre a síntese de PGE2 após 48 e 72 horas	27
6.3 Efeito da suplementação com OA sobre a razão de PGE2/PGF2 α após 48 e 72 horas.	28
7 Discussão	29
8 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A divisão do ciclo estral de fêmeas bovinas compreende quatro fases fisiologicamente distintas, sendo essas: estro, metaestro, diestro e proestro. O estro, com duração de aproximadamente 12 horas, é caracterizado pela ausência do corpo lúteo (CL), baixas concentrações circulantes de progesterona (P4) e altas concentrações de 17β -estradiol (E2); condição que determina os sinais físicos e psíquicos de estro, ou seja, torna a fêmea receptiva ao acasalamento. O metaestro, apresenta duração média de 5 dias, fase que inicialmente compreende a ovulação e posteriormente a formação de um corpo hemorrágico que sintetiza P4 de forma crescente ao longo do tempo, e caracteriza-se por concentrações circulantes de E2 decrescentes. O diestro, dura por volta de 13 dias e caracteriza-se pela presença de um CL no auge de secreção de P4, logo as concentrações circulantes de P4 são altas e E2 baixas. O proestro, que marca seu início a partir da luteólise com duração de 2 a 3 dias, caracteriza-se por concentrações decrescentes de P4 crescentes de E2 (FELTRIN et al., 2021).

O intervalo entre partos em rebanhos de bovinos de corte e leite deve ser de aproximadamente 12 meses, entretanto o mesmo sofre impactos da morte embrionária precoce, ocorrida especialmente entre 14 a 19 dias pós acasalamento (THATCHER et al., 1994; VANROOSE et al., 2000; SREENAN et al., 2001). Alguns estudos, conforme revisado por Sartori (2004), apontam de 20 a 40% das perdas embrionárias em vacas de corte no referido período, este mencionado como “período crítico”.

O reconhecimento materno da prenhez se trata do processo fisiológico onde o concepto sinaliza de forma competente sua presença ao sistema materno, dessa forma garantindo que o CL e as altas concentrações circulantes de P4 sejam preservadas (BAZER et al., 1991). Após 4 dias do acasalamento, o embrião que estará no estágio de mórula passa do oviduto para o útero. Na cavidade uterina se torna um blastocisto dotado de massa celular interna e blastocelo cercado por células do trofotoderma. Com a eclosão da zona pelúcida, o blastocisto se desenvolve em um concepto inicialmente ovóide e posteriormente em tubular; caracterizando uma estrutura grandemente alongada por volta do 15º dia de desenvolvimento. O interferon tau (IFNT) é reconhecidamente a principal molécula envolvida no reconhecimento

materno fetal em fêmeas ruminantes. A produção de IFNT, realizada pelas células trofoblásticas do conceito, é proporcional a capacidade de alongamento do conceito. Grande quantidade de IFNT garante a sinalização do reconhecimento materno da prenhez (FARIN et al., 1989; GUILLOMOT et al., 1990; GRAY et al., 2002; HANSEN et al., 2017). Esse mecanismo, quando realizado com sucesso, não permite que ocorram os eventos luteolíticos que se iniciam com a síntese de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) no endométrio, mantendo consequentemente um CL funcional produzindo $P4$, sendo essa dinâmica responsável pelo crescimento e desenvolvimento do conceito quando a prenhez é estabelecida (HANSEN et al., 2017).

Experimentos com o uso de modelos *in vivo* e *in vitro* apontam o IFNT, sendo um IFN tipo 1 como responsável antiluteótico secretado exclusivamente por ruminantes (ROBERTS et al., 2008a; BAZER et al., 2015). Autores citam que a produção de IFNT ocorre de forma pontual pelas células mononucleares do trofotoderma do conceito com o pico de produção por volta do 20º dia (GODKIN et al., 1984b; FARIN et al., 1989; GUILLOMOT et al., 1990). A prostaglandina $E2$ ($PGE2$) estimula a produção de $P4$ que suprime a apoptose em células luteais bovinas (DUFFY et al., 2019; OKUDA et al., 2004). Assim como o hormônio luteinizante (LH), a $PGE2$ desempenha papéis luteoprotetores no CL por meio da estimulação de $P4$ nas células luteais bovinas (BOWOLAKSONO et al., 2008). O início da síntese de $PGE2$ ocorre pela liberação do ácido araquidônico do fosfolípido das membranas celulares pela fosfolipase $A2$. Em seguida, o ácido araquidônico é metabolizado em $PGH2$ pela ciclooxigenase (COX) -1 e COX-2. Por fim, a $PGH2$ pode ser convertida em prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) pela PGF sintase (PGFS) ou em $PGE2$ pela $PGE2$ sintase (PGES) (FLINT et al., 1986; FAROOQUI et al., 2000; OLOFSSON e PETER, 1994; SMITH e DEWITT, 1996; AROSH et al., 2004).

O fator mais relevante para a indução da luteólise em bovinos é a ação da $PGF2\alpha$, cujo os pulsos uterinos se relacionam com a expressão de receptores endometriais de oxitocina (OTR) em razão do $E2$ folicular agir no receptor alfa de estrogênio (ESR1) para induzir OTR (MCCRACKEN et al., 1999; DOMINGUES et al., 2020; ARAUJO et al., 2009). Evidências apontam que o transporte de $PGF2\alpha$ ocorre da veia uterina para a artéria ovariana, pois anatomicamente as mesmas são estreitamente opostas o que causa uma grande área de superfície de contato direto (GINTHER e DELCAMPO, 1973). Na perspectiva luteal, a $PGF2\alpha$ chega ao sangue por meio da artéria ovariana, difunde-se para fora dos capilares e se liga diretamente

às células luteais, assim iniciando o processo de luteólise. Os primeiros pulsos desse hormônio são pequenos e inferiores a 100pg/mL, com base em concentrações de metabólito de PGF, após aproximadamente 2 pulsos pequenos ocorrem pulsos luteolíticos grandes e observações na concentração de P4 circulante demonstram que sua presença diminui somente ao ocorrer os grandes pulsos de PGF2 α (>100pg/mL) (Mezera et al., 2019; Mezera et al., 2021a).

Diante disso, o aumento da síntese de PGE2 e a diminuição de PGF2 α acaba sendo interessante para o reconhecimento materno fetal afim de garantir produções constantes de P4. Autores demonstram que a razão PGE2/PGF2 α são extremamente importantes (BAZER et al., 1998). Logo, o aumento das concentrações PGE2, favoreceria a preservação do CL e o reconhecimento materno fetal. Uma tática para alcançar o que foi descrito anteriormente seria investigar as divisões dos grupos moleculares de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), que contemplam ômega 3, omêga 6 e ômega 9 onde possuem ligação dupla em sua molécula respectivamente nos carbonos 3, 6 e 9, sendo diferente dos ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) que possuem somente uma ligação dupla. Evidências apontam que os mesmos podem estar relacionados com benefícios no contexto reprodutivo, por meio de possíveis fatores de alteração da transcrição que controlam a expressão gênica, modificando as concentrações celulares de enzimas que regulam prostaglandinas e também vias sintéticas esteroidogênicas (WU e WILTBANK, 2001). Isso ocorre devido a ação desses substratos como inibidores competitivos da ciclo-oxigenação o que altera a expressão e concentração de enzimas relevantes, uma vez que cada grupo de prostaglandina compete pelos mesmos sistemas enzimáticos para o metabolismo (LANDS, 1992). Com base no exposto, encontrar formas de alterar a síntese das prostaglandinas E2 e F2 α pode ser estratégico para beneficiar o reconhecimento materno da prenhez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do Ácido Oleico

O ácido oleico (OA, 18: 1 *cis* 9), é caracterizado por ser um ácido carboxílico de cadeia longa possuindo 18 carbonos e um grupo funcional COOH. Sua fórmula química é descrita por $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$, sendo chamado de ácido graxo monoinsaturado devido a presença de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 do grupo metil final (ROSE & CONNOLY, 1999). Além ser um dos principais ácidos graxos monoinsaturados presente nos extratos lipídicos de bovinos, ovinos e suínos (HOMA et al., 1986; PRATES et al., 2013; DUNNING et al., 2014) pode ser sintetizado por todos os mamíferos, incluindo humanos, a partir dos AGPI ômega 3 e 6 provenientes de dietas (LEE & PARK, 2014). Sua alta capacidade de solubilizar lipídeos está relacionada com a ligação dupla presente na posição 9 (PEREIRA et al., 2014). O OA é extremamente importante para determinar a fluidez da membrana plasmática (FUNARI et al., 2003) e está ligado a outras funções relevantes como a interação das células, transporte de membrana, eventos de sinalização, regulação da temperatura do corpo, produção de hormônios sexuais (E2 e P4) e também contribui para o aumento da absorção metabólica de vitaminas (A, D, E e K), além de atuar como fonte em funções metabólicas estruturais (WARZYCH, 2017). Por fim, o OA é capaz de doar um cátion de hidrogênio a um aceptor e se opõe à oxidação ou inibe as reações provocadas pelo dioxigênio ou peróxidos (CHOE et al., 2009) e também pode ser diretamente ligado a proteínas no momento do crescimento e diferenciação de diversos tipos de células (RIOS-ESTEVES, 2013).

2.2 Participação das Células Trofoblásticas no Reconhecimento Materno da Prenhez

Durante o período de pré-implantação, alterações da morfologia e o aumento de proliferação das células trofoblásticas, transformam o conceito esférico em uma estrutura alongada e filamentosa que ocupa a maioria da extensão do corno uterino ipsilateral a ovulação (BAZER, 1989; GUILLOT, 1995; ROBINSON et al., 2006). Em função rápida da proliferação das células trofoblásticas o aumento da área de

superfície de contato com o epitélio uterino é favorecido. Com o alongamento e comprimento do concepto, também ocorre o aumento das células trofoblásticas e o resultado de uma maior ocorrência das etapas descritas é que maior será a biossíntese e secreção de IFNT que possui um aumento de produção por volta de 14 à 18 dias de prenhez coincidindo com a rápida elongação do concepto (EALY et al., 2001; ROBINSON et al., 2006).

A migração das células trofoblásticas é fundamental para sua reorganização e morfogênese, uma vez que possuem grande importância no desenvolvimento do concepto durante o período que antecede a adesão (GUILLOT 1995; FERRETTI et al., 2007; BAZER et al., 2009). O IFNT secretado pelas células trofoblásticas atuam por meio de funções parácrinas prevenindo a secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$, logo mantendo as estruturas vasculares e o fluxo sanguíneo do CL preservadas (SPENCER et al., 2004b; SPENCER et al., 2007). Em adicional às funções parácrinas citadas, o IFNT aumenta a síntese de PGE_2 nas células do estroma e do epitélio endometrial, limitando a via de biossíntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e priorizando a via de biossíntese de PGE_2 . Ainda, as ações endócrinas do IFNT que ocorrem por meio do transporte da circulação materna para o CL promovendo o aumento da produção de P_4 nas células luteais e garantem que o CL tenha menor sensibilidade à ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Arosh et al., 2016).

3 HIPÓTESE

A hipótese é que a suplementação com OA, no meio de cultura de CT-1 aumenta a síntese de PGE_2 , diminui a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e aumenta a relação $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$, sendo tal efeito dose-dependente.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Determinar os efeitos da suplementação com OA no cultivo *in vitro* de CT-1 sobre a síntese de PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$.

4.2 Objetivos Específicos

Objetivou-se determinar os efeitos da suplementação com OA nas concentrações de 0, 50, 100, 200, 500 e 1000 μ M durante 48 e 72 horas, no cultivo *in vitro* de CT-1, na síntese de PGE2, PGF2 α e na relação PGE2/PGF2 α mensuradas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local do experimento

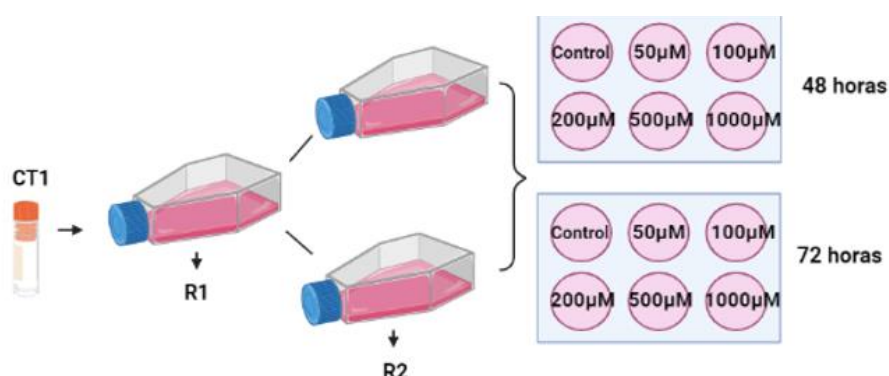
Os procedimentos de cultivo *in vitro* de CT-1, coleta de amostras biológicas, e as análises de dados que proporcionaram a conclusão desse trabalho foram realizados no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), sediado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), da UNESP - Câmpus de Dracena. O ELISA foi realizado em parceria com o Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), situado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), Câmpus de Pirassununga, com a colaboração científica do Prof. Dr. Guilherme Pugliesi. Todos os procedimentos realizados no referido estudo, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAT, Unesp, Dracena/SP, registrado com o Certificado nº 31/2016.R1-CEUA, aprovado em 08/02/2017.

5.2 Delineamento experimental

Conforme ilustrado na **Figura 1**, as células trofoblásticas bovinas (CT-1) foram transferidas para uma garrafa de cultura (R1) previamente preparada com Matrigel, onde foram cultivadas durante 12 dias. Após esse período, as células foram ressuspensas e passadas para duas novas garrafas de cultura (R2), permanecendo em cultivo *in vitro* por mais 12 dias, até atingirem 100% de confluência. Posteriormente, as CT-1 foram transferidas para placas de cultura de 6 poços onde foram mantidas em cultivo *in vitro* por 5 dias. Vinte e quatro horas antes da adição dos

tratamentos com OA o meio de suplementação das CT-1 foi substituído por meio sem SFB. No 7º dia de cultivo os tratamentos com OA foram adicionados nas concentrações 50, 100, 200, 500 ou 1000 μM , além do grupo controle aos respectivos poços de cultivo. Após 48 e 72 horas de tratamento os meios de cultivo foram coletados e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do ELISA. As CT-1 foram coletadas e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises futuras. Foram realizadas 5 repetições experimentais.

Figura 1 - Representação esquemática dos tratamentos de OA realizados nas CT-1.



5.3 Multiplicação e congelamento das células trofoblásticas para formação de estoque

Este procedimento foi realizado antes do início do experimento com o objetivo de produzir um estoque das células CT-1 no referido laboratório. As células CT-1 foram descongeladas e cultivadas conforme a técnica descrita por Talbot et al (2000). De forma geral, para o cultivo das células foi utilizado a construção de uma matriz de membrana basal Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) com meio DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), contendo 40 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino (FBS; Life Technology), contendo 40 nM de glicose, 10% de soro fetal bovino (FBS; Life Technology), 100 μM de aminoácidos não essenciais (Life Technology), 55 μM de B-mercaptoetanol (Life Technology) e solução antibiótica e antibiótica (100 U mL⁻¹ de Penicilina G, 100 g mL⁻¹ de sulfato de estreptomicina e 250 g mL⁻¹ de anfotericina B; Life Technology). As células foram cultivadas à 38,5°C com 5% de CO₂. Após as células atingirem 95% de confluência, no fundo da garrafa, foram

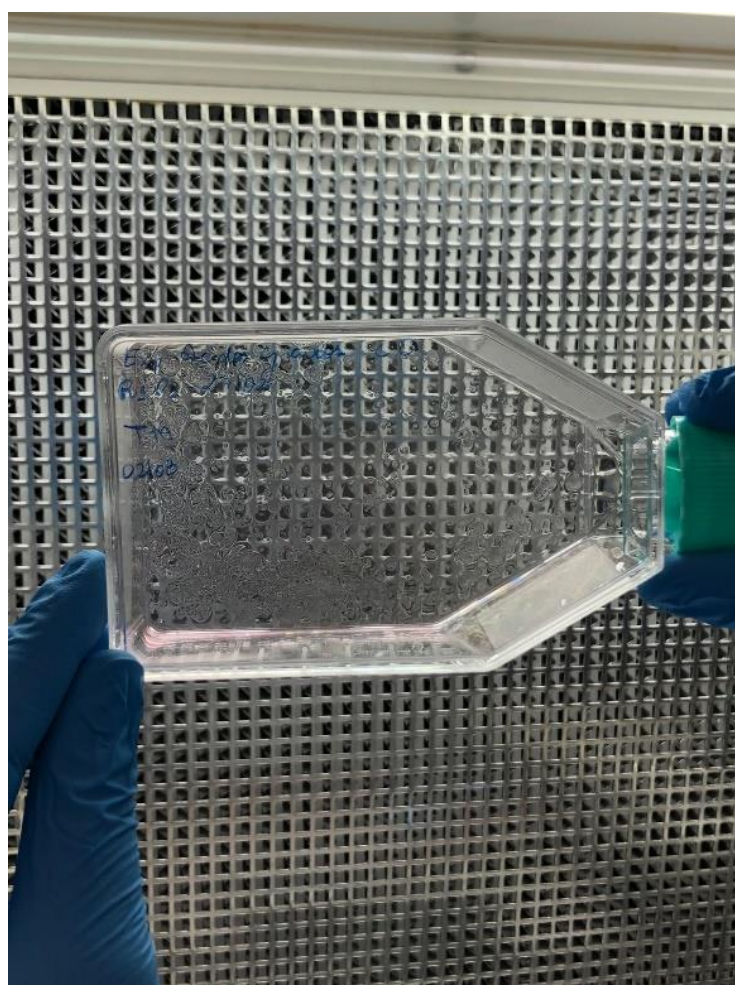
removidas com um “cell scraper”. Em seguida, este conteúdo celular foi transferido para outras 2 garrafas previamente preparadas com Matrigel 1:10, seguindo os passos descritos anteriormente. Novamente as células foram cultivadas à 38,5°C com 5% de CO₂ e após atingirem 95% de confluência foram removidas das garrafas com um “cell scraper” e transferidas para um tubo tipo Falcon de 50 mL onde após precipitação o sobrenadante foi removido e ao pellet de células ocorreu a adição de 12 mL de uma solução de 8% de DMSO (Sigma-D2650) e 92% de soro fetal bovino (SFB; Life Technology). As células foram re-suspendidas em 1 mL e em seguida colocada em criotubo (total de 12 criotubos), sendo esse congelado a -80°C por 2 horas e posteriormente armazenado em nitrogênio líquido.

5.4 Descongelamento e propagação das células trofoblásticas

Previamente ao descongelamento das CT-1, preparou-se a garrafa de cultivo de 75 cm² (Corning, ref. 43064U) com 15 ml de Matrigel diluída a 1:3, incubada (Panasonic, COM-19AIC UV) a 38°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 2 horas. Posteriormente, as células contidas no interior de um criotubo, armazenado em nitrogênio líquido, foram descongeladas em água a 38°C por 3 minutos. Após o descongelamento, as CT-1 foram ressuspendidas em 15 ml de meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (meio de manutenção), composto por 450 ml de DEMEM (1x) + Glutamax TM-1 (Gibco, ref. 10569-010, Grand Island, NY, USA); 50 ml de SFB (Gibco, ref. 12657029, inativado por calor a 56°C por 30 minutos); 50 ml de solução antibiótica e antimicótica (100x) (Gibco, ref. 15240062, Grand Island, NY, USA); e 500 µL de 2-mecarptotanol (1000x) (Gibco, ref. 21985023, Grand Island, NY, USA). Depois da ressuspensão das CT-1, as mesmas foram adicionadas à garrafa, onde foram cultivadas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ durante três dias sem que a garrafa fosse movimentada. Após 3 dias (**Figura 2**), procedeu-se a troca de meio de manutenção a cada 48H até que as CT-1 atingissem 100% de confluência (12 dias). Em cada troca de meio utilizaram-se 15 ml de meio suplementado. Após atingirem 100% de confluência, as CT-1 foram transferidas para duas novas garrafas de cultivo, previamente preparadas com Matrigel (1:10) contendo 15 ml de meio suplementado. Para o processo de ressuspensão, as CT-1 foram removidas da garrafa de cultivo com o auxílio de um

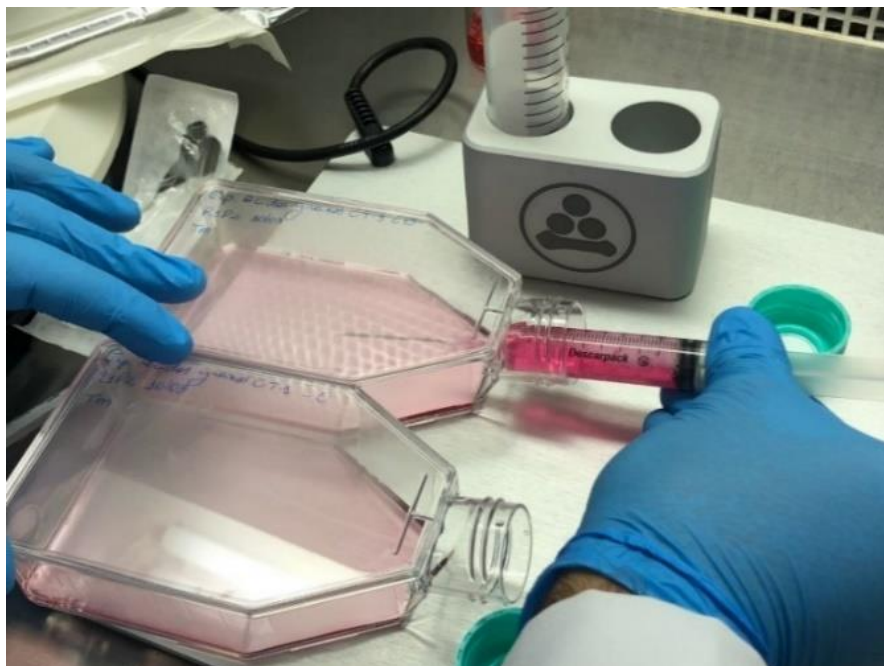
“cell scraper”, raspando toda a superfície da garrafa de forma a promover o deslocamento das células. Posteriormente, as CT-1 foram transferidas para um tubo cônico com capacidade de 50 ml e dissociadas com o auxílio de uma seringa de 20 ml acoplada a uma agulha de calibre 18G. O volume obtido foi dividido igualmente entre as duas garrafas (**Figura 3**). Novamente, as CT-1 foram incubadas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, por mais 12 dias quando observou-se 100% de confluência (**Figura 4**). As trocas de meio de manutenção foram realizadas a cada 48 horas. Após atingirem 100% de confluência (**Figura 4**), as CT-1 foram novamente ressuspensas e transferidas para placas de 6 poços (Corning, ref. 3516, NY, USA) para realização dos tratamentos.

Figura 2 - Células trofoblásticas bovinas durante a primeira troca de meio após 3 dias do descongelamento.



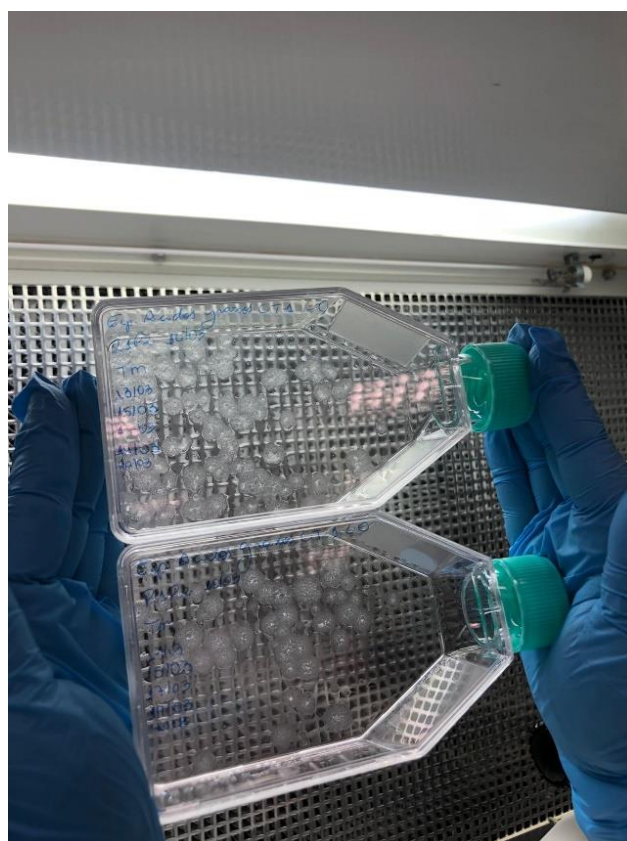
Fonte: Disponibilizado por Lucas de Oliveira Bezerra.

Figura 3 - Transferência das células trofoblásticas bovinas para o cultivo em 2 garrafas para o uso de matrigel 1:10.



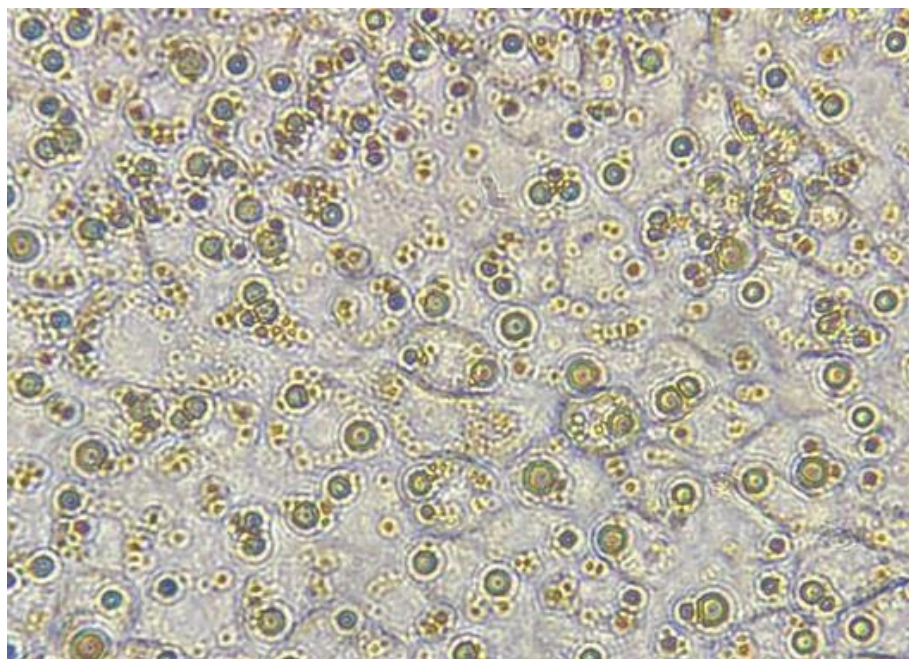
Fonte: Disponibilizado por Lucas de Oliveira Bezerra.

Figura 4 - Células trofoblásticas bovinas durante a troca de meio em 2 garrafas após 3 dias da transferência para 2 garrafas.



Fonte: Disponibilizado por Lucas de Oliveira Bezerra.

Figura 5 - Células trofoblásticas bovinas após 12 dias de cultivo, visualizadas em microscópio Nikon no aumento de 10X, como podemos observar as referidas células apresentam formato cuboide.

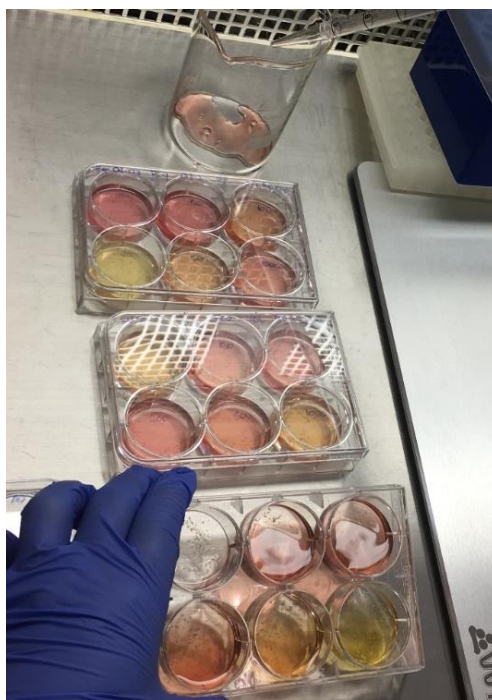


Fonte: Disponibilizado por Lucas de Oliveira Bezerra.

5.5 Cultivo das células trofoblásticas

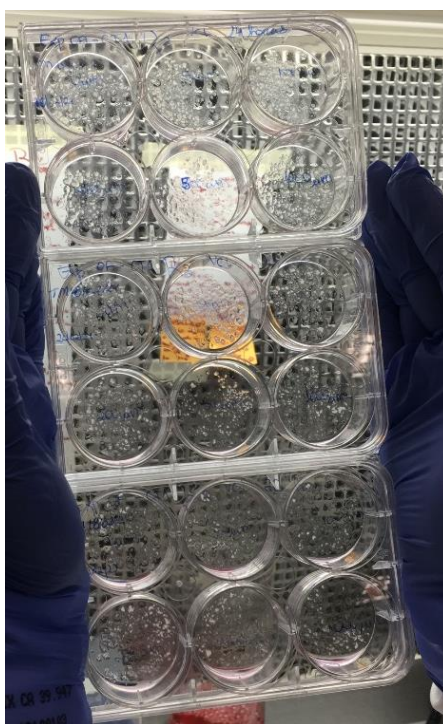
As células foram semeadas em placas contendo 6 poços (com área de crescimento de 9,6 cm² por poço) contendo superfície CellBIND (Corning, Tewksbury, MA, USA) com meio DMEM com 10% de SFB e os outros aditivos descritos no item anterior (**Figura 6**). As células foram cultivadas durante 5 dias à 38,5°C com 5% de CO₂, até atingirem 50% de confluência (**Figura 7**). Quando tal confluência foi atingida, o meio de cultivo foi aspirado e substituído por meio de cultivo não acrescido de SFB. Depois de 24 horas, o meio de cultivo DMEM sem SFB foi substituído por 4 mL/poço de um novo meio de cultivo DMEM sem SFB acrescido ou não do tratamento com OA.

Figura 6 - Placa de 6 poços no cultivo das células trofoblásticas bovinas antes da suplementação dos tratamentos.



Fonte: Disponibilizado por Valeska de Castro Lourenço.

Figura 7 - Células trofoblásticas bovina após 24 horas de cultivo em 6 poços



Fonte: Disponibilizado por Valeska de Castro Lourenço.

5.6 Preparo da solução estoque de ácido oleico e das diferentes concentrações utilizadas nos tratamentos

O preparo da solução estoque do OA (Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. O1383) se iniciou com o conteúdo total de sua ampola (5g) diluído em etanol até completar o volume final de 100 mL, logo considerando o peso molecular de OA de 282,46g foi possível obter como resultado uma solução estoque de 50mg/mL ou 177.000 $\mu\text{M/mL}$. Em seguida, a solução estoque de OA foi alíquotada em microtubos e armazenada a -20°C . No momento da utilização, a solução estoque foi descongelada e diluída em meio não suplementado de soro fetal bovino (SFB), contendo 0,1125% de BSA como veículo, visando obter a concentração final desejada de 50, 100, 200, 500 ou 1000 μM e grupo controle, conforme a seguinte descrição: Concentração 0 μM – Em 26 mL de DMEM sem SFB com BSA, foi removido 146,9 μL do meio e adicionado 146,9 μL de etanol; Concentração 50 μM – Em 35,4 mL de DMEM sem SFB com BSA, foi removido 200 μL do meio e foram adicionados 10 μL da solução estoque de OA + 190 μL de etanol; Concentração 100 μM – Em 26 mL de DMEM sem SFB com BSA, foi removido 146,9 μL do meio e foram adicionados 14,7 μL da solução estoque de OA + 132,2 μL de etanol; Concentração 200 μM – Em 26 mL de DMEM sem SFB com BSA, foi removido 146,9 μL do meio e foram adicionados 29,4 μL da solução estoque de OA + 117,5 μL de etanol; Concentração 500 μM – Em 26 mL de DMEM sem SFB com BSA, foi removido 146,9 μL do meio e foram adicionados 73,5 μL da solução estoque de OA + 73,5 μL de etanol; Concentração 1000 μM – Em 26 mL de DMEM sem SFB com BSA, foi removido 146,9 μL do meio e foi adicionado 146,9 μL da solução estoque de OA.

5.7 Coleta do meio de cultivo das CT-1

Após a adição dos tratamentos contendo as diferentes concentrações de OA, os 4mL/poço do meio de cultivo foram aspirados e distribuídos em 4 microtubos (1 mL/microtubo) nos tempos de 48 ou 72 horas. Em sequência, o meio coletado foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 2 minutos em temperatura ambiente. Por fim, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C até o momento das análises para mensurar as concentrações de PGE2 e PGF2 α , onde

foram utilizados 1 poço de cultivo para cada tratamento e tempo avaliados totalizando 5 repetições.

5.8 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

As mensurações das concentrações de PGE2 e PGF2 α foram realizadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA – Cayman Chemical) utilizando os kits Prostaglandin F2 α ELISA kit, N° 516011 e Prostaglandin E2 ELISA kit – Monoclonal, N° 514010, segundo métodos descritos pelo fabricante. Durante o ensaio, o reagente ELISA Buffer foi substituído pela Matriz e a matriz utilizada nos ensaios foi o meio de cultivo das células CT-1 não suplementado com SFB. Para validar a concentração das amostras de meio de cultivo de CT-1, foram utilizadas 5 concentrações de OA (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, ou 1000 μ M), mais o grupo controle, nos tempos de 48 ou 72 horas de tratamento em 5 repetições experimentais compreendendo um total de 30 amostras (5 repetições x 6 grupos experimentais x 1 tempo = 30 amostras), destas 20 μ L de cada amostra foi utilizado para formar um *pool* de 200 μ L das amostras, em seguida, foi realizada as diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 conforme a descrição. Após o preparo dos padrões para a curva e *pool* de amostras nas diluições descritas, foi realizada a montagem da placa de validação da curva de ELISA e concentração de amostras. Depois da pipetagem a placa foi embalada em papel alumínio e incubada por 18 horas a 4 °C e em seguida cada poço da placa foi lavado com ELISA Wash e adicionado 200 μ L de reagente Ellman. Depois da pipetagem a placa foi embalada em papel alumínio e incubada por 18 horas a 4 °C e em seguida cada poço da placa foi lavado com ELISA Wash e adicionado 200 μ L de reagente Ellman. Ao término da lavagem, uma nova incubação por 90 minutos em homogeneizador orbital foi realizada e, concluindo o processo, se fez a leitura da placa por meio de ondas de 415 nm, em espectrofotômetro com capacidade de leitura de comprimento de onda entre 405-420 nm (Synergy HTX, controlado pelo software Gen5 versão 3.03).

5.9 Análise estatística

A análise estatística foi feita usando o software SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados referentes a síntese de prostaglandinas nos meios de

cultura celular coletados foram analisados por ANOVA usando o procedimento PROC MIXED do SAS (SAS Inst. Inc). O teste F foi utilizado para determinar se a variabilidade entre as médias de um grupo foi maior que a variabilidade das observações dentro dos grupos. Para o modelo desse estudo foi considerado o efeito do grupo de tratamento e o efeito aleatório da replicação da cultura. A significância estatística foi estabelecida em $P \leq 0,05$.

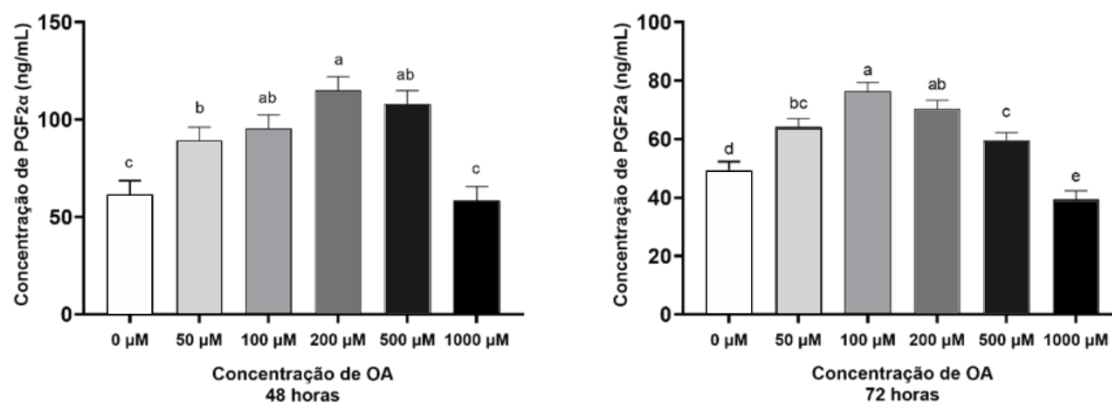
6 RESULTADOS

6.1 Efeito da suplementação com OA sobre a síntese de PGF2 α após 48 e 72 horas

Para a PGF2 α nos tempos de 48 horas ($P = 0,0141$) e 72 horas ($P = 0,0161$) foi apresentado um efeito de repetição. Foi evidenciado efeito de tratamento ($P = 0,0001$) para as comparações estabelecidas com 48 e 72 horas.

Conforme ilustrado na **Figura 8**, durante o tempo de 48 horas as concentrações de PGF2 α no tempo de 48 horas foi maior ($P < 0,0001$) nos tratamentos com 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M e 500 μ M de OA ($88,97 \pm 7,11$; $95,31 \pm 7,11$; $114,88 \pm 7,11$ e $107,83 \pm 7,11$ ng/ml; respectivamente) comparado ao grupo controle ($61,52 \pm 7,11$ ng/ml), o tratamento de 1000 μ M de OA ($58,44 \pm 7,11$ ng/ml) não diferiu do grupo controle. A concentração de PGF2 α no tempo de 72 horas foi maior ($P < 0,0001$) nos tratamentos com 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M e 500 μ M de OA ($64,08 \pm 2,89$; $76,45 \pm 2,89$; $70,31 \pm 2,89$ e $59,31 \pm 2,89$ ng/ml; respectivamente) comparado ao grupo controle ($49,40 \pm 2,89$ ng/ml), no tratamento de 1000 μ M de OA ($39,41 \pm 2,89$ ng/ml) foi menor que no grupo controle.

Figura 8 - Efeito da suplementação com 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M e 1000 μ M de OA e um grupo controle em meio de cultivo de CT-1 cultivadas in vitro na síntese de PGF2 α por 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

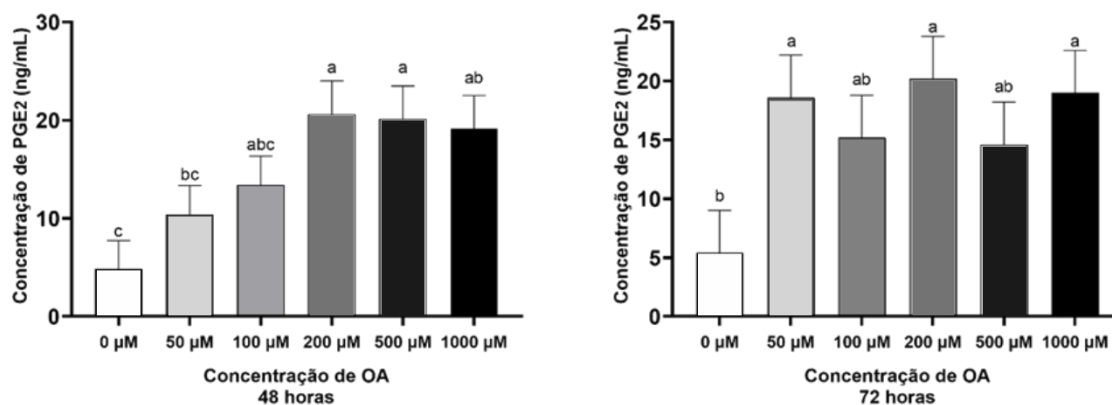


6.2 Efeito da suplementação com OA sobre a síntese de PGE2 após 48 e 72 horas

Para PGE2 nos tempos de 48 e 72 horas foi evidenciado um efeito de tratamento ($P < 0,0001$) para as comparações entre os grupos de tratamento estabelecidas.

Conforme ilustrado na **Figura 9**, as CT-1 suplementadas com 200 μ M, 500 μ M e 1000 μ M de OA apresentaram um aumento ($P = 0,0151$) na síntese de PGE₂ no tempo de 48 horas ($20,61 \pm 3,39$; $20,11 \pm 3,39$ e $19,11 \pm 3,39$ ng/ml; respectivamente) comparado ao grupo controle ($4,80 \pm 2,93$ ng/ml). Com 72 horas, houve tendência ($P = 0,0872$) no aumento da síntese de PGE₂ ($P = 0,0872$), quando as CT-1 suplementadas com 50 μ M, 200 μ M e 1000 μ M de OA ($18,60 \pm 3,60$; $20,20 \pm 3,60$ e $19,00 \pm 3,60$ ng/ml; respectivamente) foram comparadas ao grupo controle ($5,40 \pm 3,60$ ng/ml).

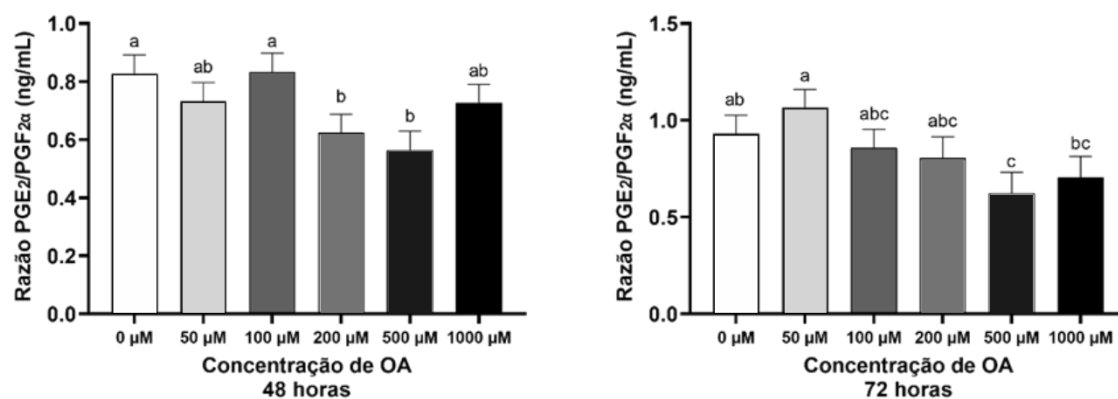
Figura 9 - Efeito da suplementação com 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M e 1000 μ M de OA e um grupo controle em meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na síntese de PGE₂ por 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).



6.3 Efeito da suplementação com OA sobre a razão de PGE₂/PGF_{2 α} após 48 e 72 horas.

Conforme está representado na **Figura 10**, nos grupos tratados com OA por 48 horas, a razão PGE₂/PGF_{2 α} foi menor ($P = 0,0460$) quando as CT-1 foram suplementadas com 200 μ M e 500 μ M de OA ($0,62 \pm 0,06$ e $0,56 \pm 0,06$) comparado ao grupo controle ($0,82 \pm 0,06$ ng/ml). Com 72 horas, houve tendência na diminuição da razão PGE₂/PGF_{2 α} ($P = 0,0834$) apenas quando as CT-1 foram suplementadas com 500 μ M de OA ($0,62 \pm 0,10$) comparado ao grupo controle ($0,93 \pm 0,09$ ng/ml). Em conclusão, a suplementação de OA na concentração de 1000 μ M, diminui a síntese de PGF_{2 α} com 72 horas e aumenta a síntese de PGE₂ com 48 horas no cultivo *in vitro* de CT-1.

Figura 10 - Efeito da suplementação com 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M e 1000 μ M de OA e um grupo controle em meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na razão de PGE₂/PGF_{2 α} por 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).



7 DISCUSSÃO

No presente trabalho, verificou-se que a suplementação das CT-1 com OA é capaz de alterar a biossíntese das prostaglandinas. Conforme descrito anteriormente, um dos principais objetivos do estudo, era investigar a possibilidade do aumento da síntese de PGE₂ após a adição do ácido graxo no cultivo *in vitro* das CT-1, sendo essa hipótese confirmada nos grupos de suplementação com OA com 200 μ M, 500 μ M e 1000 μ M no tempo de 48 horas e também nos grupos com 50 μ M, 200 μ M e 1000 μ M no tempo de 72 horas. Uma possível explicação para o aumento das concentrações citadas pode estar relacionada com o fato de que prostaglandinas competirem pelos mesmos sistemas enzimáticos; e ao receberem a suplementação dos tratamentos, ocorreram alterações das concentrações de enzimas relevantes para a produção (LANDS, 1992). Uma vez que as CT-1 foram isoladas de blastocistos bovinos *in vitro* com 10 a 11 dias de desenvolvimento (período esse onde embriões produzem predominantemente PGE₂) era esperado que as concentrações de PGE₂ se demonstrassem superiores em relação as concentrações de PGF_{2 α} (HWANG et al., 1998), o que de fato foi evidenciado em nosso estudo, onde as concentrações alcançadas de PGE₂ foram superiores quando comparada a PGF_{2 α} ; sendo a PGE₂

benéfica para a manutenção do CL e estabelecimento da prenhez (BOWOLAKSONO et al., 2008).

A supressão de $\text{PGF2}\alpha$ é extremamente importante, pois esse é um dos principais hormônios durante a indução do evento denominado luteólise no ciclo estral de fêmeas bovinas (MCCRACKEN et al., 1999; DOMINGUES et al., 2020; ARAUJO et al., 2009). Apesar dos grupos 50 μM , 100 μM , 200 μM e 500 μM no tempo de 48 horas e 72 horas terem apresentado um aumento nas concentrações de $\text{PGF2}\alpha$, durante o tempo de 72 horas, foi possível observar uma diminuição na concentração de $\text{PGF2}\alpha$ no grupo de 1000 μM . Tal evidencia é muito interessante já que o início da prenhez bovina compreende a permanência da presença do CL, devido as produções de P4 , e uma falha na manutenção do CL resultaria em morte do embrião e perda da gravidez (WILTBANK et al., 2023).

Dentro do contexto da reprodução bovina, a razão das prostaglandinas E2 e $\text{F2}\alpha$ em relação as concentrações absolutas dos hormônios isolados também é extremamente importante (BAZER et al., 2009). Embora tenha sido possível observar um aumento de PGE2 e uma redução de $\text{PGF2}\alpha$ no grupo de suplementação com OA no meio de cultivo de CT-1 com 1000 μM , não alterou a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$. Uma possibilidade que justifique o ocorrido pode estar relacionada com o fato do OA ser capaz de estimular diretamente a síntese de PGE2 , porém sua competência em reduzir a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ seja menor em baixas concentrações, logo os dados conferem que não houve um aumento da razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$.

Um estudo realizado por Cheng et al. (2015), constatou que células endometriais de ovelhas expostas a baixas concentrações de OA (20 e 100 μM) por um período de 24 horas tiveram um aumento na síntese de PGE2 e $\text{PGF2}\alpha$ e duplicação na razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$. Diferente da linhagem materna utilizada por Cheng et al (2015), no presente estudo a linhagem utilizada tem origem embrionária e foram expostas por períodos maiores ao OA. O efeito observado foi favorável apenas na maior concentração utilizada (1000 μM) que aumentou a síntese de PGE2 e reduziu a síntese de $\text{PGF2}\alpha$, porém não alterou a razão de $\text{PGE2/PGF2}\alpha$. Com base no exposto, os dados apresentam que as linhagens celulares de origem embrionária e materna respondem de forma diferente ao AO; enquanto baixas concentrações mostraram benefícios em células de origem materna, células de origem embrionárias

mostram efeitos positivos quanto a síntese das prostaglandinas em concentrações mais altas de OA por períodos maiores de exposição.

Outro trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, intitulado como “Ácido oleico altera a expressão de transcritos envolvidos na síntese de prostaglandinas em células trofoblásticas bovinas cultivadas *in vitro*”, investigou a expressão de transcritos envolvidos na síntese de prostaglandinas após a adição do OA no cultivo *in vitro* das células trofoblásticas bovinas e os resultados encontrados comprovaram uma alteração na expressão da enzima AKR1B1 nas concentrações de 500 e 1000 μM de OA após 72 horas de exposição. A enzima AKR1B1, no contexto da produção de prostaglandinas, atua convertendo PGH2 em PGF2 α , logo sua diminuição é extremamente desejada, visando aumentar as chances de um reconhecimento materno da prenhez bem sucedido, visto que perdas gestacionais por mortalidade embrionária precoce impactam diretamente os sistemas de produção de carne e leite. De forma prática, a investigação de moléculas com o potencial de beneficiar a implantação embrionária são de grande relevância, pois o uso de biotecnologias como por exemplo a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) poderia ser aprimorado, aumentando suas taxas de sucesso ao fazer utilização de um embrião que recebeu um tratamento capaz de melhorar sua eficiência.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com ácido oleico na concentração de 1000 μM no meio de cultivo *in vitro* das células CT-1 é capaz de aumentar a síntese de PGE2 e diminuir a síntese de PGF2 α , mas não altera a razão de PGE2/PGF2 α .

REFERÊNCIAS

ABSALÓN-MEDINA, V. A. et al. 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**, v. 97, n. 10, p. 6164-6176, 2014.

ARAUJO, Reno R. et al. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 2, p. 426-437, 2009.

AROSH, J. A. et al. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2551-2560, 2004.

AROSH, Joe A.; BANU, Sakhila K.; MCCracken, John A. Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 7, p. 5926-5940, 2016.

BASAK, Sanjay; DUTTARROY, Asim K. cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid stimulates expression of angiopoietin like-4 in the placental extravillous trophoblast cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 4, p. 834-843, 2013.

BAZER, Fuller W. Establishment of pregnancy in sheep and pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 1, n. 3, p. 237-242, 1989.

BAZER, F. W. et al. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. **J. Reprod. Fertil. Suppl**, v. 43, p. 39-47, 1991.

BAZER, Fuller W.; OTT, Troy L.; SPENCER, Thomas E. Maternal recognition of pregnancy: Comparative aspects: A review. **Placenta**, v. 19, p. 375-386, 1998.

BAZER, Fuller W. et al. The many faces of interferon tau. **Amino Acids**, v. 47, p. 449-460, 2015.

BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A. Interferons and uterine receptivity. **Seminars in Reproductive Medicine**, [S.l.], v. 27, p. 90-102, 2009.

BILBY, T. R. et al. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 9, p. 3375-3385, 2006.

BÓ, Gabriel A.; BARUSELLI, Pietro Sampaio. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Animal**, v. 8, n. s1, p. 144-150, 2014.

BOWOLAKSONO, Anom et al. Anti-apoptotic roles of prostaglandin E2 and F2alpha in bovine luteal steroidogenic cells. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 2, p. 310-317, 2008.

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. **Placenta**, [S.l.], v. 36, p. 1011–1017, 2015.

CHENG, Z. et al. Effects of conjugated linoleic acid on prostaglandins produced by cells isolated from maternal intercotyledonary endometrium, fetal allantochorion and amnion in late pregnant ewes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1633, n. 3, p. 170-178, 2003.

CHENG, Z. et al. Alteration of prostaglandin production and agonist responsiveness by n-6 polyunsaturated fatty acids in endometrial cells from late-gestation ewes. **Journal of Endocrinology**, v. 182, n. 2, p. 249-256, 2004.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf**, [S.l.], v.8, p. 345–358, 2009.

DOMINGUES, Rafael R. et al. Up-regulation of endometrial oxytocin receptor is associated with the timing of luteolysis in heifers with two and three follicular waves. **Biology of Reproduction**, v. 102, n. 2, p. 316-326, 2020.

DUFFY, Diane M. et al. Ovulation: parallels with inflammatory processes. **Endocrine reviews**, v. 40, n. 2, p. 369-416, 2019.

DUNNING, Kylie R.; RUSSELL, Darryl L.; ROBKER, Rebecca L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v. 148, n. 1, p. R15-R27, 2014.

EALY, A. D.; LARSON, S. F.; LIU, L.; ALEXENKO, A. P.; WINKELMAN, G. L.; KABISH, H. M.; BIXBY, J. A.; ROBERTS, R. M. Polymorphic forms of expressed bovine interferon-tau genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. **Endocrinology**, [S.l.], 142, p. 2906-2915, 2001.

FARIN, C. E.; IMAKAWA, K.; ROBERTS, R. M. In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. **Molecular Endocrinology**, v. 3, n. 7, p. 1099-1107, 1989.

FELTRIN, I. R.; MALDONADO, M. C. B.; MENDES, A. F.; MEMBRIVE, C. M. B. Luteogênese e luteólise em fêmeas bovinas. **IMAST III International meeting of agrarian science and technology**. v. 3 p.280 - 301, 2021.

FERRETTI, C. et al. Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. **Human reproduction update**, v. 13, n. 2, p. 121-141, 2007.

FLINT, A. P. F. et al. Stimulation of phosphoinositide hydrolysis by oxytocin and the mechanism by which oxytocin controls prostaglandin synthesis in the ovine endometrium. **Biochemical Journal**, v. 237, n. 3, p. 797-805, 1986.

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.

GINTHER, O. J.; CAMPO, CH Del; RAWLINGS, C. A. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: a

local venoarterial pathway between uterus and ovaries in sheep. **American Journal of Veterinary Research** v. 34 p. 723-728, 1973.

GRAY, C. A. et al. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 124, n. 2, p. 289-300, 2002.

GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminantes. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S.l.], v. 49, p. 39-51, 1995.

GUILLOMOT, Michel et al. Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. **Biology of the Cell**, v. 68, n. 1-3, p. 205-211, 1990.

HANSEN, Thomas R.; SINEDINO, Leticia DP; SPENCER, Thomas E. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). **Reproduction**, v. 154, n. 5, p. F45-F59, 2017.

HENGARTNER, Michael O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HOMA, S. T.; RACOWSKY, C.; MCGAUGHEY, R. W. Lipid analysis of immature pig oocytes. **Reproduction**, v. 77, n. 2, p. 425-434, 1986.

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.

LANDS, William EM. Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. **The FASEB journal**, v. 6, n. 8, p. 2530-2536, 1992.

LEE, H.; PARK, W. J. Unsaturated fatty acids, desaturases, and human health. **J. Med. Food**, [S.l.], v.17, p. 189–197, 2014.

MCCRACKEN, John A.; CUSTER, Edward E.; LAMSA, Justin C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological reviews**, v. 79, n. 2, p. 263-323, 1999.

MEZERA, Megan A. et al. Profiles of prostaglandin F2 α metabolite in dairy cattle during luteal regression and pregnancy: implications for corpus luteum maintenance. **Biology of Reproduction**, v. 101, n. 1, p. 76-90, 2019.

MEZERA, Megan A. et al. Effect of natural pre-luteolytic prostaglandin F2 α pulses on the bovine luteal transcriptome during spontaneous luteal regression. **Biology of Reproduction**, v. 105, n. 4, p. 1016-1029, 2021.

MOUSSAVI, Alireza Heravi et al. Effects of conjugated linoleic acids on prostaglandin secretion by bovine endometrial epithelial cells in vitro. **american journal of veterinary research**, v. 74, n. 3, p. 491-498, 2013.

OKUDA, Kiyoshi; SAKUMOTO, Ryosuke. Multiple roles of TNF super family members in corpus luteum function. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1-10, 2003.

OKUDA, Kiyoshi et al. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 2065-2071, 2004.

OLOFSSON, Jan; LEUNG, Peter CK. Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 100, n. 1-2, p. 87-91, 1994.

PRATES, E. G. et al. Fatty acid composition of porcine cumulus oocyte complexes (COC) during maturation: effect of the lipid modulators trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (t 10, c 12 CLA) and forskolin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 49, p. 335-345, 2013.

PEREIRA, R. M. ; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E.; SANTOS, I. C.; MARQUES, M. R.; REIS, A.; PEREIRA, R. C.; RHODES, M. M.; MCCARTOR, R. D.; RANDEL; ROBINSON, M. D.; CISTOLA, D. P. Fat nanofluidity acid hydrocarbon chains monitored by bench-top timedomain nuclear magnetic resonance. **Bioquímica**, [S.l.], v. 53, p. 7515-7522, 2014.

PRU, James K.; TILLY, Jonathan L. Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 845-853, 2001.

MATTOS, Ricardo et al. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon- τ modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F $_{2\alpha}$ and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 3, p. 780-787, 2003.

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. 1072–81, 2013.

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 of interferon tau during early pregnancy in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, [S.l.], v. 73, p. 470-474, 2006.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacol. Ther.**, New York, v. 83, p. 217-244, 1999.

ROBERTS, R. Michael et al. Interferons and the maternal–conceptus dialog in mammals. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2008. p. 170-177.

Sartori, R. "Fertilização e morte embrionária em bovinos." **Acta Scientiae Veterinariae** 32 (2004): 35-50.

SCAFFIDI, Carsten et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **The EMBO journal**, v. 17, n. 6, p. 1675-1687, 1998.

SMITH, William L.; DEWITT, David L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and-2. **Advances in immunology**, v. 62, p. 167-215, 1996.

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.

SPENCER, Thomas E. et al. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v. 128, n. 6, p. 657-668, 2004.

SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. **BSAP Occasional Publication**, v. 26, n. 1, p. 93-104, 2001.

STINSHOFF, Hanna et al. Dimethylsulfoxide and conjugated linoleic acids affect bovine embryo development in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 4, p. 502-510, 2014.

TILLY, Jonathan L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of reproduction**, v. 1, n. 3, p. 162-172, 1996.

THATCHER, W. W. et al. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. suppl_3, p. 16-30, 1994.

VANROOSE, Geert; DE KRUIF, Aart; VAN SOOM, Ann. Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 131-143, 2000.

Waters SM, Child S, Creenan JM, Hennessy AA, Stanton C, Kenny DA. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on uterine endometrial gene expression in cattle. **6th ARK-Genomics Farm Animal Functional Genomics Workshop. Cambridge, UK; 2006.**

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. Claire; ABAYASEKARA, D. Robert E.; AITKEN, R. John. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 2, p. 190-201, 2007.

WILTBANK, Milo C. et al. Maintenance of the ruminant corpus luteum during pregnancy: interferon-tau and beyond. **animal**, v. 17, p. 100827, 2023.

WU, Yuh-Lin; WILTBANK, Milo C. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 gene in ovine large luteal cells. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1565-1572, 2001.