

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Valeska de Castro Lourenço

Médica Veterinária

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO OLEICO E
LINOLEICO CONJUGADO NA SECREÇÃO DE
PROSTAGLANDINA E₂ E F_{2α} EM CÉLULAS
TROFOBLÁSTICAS BOVINAS**

Dracena - SP

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA**

Valeska de Castro Lourenço

Médica Veterinária

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO OLEICO
E LINOLEICO CONJUGADO NA SECREÇÃO DE
PROSTAGLANDINA E₂ E F_{2α} EM CÉLULAS
TROFOBLÁSTICAS BOVINAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – UNESP, Câmpus de Dracena, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive
Coorientadora: Dra. Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado

Dracena - SP

2022

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

L892e

Lourenço, Valeska de Castro.

Efeitos da suplementação com ácido oleico e linoleico conjugado na secreção de prostaglandina E2 e F2 α em células trofoblásticas bovinas / Valeska de Castro Lourenço. -- Dracena: [s.n.], 2022.

72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2022.

Orientadora: Claudia Maria Bertan Membrive

Coorientadora: Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado

1. Ácidos graxos. 2. Ácidos graxos. 3. In vitro. 4. Bovino. I. Título.

Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas
CRB 8/6665



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO OLEICO E LINOLEICO CONJUGADO NA SECREÇÃO DE PROSTAGLANDINA E2 E F2 α EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS BOVINAS

AUTORA: VALESKA DE CASTRO LOURENÇO

ORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

COORIENTADORA: MARIÂNGELA BUENO CORDEIRO MALDONADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

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

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

Dra. PATRICIA KUBO FONTES (Participação Virtual)
Laboratório de Metabolismo e Epigenética Embrionar / Universidade Federal do ABC - UFABC

Dracena, 14 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VALESKA DE CASTRO LOURENÇO, Nascida em 4 de janeiro de 1995, na cidade de Adamantina - SP. Em 2013 ingressou no curso de Graduação no Centro Universitário de Adamantina (UNIFAI) em Adamantina - SP, em Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em julho de 2017. Durante a graduação, realizou estágio curricular na CAMDA Cooperativa Agropecuária, desenvolvendo práticas na área de Reprodução Animal. De 2018 a 2019, atuou como médica veterinária no Centro de Reprodução Equina (CH), em Adamantina - SP. Em março de 2020, ingressou no curso de Mestrado acadêmico em Ciência e Tecnologia Animal pela FCAT (UNESP), em Dracena - SP, sob orientação da Profa. Dra. Cláudia Maria Bertan Membrive. Desde 2020 vem atuando ativamente no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e Embrião - LIFE, situado na FCAT (UNESP), desenvolvendo as técnicas laboratoriais do cultivo de células trofoblásticas e embriões bovinos produzidos *in vitro*.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Aarão Lourenço Vieira** e **Iraci Galvão de Castro Lourenço**, que são fonte de inspiração e exemplo, e os grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui. Muito amor e gratidão por tê-los ao meu lado.

Aos meus avós, **Benjamim de Castro** e **Aparecida Galvão**, que oraram e me apoiaram. Eles foram incansáveis na preocupação com a minha formação pessoal e acadêmica. Sinto-me feliz em poder orgulhá-los com as minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

Em meio a tantas pessoas a quem quero agradecer esta conquista, prefiro iniciar agradecendo à **Deus**, pois sem a direção dada por ele esta dissertação não seria possível. Deus nunca me abandonou nos momentos de necessidade, grata por sempre ser generoso comigo.

Agradeço aos **meus pais**, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha trajetória acadêmica.

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.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio ao Programa.

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

A minha orientadora **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**, por ser uma constante fonte de motivação e incentivo ao longo de todo o projeto.

A minha coorientadora, **Dra. Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado**, pós-doutoranda junto ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras, UNESP Câmpus de Assis, pelo auxílio nos experimentos e pela imensa colaboração científica na realização deste estudo. Sem o seu apoio esse projeto de pesquisa não teria sido concluído com êxito.

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 (CT-1) e 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.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Pugliesi**, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na realização das mensurações por ELISA para a quantificação da PGF_{2α} e PGE₂ e pela valiosa ajuda nas análises estatísticas.

Ao meu amigo brilhante, doutorando **Adriano Felipe Mendes**, agradeço o suporte e por ter me ensinando tanto durante a pesquisa.

Ao meu querido amigo, **Lucas de Oliveira Bezerra**, que contribuiu no planejamento e execução dos experimentos desenvolvidos. Graças a você a minha trajetória foi mais gratificante.

Ao meu irmão de alma, **Mateus Oliveira Mena**, por caminhar comigo durante a Graduação e Pós-Graduação e por sempre me incentivar a ir mais longe.

A minha amiga do laboratório vizinho, **Camila Araújo**, obrigada pelo companheirismo e principalmente pela amizade construída ao longo desses anos.

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.

A todos os **técnicos de laboratório da UNESP de Dracena**, pela gentileza e presteza nas atividades realizadas.

“Estou certo de que nós somos os senhores do nosso destino, de que a tarefa que foi colocada diante de nós está acima das nossas forças, de que suas dores e provações não estão acima da nossa resistência. Enquanto tivermos fé na nossa causa e um desejo indestrutível de vencer, a vitória não nos será negada”.

Winston Churchill

RESUMO

A mortalidade embrionária precoce, ocasionada por falhas no reconhecimento materno-fetal (RMF) nas primeiras três semanas após a fertilização, representa a maior causa de ineficiência reprodutiva em fêmeas bovinas de corte. Estratégias que favoreçam tal reconhecimento baseiam-se em reduzir a capacidade de síntese da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo conceito, incluindo o aumento da síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2). A PGE_2 , sintetizada pelo endométrio materno e células trofoblásticas do conceito, determina efeitos anti-luteolíticos e luteotróficos que favorecem o RMF. O ácido oleico (OA) e o ácido linoleico conjugado (CLA), reconhecidamente determinam modificações na via metabólica do ácido graxo poliinsaturado n-6 na biossíntese de eicosanóides, incluindo as prostaglandinas. Tal efeito, não foi avaliado em células trofoblásticas bovinas (CT-1). Hipotetizou-se que a suplementação com OA ou CLA, no meio de cultura de CT-1 aumenta a síntese de PGE_2 , diminui a síntese de $PGF_{2\alpha}$ e aumenta a relação $PGE_2/PGF_{2\alpha}$, sendo tal efeito dose-dependente. Objetivou-se determinar os efeitos da suplementação com OA (50, 100, 200, 500, 1000 μM e grupo controle) ou CLA (10, 20, 50, 100 μM e grupo controle) por até 72 horas, no cultivo *in vitro* de CT-1, na síntese de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, mensuradas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Assim, células CT-1 foram cultivadas em garrafas de cultivo celular por 22 dias em incubadora umidificada a 38,5°C e 5% CO_2 até atingirem uma confluência de 100%. No 23º dia as CT-1 foram transferidas para placas de 6 poços com meio DMEM (1X) + GlutaMAX suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de antibiótico e antimicótico e 0,001% B-mercaptoetanol, onde foram cultivadas por 5 dias, até atingirem uma confluência de 50%. No 6º dia de cultivo, 24 horas antes da suplementação, o meio de cultivo foi substituído por meio sem SFB. No 7º dia, ao meio sem SFB foram adicionados os tratamentos com CLA ou OA. Amostras de meio de cultivo foram coletadas 48 e 72 horas após a adição de OA e 0, 24, 48 e 72 horas após a adição de CLA, acondicionadas em microtubos e armazenadas a -80°C para posterior análise das prostaglandinas por ELISA. Para cada ácido graxo foram realizadas 5 repetições, onde em cada repetição foi utilizado 1 poço/tratamento/para cada tempo avaliado. A análise estatística foi feita pelo PROC MIXED do SAS considerando efeito de concentração (tratamento) e o efeito randômico da repetição cultivada. Meios de cultivo de CT-1 suplementados com OA na concentração de 1000 μM por 72 horas apresentaram redução da síntese de $PGF_{2\alpha}$ e aumento da síntese de PGE_2 não tendo alterado a razão $PGE_2/PGF_{2\alpha}$, determinando um efeito dose-resposta. Meios de cultivo de CT-1 suplementados com CLA por 72 horas, em todas as doses testadas, apresentaram redução da síntese de $PGF_{2\alpha}$ e PGE_2 e aumento da razão $PGE_2/PGF_{2\alpha}$. Conclui-se que as suplementações utilizadas confirmam parcialmente a hipótese, enquanto o OA na concentração de 1000 μM aumenta a síntese de PGE_2 e diminui a síntese de $PGF_{2\alpha}$, o CLA aumenta a razão $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ em todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Reprodução. *In vitro*. Bovino.

ABSTRACT

Early embryonic mortality, caused by failures in maternal-fetal recognition three weeks after the fertilization is the leading cause of reproductive inefficiency in beef cattle. Strategies that favor such recognition are based on reducing the capacity of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) synthesis by the maternal endometrium and/or maximizing the anti-luteolytic stimulus induced by the conceptus, including the increase in prostaglandin E_2 (PGE_2) synthesis. The PGE_2 synthesized by the maternal endometrium and trophoblastic cells of the conceptus, determines the effects anti-luteolytic and luteotrophics that favor the RMF. Oleic acid (OA) and conjugated linoleic acid (CLA) are known to determine changes in the metabolic pathway of n-6 polyunsaturated fatty acid in the biosynthesis of eicosanoids, including prostaglandins. This effect was not evaluated in bovine trophoblastic cells (CT-1). The hypothesis is that supplementation with OA or CLA in the CT-1 culture medium increases PGE_2 synthesis, decreases $PGF_{2\alpha}$ synthesis and increases the $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ ratio, which is a dose-dependent effect. The objective was to determine the effects of supplementation with OA (0, 50, 100, 200, 500, 1000 μ M) or CLA (0, 10, 20, 50 and 100 μ M) for up to 72 hours, in cultivation in vitro of CT-1, in the synthesis of PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$, measured by enzyme immunosorbent assay (ELISA). So, CT-1 cells were cultured in Cell cultivation bottles for 22 days in a humidified incubator at 38.5°C and 5% CO₂ until reaching 100% confluence. On the 23rd day, CT-1 were transferred to 6-well plates with DMEM (1X) + GlutaMAX medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 1% antibiotic and antimycotic and 0.001% B-mercaptoethanol, where they were grown for 5 days, until reaching 50% confluence. On the 6th day of cultivation, 24 hours before supplementation, the culture medium was replaced by medium without SFB. On the 7th day, in the medium without SFB were added to the treatments with CLA or OA. Samples of culture medium were collected 48 and 72 hours after the addition of OA and 0, 24, 48 e 72 hours after the addition of CLA, placed in microtubes and stored at -80°C for further analysis of prostaglandins by ELISA. For each fatty acid, 5 replicates were performed, where 1 well/treatment/for each time evaluated was used in each replicate. Statistical analysis was performed by PROC MIXED of SAS considering concentration effect (treatment) and random effect of cultured replicate. CT-1 culture media supplemented with OA at a concentration of 1000 μ M for 72 hours showed a reduction in $PGF_{2\alpha}$ synthesis and an increase in PGE_2 synthesis and did not change the $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ ratio, determining a dose-response effect. CT-1 culture media supplemented with CLA for 72 hours, at all doses tested, showed a reduction in the synthesis of $PGF_{2\alpha}$ and PGE_2 and an increase in the $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ ratio. It is concluded that the supplementations used partially confirm the hypothesis, while OA at a concentration of 1000 μ M increases the synthesis of PGE_2 and decreases the synthesis of $PGF_{2\alpha}$, CLA increases the $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ ratio at all concentrations tested.

Keywords: Fatty Acid. Reproduction. *In vitro*. Bovine.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 - Modelo hipotético..... | 20 |
| Figura 2 - Modelo da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 nas células endometriais, Adaptado por Oliveira (2013), Apud Cordeiro (2016)..... | 25 |
| Figura 3 - Modelo da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 em embriões bovinos..... | 26 |
| Figura 4 - Novo modelo descrito por (AROSH, J. A; BANU, S. K; MCCRACKEN, 2016) sobre a ação das prostaglandinas (PG) na manutenção do corpo lúteo e reconhecimento materno da prenhez (RMP) em fêmeas ruminantes..... | 27 |
| Figura 5 - Representação esquemática dos tratamentos de OA realizados nas CT-1..... | 33 |
| Figura 6 - Representação esquemática dos tratamentos de CLA realizados nas CT-1..... | 33 |
| Figura 7 - Matriz de membrana basal (Matrigel)..... | 34 |
| Figura 8 - Células CT-1..... | 36 |
| Figura 9 - Placas de cultivo..... | 37 |
| Figura 10 - Preparo das soluções de trabalho em diferentes concentrações de OA..... | 38 |
| Figura 11 - Preparo das soluções de trabalho em diferentes concentrações de CLA..... | 39 |
| Figura 12 - Modelo esquemático do preparo da curva padrão e das amostras do ELISA para mensuração de PGE_2 (OA)..... | 41 |
| Figura 13 - Modelo esquemático do preparo da curva padrão e das amostras do ELISA para mensuração de PGE_2 (CLA)..... | 42 |
| Figura 14 - O “pool” de amostras foi realizado com o intuito de obter a concentração ideal para cada ácido graxo (OA ou CLA)..... | 42 |
| Figura 15 - Modelo esquemático da placa de validação da curva padrão do ELISA..... | 43 |
| Figura 16 - Placa de validação da curva padrão do ELISA..... | 43 |
| Figura 17 - Modelo esquemático do preparo da curva padrão e das amostras do ELISA para mensuração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (OA)..... | 45 |
| Figura 18 - Modelo esquemático do preparo da curva padrão e das amostras do ELISA para mensuração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (CLA)..... | 46 |
| Figura 19 - Curva padrão do ELISA..... | 47 |
| Figura 20 - Média \pm erro padrão (ng/mL) das diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de OA (50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1000 μM , e o grupo controle) nos tempos 48 e 72 horas de tratamento..... | 48 |
| Figura 21 - Média \pm erro padrão (ng/mL) das diferentes concentrações de PGE_2 em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de OA (50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1000 μM e o grupo controle) nos tempos 48 e 72 horas de tratamento..... | 49 |
| Figura 22. Média \pm erro padrão (ng/mL) da razão das concentrações de $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de OA (50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1000 μM e o grupo controle) nos tempos 48 e 72 horas de tratamento..... | 50 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 23 - Média \pm erro padrão (ng/mL) das diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de CLA (10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM e o grupo controle) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento..... | 51 |
| Figura 24 - Média \pm erro padrão (ng/mL) das diferentes concentrações de PGE_2 em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de CLA (10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM e o grupo controle) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento..... | 52 |
| Figura 25 - Média \pm erro padrão (ng/mL) da razão das concentrações de $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de CLA (10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM e o grupo controle) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento..... | 53 |
| Figura 26 - Sumarização dos resultados com OA..... | 54 |
| Figura 27 - Sumarização dos resultados com CLA..... | 54 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volumes pipetados (μL) das diferentes soluções que compreendem o ELISA (matriz, amostra, marcador e anticorpo) nos tubos branco, NSB, BO, curva padrão e amostras.....

43

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|--------------------------------------|
| °C | Graus Celsius |
| μM | Micromolar |
| μL | Microlitro |
| AA | Ácido araquidônico |
| AGIs | Ácidos graxos insaturados |
| AGPI | Ácidos graxos poliinsaturados |
| LA | Ácido linoleico |
| BEND | Células endometriais bovinas |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| CBR1 | Carbonil redutase 1 |
| CL | Corpo Lúteo |
| CLA | Ácido linoleico conjugado |
| COX-2 | Ciclooxigenase-2 |
| CT1 | Células trofoblásticas tipo 1 |
| DHA | Ácido docosahexaenóico |
| DMEM | Meio de Dulbecco Modificado |
| E2 | Estradiol |
| EGF | Crescimento epidermal |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| EPA | Ácido eicosapentanóico |
| IATF | Inseminação artificial em tempo fixo |
| IGF-II | Insulina tipo II |
| INT-t | Interferon-tau |
| LA | Ácido linoleico |
| LH | Hormônio luteinizante |
| MMP | Metaloproteinase de matriz |
| MUFA | Ácido graxo monoinsaturado |
| OA | Ácido oleico |
| OT | Ocitocina |
| P₄ | Progesterona |
| PG | Prostaglandina |
| PGE₂ | Prostaglandina E ₂ |
| PGF_{2α} | Prostaglandina F ₂ alfa |
| PGI₂ | Prostaglandina I ₂ |
| PGs | Prostaglandinas |

| | |
|----------------|---|
| PIV | Produção de embriões <i>in vitro</i> |
| PKA | Proteína quinase A |
| PKC | Proteína quinase C |
| PLA2 | Fosfolipase A ₂ |
| PTGDR | Receptor 1 da prostaglandina D1 |
| PTGE2 | Receptor 2 da prostaglandina E ₂ |
| PTGE3 | Prostaglandina E sintase 3 |
| PTGE4 | Receptor 4 da prostaglandina E4 |
| PTGES | Prostaglandina E sintase |
| PTGFR | Receptor de prostaglandina F |
| PTGS1 | Prostaglandina-endoperóxido sintase 1 |
| PTGS2 | Prostaglandina-endoperóxido sintase 2 |
| R1 | Repetição 1 |
| R2 | Repetição 2 |
| SCD | Delta-9 dessaturase |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SGAL 15 | Galectina-15 |
| SLCO2A1 | Proteína transportadora de membrana |
| TBXA2 | Receptor TXA ₂ |
| TETF | Transferência de embriões em tempo fixo |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 18 |
| 2 HIPÓTESE..... | 19 |
| 3 OBJETIVOS..... | 20 |
| 3.1 Objetivos Específicos..... | 20 |
| 4 REVISÃO DE LITERATURA..... | 20 |
| 4.1 Mortalidade Embrionária Precoce em Fêmeas Bovinas de Corte..... | 20 |
| 4.2 Participação das Células Trofoblásticas no Reconhecimento Materno-Fetal..... | 21 |
| 4.3 Biossíntese e Secreção de Prostaglandinas..... | 24 |
| 4.4 Características do CLA e OA..... | 28 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS..... | 30 |
| 5.1 Local do Experimento..... | 30 |
| 5.2 Obtenção e Origem das Células Trofoblásticas Bovinas (Linhagem CT-1).... | 31 |
| 5.3 Delineamento Experimental..... | 32 |
| 5.4 Preparação da Matriz de Membrana Basal Matrigel..... | 34 |
| 5.5 Propagação das CT-1..... | 35 |
| 5.6 Cultivo das CT-1 e Aplicação dos Tratamentos com OA e CLA..... | 36 |
| 5.7 Preparo da Solução Estoque de OA e das Soluções com as Diferentes Concentrações Utilizadas nos Tratamentos..... | 37 |
| 5.8 Preparo da Solução Estoque de CLA e das Soluções com as Diferentes Concentrações Utilizadas nos Tratamentos..... | 38 |
| 5.9 Coleta do Meio e das CT-1..... | 39 |
| 5.10 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)..... | 39 |
| 5.10.1 ELISA para PGE₂..... | 39 |
| 5.10.1.1 Pré-preparo para o ensaio de ELISA..... | 39 |
| 5.10.1.2 Preparo da validação da curva padrão e das amostras do ELISA para PGE₂ para OA..... | 40 |
| 5.10.1.3 Preparo da validação da curva padrão e das amostras do ELISA para PGE₂ para o CLA..... | 41 |
| 5.10.2 ELISA para PGF_{2α}..... | 44 |
| 5.10.2.1 Preparo da validação da curva padrão e das amostras do ELISA para PGF_{2α} para o OA..... | 44 |

| | |
|---|----|
| 5.10.2.2 Preparo da validação da curva padrão e das amostras do ELISA para $\text{PGF}_{2\alpha}$ para o CLA..... | 45 |
| 5.11 Análise estatísticas..... | 45 |
| 6 RESULTADOS..... | 47 |
| 6.1 Efeito da Suplementação com OA Sobre a Síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com 48 e 72 Horas..... | 47 |
| 6.2 Efeito da Suplementação com OA Sobre a Síntese de PGE_2 com 48 e 72 Horas..... | 48 |
| 6.3 Efeito da Suplementação com OA na Razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ com 48 e 72 Horas | 49 |
| 6.4 Efeito da Suplementação com CLA Sobre a Síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com 0, 24, 48 e 72 Horas | 50 |
| 6.5 Efeito da Suplementação com CLA Sobre a Síntese de PGE_2 com 0, 24, 48 e 72 Horas..... | 51 |
| 6.6 Efeito da Suplementação com CLA na Razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ com 0, 24, 48 e 72 Horas..... | 53 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 55 |
| 8 CONCLUSÃO..... | 58 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 59 |

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais fatores que comprometem a eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas de corte é a mortalidade embrionária precoce, ocasionada por falhas no reconhecimento materno-fetal (RMF), no período compreendido entre 15 e 17 dias após a fecundação (BINELLI *et al.*, 2001). Para o sucesso no estabelecimento da prenhez, o concepto (embrião e membranas anexas) deve produzir competentemente moléculas que interagem com o endométrio inibindo a síntese de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e a luteólise. Tal ação, preserva funcionalmente e estruturalmente o corpo lúteo (CL), mantendo altas concentrações de progesterona (P_4) circulantes (GOFF, 2002).

O interferon-tau (IFN-t), sintetizado e secretado pelas células trofoblásticas do concepto, foi caracterizado como o principal fator envolvido no RMF na espécie bovina (ROBINSON *et al.*, 2006; EALY; YANG, 2009). Quando o concepto produz de maneira competente o IFN-t, o endométrio apresenta a síntese de $PGF_{2\alpha}$ suprimida enquanto registra-se um aumento na síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2). Na ocorrência de um RMF bem-sucedido, a síntese de PGE_2 é aumentada no endométrio e nas células trofoblásticas do embrião e concepto. A PGE_2 exerce efeitos anti-luteolíticos e luteotróficos, ambos fundamentais para o êxito da prenhez (McCRACKEN *et al.*, 1999).

O IFN-t e a PGE_2 , ambos de ação luteotrófica, garantem a permanência do CL e manutenção de altas concentrações circulantes de P_4 , condição fundamental para o estabelecimento da prenhez (BINELLI *et al.*, 2015; TANIKAWA *et al.*, 2005). Na incapacidade do concepto em promover tais ações coordenadas, será determinada a luteólise e a mortalidade embrionária precoce. Assim, estratégias capazes de reduzir a capacidade da síntese de $PGF_{2\alpha}$ e aumentar a síntese de PGE_2 pelo endométrio, embrião e/ou concepto se tornam de grande interesse econômico.

Desde 2007, nosso grupo de pesquisa investiga os efeitos da suplementação lipídica especificamente a semente de girassol, fonte rica em ácido linoleico (LA), na taxa de concepção de fêmeas bovinas. Verificou-se em vacas suplementadas por 22 dias com tal semente, a partir da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e da transferência de embriões em tempo fixo (TETF), que a taxas de prenhez foram aumentadas em 18% comparado ao grupo controle (CORDEIRO *et al.*, 2014). O grupo investiga por quais mecanismos, tal suplementação favoreceria a taxa de

preñez. Pelos estudos conduzidos previamente pelo grupo, especula-se que possivelmente os mecanismos fisiológicos determinantes no aumento da taxa de preñez, se restrinjam ao concepto e microambiente uterino.

O consumo de dietas com ácido linoleico conjugado (CLA) sabidamente podem afetar a via metabólica do ácido graxo poliinsaturado n-6 por meio da biossíntese de eicosanóides, inclusive as prostaglandinas. Conforme descrito por Moussavi et al. (2013), em bovinos, diferentes isômeros de CLA determinam efeitos na produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 . A recente identificação de ácido oleico (AO) como um biomarcador de sobrevivência blastomérica e pós-criopreservação em bovinos pode indicar os efeitos positivos também deste ácido graxo no desenvolvimento embrionário (AARDEMA et al., 2011). Os dois ácidos graxos mencionados, CLA e AO, apresentam potencial promissor para modular a síntese das prostaglandinas $\text{F}_{2\alpha}$ e E_2 .

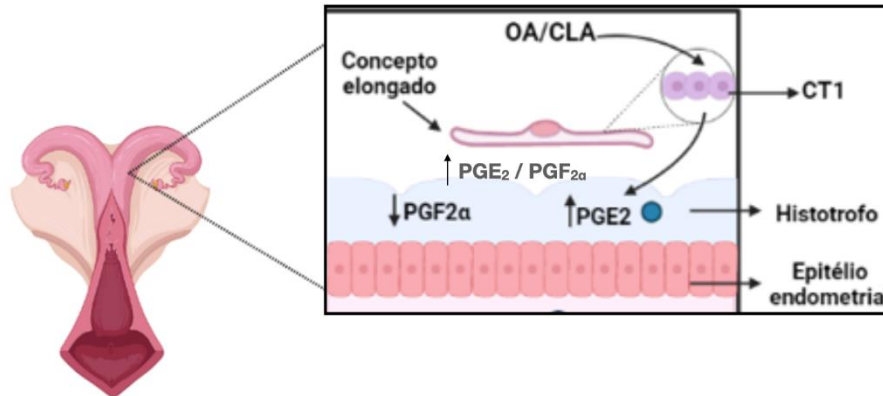
É reconhecido que o uso de diferentes ácidos graxos pode alterar a proporção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 produzidas nas células trofoblásticas em embriões e conceptos (HWANG et al., 1998). Portanto, considerando o impacto das perdas econômicas ocasionadas pela mortalidade embrionária precoce, a suplementação estratégica de lipídios objetivando o a redução da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o aumento da síntese de PGE_2 , assim com o aumento na relação $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ favoreceria o RMP e a redução em tal mortalidade.

As células trofoblásticas bovinas (CT-1) representam uma linhagem celular derivada de blastocistos produzidos *in vitro* com 10 a 11 dias de desenvolvimento (REXROAD; POWELL, 1999; TALBOT et al., 2000). Para avaliar tais efeitos no concepto o grupo tem utilizado dois modelos biológicos, o cultivo de células trofoblásticas e a produção *in vitro* de embriões bovinos. A hipótese é que a suplementação com OA ou CLA, 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. Para tanto, objetiva-se determinar os efeitos da suplementação com OA ou CLA, por até 72 horas no cultivo *in vitro* de CT-1, na síntese de PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$.

2 HIPÓTESE

A hipótese é que a suplementação com OA ou CLA, 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, conforme ilustrado na **Figura 1**.

Figura 1 - Modelo hipotético



Fonte: elaborado pela própria autora.

A hipótese é que a suplementação com OA ou CLA, no meio de cultura de CT-1 aumenta a síntese de PGE₂, diminui a síntese de PGF_{2α} e aumenta a relação PGE₂/PGF_{2α}, sendo tal efeito dose-dependente.

3 OBJETIVOS

Determinar os efeitos da suplementação com OA ou CLA no cultivo *in vitro* de CT-1 sobre a síntese de PGE₂ e PGF_{2α}.

3.1 Objetivos Específicos

Objetiva-se determinar os efeitos da suplementação com OA (0, 50, 100, 200, 500, 1000 μM) durante 48 e 72 horas ou CLA (0, 10, 20, 50 e 100 μM) durante 0, 24, 48 e 72 horas, no cultivo *in vitro* de CT-1, na síntese de PGE₂ e PGF_{2α}, mensuradas por ensaio de imun absorção enzimática (ELISA).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Mortalidade Embrionária Precoce em Fêmeas Bovinas de Corte

A mortalidade embrionária precoce é um dos principais fatores que contribuem para o insucesso reprodutivo em fêmeas bovinas de corte, conforme revisado por Santos et al. (2004) e Sartori (2004). No período específico, compreendido entre 15 e 17 dias após a fecundação (BINELLI *et al.*, 2001), relatou-se 20 a 40% de perdas na prenhez de fêmeas zebuínas (VANROOSE *et al.*, 2000).

O embrião se move do oviduto para a cavidade uterina no estágio de 8 a 16 células, ao redor do quarto dia de desenvolvimento (GREALY *et al.*, 1996). Com 5 a 6 dias de desenvolvimento embrionário o embrião atinge o estágio de 16 a 32 células, sendo denominado de mórula. A compactação celular e as junções intercelulares representam o primeiro estágio crítico, momento em que o embrião começa a atuar como um organismo individual. Nos dias 7 ou 8 do desenvolvimento embrionário se forma uma cavidade denominada blastocelo, onde as células do blastocisto inicial se diferenciam em massa celular interna e trofoblasto. A massa celular interna formará todos os tecidos do indivíduo e o trofoblasto promoverá o desenvolvimento dos anexos fetais (SREENAN *et al.*, 2001). Entre os dias 9 e 10, o blastocisto expandido eclode da zona pelúcida e continua sua expansão se caracterizando com uma estrutura alongada por volta do dia 14 de desenvolvimento. O alongamento do concepto é notório e contínuo até o dia 19 do desenvolvimento embrionário, e evidencia um grande desenvolvimento do trofoblasto decorrente da grande expansão das células trofoblásticas, sendo acompanhado por um aumento na atividade metabólica e na secreção de IFN-t por tais células (MANN *et al.*, 1999; THATCHER *et al.*, 2001). O IFN-t, sintetizado e secretado pelas células trofoblásticas do concepto, foi caracterizado como o principal fator envolvido no RMF na espécie bovina (ROBINSON *et al.*, 2006; EALY; YANG, 2009).

A sobrevivência do concepto e o estabelecimento da prenhez envolvem uma complexa comunicação ativa e passiva entre o concepto e o ambiente uterino materno. Na ocorrência de um RMF bem-sucedido, a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é suprimida e a de PGE_2 é aumentada no endométrio e nas células trofoblásticas do embrião e concepto, mecanismo determinante para o estabelecimento da prenhez (McCRACKEN *et al.*, 1999). Segundo Arosh *et al.* (2016), em fêmeas bovinas as células endometriais secretam $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 ao longo do ciclo estral, entretanto o padrão de secreção é diferenciado de acordo com as diferentes fases do ciclo estral. Miyamoto *et al.* (2005), demonstraram que a produção endometrial de PGE_2 é maior durante as fases lútea média e tardia do ciclo estral em bovinos. A PGE_2 exerce ações luteotróficas exercendo importante função imunológica na preservação do CL durante o RMF (REYNOLDS *et al.*, 2010). Na ausência da fertilização ou na incapacidade do concepto em sinalizar o RMF é determinada a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$

endometrial e a luteólise, mecanismos que determinam a mortalidade embrionária precoce.

4.2 Participação das Células Trofoblásticas no Reconhecimento Materno-Fetal

Durante o período de pré-implantação o blastocisto esférico se torna alongado adquirindo uma forma filamentosa que ocupa a maior parte do corno uterino ipsilateral a ovulação (SPENCER *et al.*, 2007). Em fêmeas bovinas, entre 14 e 16 dias de desenvolvimento, modificações morfológicas nas células trofoblásticas aliadas ao aumento de proliferação das mesmas, transformam o concepto esférico em uma estrutura alongada e filamentosa que ocupa a maioria da extensão do corno uterino ipsilateral a ovulação (BAZER, 1989; GUILOMOT, 1995; ROBINSON *et al.*, 2006). A rápida expansão das células trofoblásticas favorecem o aumento da área de superfície de contato de tais células com o epitélio uterino. Considera-se que quanto maior o alongamento e comprimento do concepto, maior a expansão das células trofoblásticas e, conseqüentemente, maior a biossíntese e secreção de IFN-t. A produção de IFN-t aumenta acentuadamente de 14 a 18 dias de prenhez coincidindo com a rápida alongação do concepto (EALY *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2006).

Durante o alongamento, o concepto é nutrido exclusivamente pela secreção endometrial, condição que persiste até que ocorra o estabelecimento da placentação. Em fêmeas bovinas, a adesão das células trofoblásticas ao útero não é evidente até 19 a 21 dias de prenhez, assim o único material nutritivo disponível ao concepto durante o período crítico se refere à coleção de secreção endometrial lançada no microambiente uterino, denominada de histotrofo.

Para compor a secreção epitelial endometrial ocorre o transporte seletivo de moléculas, especialmente fatores de crescimento, íons, glicose e aminoácidos para o lúmen uterino (SPENCER *et al.*, 2004a; SPENCER *et al.*, 2007). O histotrofo se caracteriza como a única fonte nutritiva para a proliferação das células trofoblásticas e alongação do concepto durante o período crítico (THATCHER *et al.*, 2001; INSKEEP; DAILEY, 2005). Assume-se que quanto mais enriquecido o histotrofo, maiores são as possibilidades de alongamento e produção de IFN-t pelo concepto. A migração das células trofoblásticas é fundamental para a reorganização e morfogênese das mesmas, que exercem um papel chave no desenvolvimento do concepto durante o período que antecede a adesão (GUILOMOT 1995; FERRETTI *et al.*, 2007; BAZER *et al.*, 2009). Vários fatores foram descritos como indutores da migração das células

trofoblásticas, dentre estes o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo II (IGF-II), galectina-15 (SGAL 15), WNTSA e periostina (HAYASHI *et al.*, 2007; FARMER *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008; AHN *et al.*, 2009; SIMMONS *et al.*, 2009; DILLY *et al.*, 2010).

O IFN-t secretado pelas células trofoblásticas exerce, por mecanismos parácrinos, o efeito de prevenir a secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (SPENCER *et al.*, 2004b; SPENCER *et al.*, 2007). As ações do IFN-t foram relacionadas por Arosh *et al.* (2016) e Pate (2020), onde nas células endometriais o IFN-t inibe os pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ requeridos para a luteólise, condição que preserva a estrutura vascular e o fluxo sanguíneo do CL. Complementando suas ações parácrinas, o IFN-t também 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 da PGE_2 . O IFN-t também exerce ações endócrinas, pois através da circulação materna é transportado ao CL, onde estimula genes que promovem um aumento na síntese de P_4 e genes que protegem o CL da luteólise. O IFN-t no CL reduz o RNAm de proteínas que medeiam a apoptose e aumenta o RNAm de proteínas envolvidas na angiogênese, promovendo a sobrevivência das células endoteliais e inclusive estimulando a maior vascularização do CL.

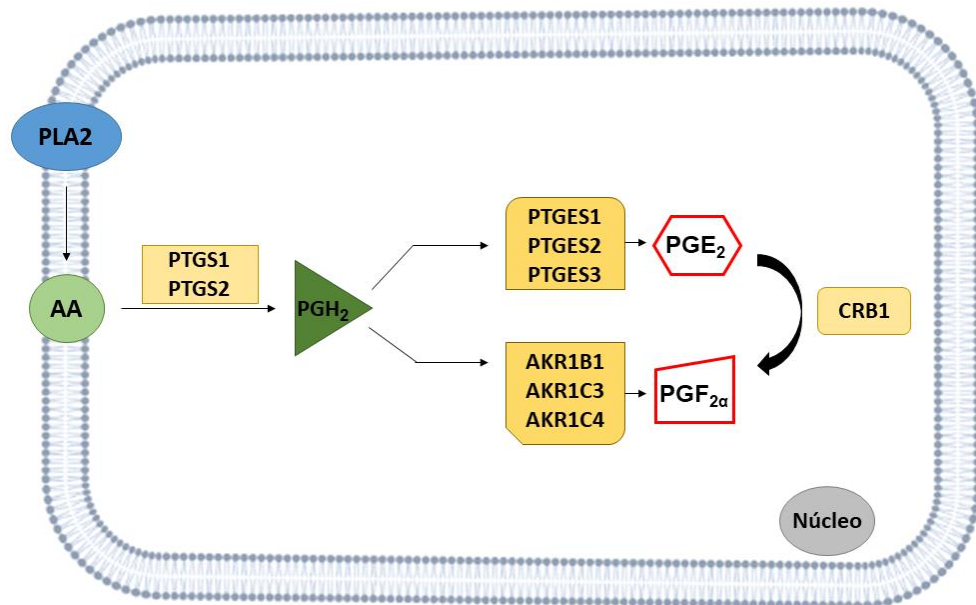
A PGE_2 , que tem sua síntese modulada pelo IFN-t, demonstrou ter uma importante ação luteotrófica determinando uma ação protetora na manutenção do CL promovendo o aumento da produção de P_4 nas células luteais, além de diminuir a sensibilidade do CL à ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. A PGE_2 aumenta no tecido luteal as concentrações de AMPc e a ativação da PKA, que atua estimulando a síntese de P_4 . Assim, no êxito do RMF, a prevenção da luteólise é reconhecidamente determinada pelas ações conjugadas e complementares do IFN-t e PGE_2 (AROSH *et al.* 2016; PATE, 2020).

Em outros estudos, o IFN-t demonstrou exercer efeitos promotores no desenvolvimento do concepto (KIM *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2006; BAZER *et al.*, 2009) através do aumento da expressão de proteínas transportadoras de glicose e aminoácidos, determinantes para a passagem de tais moléculas para o lúmen uterino (GAO *et al.*, 2009a; GAO *et al.*, 2009b), regulando a resposta imune sistêmica e uterina da prenhez (GIFFORD *et al.*, 2007; GIFFORD *et al.*, 2008) além de exercer ações na expressão gênica do CL (OLIVEIRA *et al.*, 2008; BOTT *et al.*, 2010).

4.3 Biossíntese e Secreção de Prostaglandinas

Os eicosanóides são metabólitos oxigenados dos ácidos graxos essenciais compostos por PGs, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. Grande parte dos eicosanóides relevantes derivam do ácido araquidônico (AA) através de diferentes vias de síntese. Em um modelo ilustrado e adaptado por Oliveira (2013), **Figura 2**. Um modelo celular da biossíntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir do AA foi descrito por Burns *et al.* (1997). A ativação dos OXTR leva a ativação da proteína G, que por sua vez ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC ativada cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (TYSSSELING *et al.*, 1997). O IP₃ liga-se aos seus receptores presentes no retículo endoplasmático, promovendo a abertura dos canais de cálcio, o que gera um aumento nas concentrações de cálcio no citosol da célula. Algumas enzimas presentes nesta cascata são dependentes de cálcio para sua ativação, dessa forma, o DAG na presença de cálcio, leva a uma cascata de ativação de proteínas quinases - PRKC α , PRKC β , PRKC γ (MELLOR; PARKER, 1998) e fosfolipase A₂ (PLA₂). Em seguida, a PLA₂ cliva o AA presente na membrana plasmática (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; TITHOF *et al.*, 2007). Assim, o AA livre no citosol é convertido através da ação da ciclooxigenase 2 (COX-2), a prostaglandina H₂ (PGH₂) é precursora de todos os prostanóides. A PGH₂ é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE₂; PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4) em $\text{PGF}_{2\alpha}$, 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ação da enzima AKR1C3, assim como a PGE₂ que pode ser convertida à $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ação da enzima CBR1. A seguir, 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao PTGFR; a PGD₂ ao PTGDR; a PGI₂ ao PTGIR e o tromboxano A₂ ao TBXAR2. A PGE₂ e $\text{PGF}_{2\alpha}$ podem entrar na célula alvo por transporte facilitado utilizando a proteína transportadora de membrana SLCO2A1 ou podem ser inativadas pela enzima PGDH. Uma vez que $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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 2 - Modelo da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 nas células endometriais, Adaptado por Oliveira (2013 *apud* CORDEIRO, 2016)

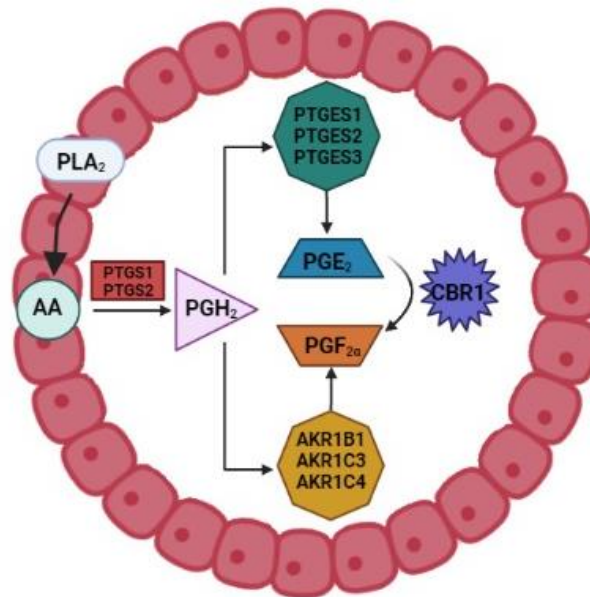


Fonte: elaborado pela própria autora.

Na célula endometrial a enzima fosfolipase citosólica A2 (PLA2) libera o ácido aracídico (AA) da membrana fosfolipídica, e este pode ser convertido pela ciclooxigenase 1 (PTGS1) ou ciclooxigenase 2 (PTGS2) à PGH_2 , precursora de todos os prostanóides. A PGH_2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE_2 , já a PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4) em $\text{PGF}_{2\alpha}$. Depois de sintetizadas, a PGE_2 que pode ser convertida à $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ação da enzima CBR1.

As PGs produzidas pelo embrião desempenham um papel fundamental no desenvolvimento embrionário inicial (LEWIS, 1989). O embrião pré-implantação produz muitas prostaglandinas incluindo $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 e PGI_2 . Hwang *et al.* (1998) estudaram o metabolismo do AA pelo embrião em diferentes fases da prenhez. Os mesmos autores, verificaram que os embriões bovinos produzem predominantemente PGE_2 antes do dia 12, PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ entre os dias 13 e 15 e adicionalmente PGI_2 após o dia 15 de desenvolvimento. O possível mecanismo de síntese de prostaglandina PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ encontra-se ilustrado na **Figura 3**. Possivelmente, a PLA2 cliva o AA presente na membrana, o AA é convertido pela COX-2 a PGH_2 . A PGH_2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE_2 . A PGH_2 é convertida pelas enzimas PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4) em $\text{PGF}_{2\alpha}$. A PGE_2 pode ser transformada em $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ação da enzima CBR1.

Figura 3 - Modelo da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 em embriões bovinos



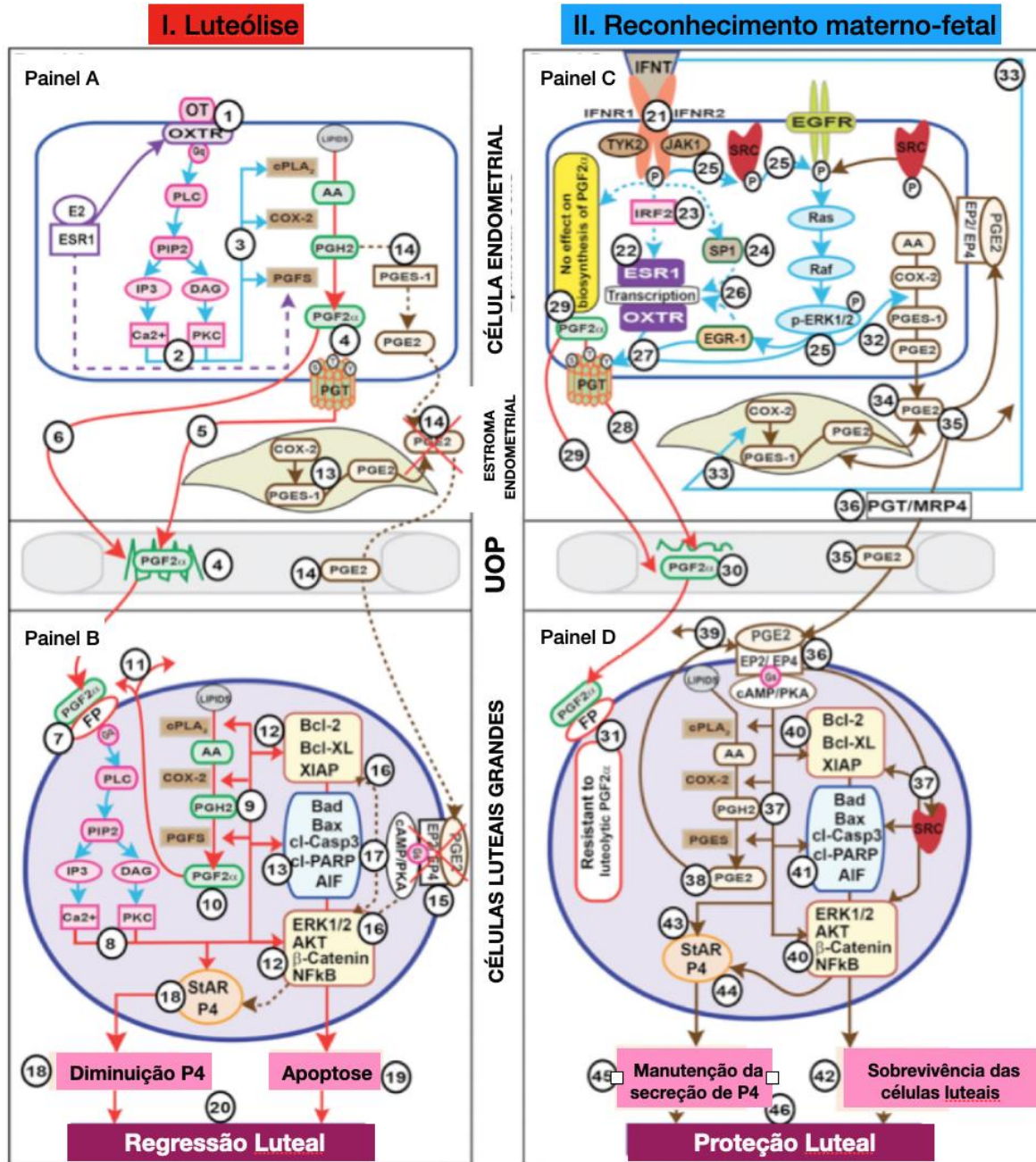
Fonte: elaborado pela própria autora.

A PLA_2 cliva o AA presente na membrana, o AA é convertido pela COX-2 a PGH_2 . A PGH_2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1 , PTGES2 ou PTGES3) em PGE_2 . A PGH_2 é convertida pelas enzimas PGF sintase (AKR1B1 , AKR1C3 , AKR1C4) em $\text{PGF}_{2\alpha}$. A PGE_2 pode ser transformada em $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ação da enzima CBR1 .

A PGE_2 e PGI_2 produzidas pelos embriões bovinos atuam de forma parácrina no endométrio, regulando a expressão de genes e funções importantes para a receptividade uterina, crescimento e desenvolvimento do conceito durante a fase inicial da prenhez. As PGE_2 e PGI_2 desempenham papéis importantes na função do CL, considerando que a adição dessas PGs ao CL aumentou a secreção de P_4 (TANIKAWA *et al.*, 2005).

A PGE_2 tem sido considerada como um fator de proteção para o CL, além de exercer ação luteotrófica (estimula a produção de P_4). Demonstrou-se que a administração intrauterina de PGE_2 protege o CL da luteólise espontânea ou induzida em fêmeas ruminantes (MAGNESS *et al.*, 1981). A PGE_2 contribui para a síntese de P_4 no CL, fundamental no êxito do estabelecimento da prenhez (WEEMS *et al.*, 2006; WEEMS *et al.*, 2007; WHATES *et al.*, 2007). Os mecanismos luteolíticos $\text{PGF}_{2\alpha}$, assim como o conjunto de ações luteotróficas exercidas pela PGE_2 , determinantes no reconhecimento materno fetal, estão representadas na **Figura 4**.

Figura 4 - Novo modelo descrito por (AROSH, J. A; BANU, S. K; MCCRACKEN, 2016) sobre a ação das prostaglandinas (PG) na manutenção do corpo lúteo e reconhecimento materno da prenhez (RMP) em fêmeas ruminantes.



Fonte: (AROSH, J. A; BANU, S. K; MCCRACKEN, 2016).

(I) Luteólise (Painel A): (1) A ocitocina (OT) se liga em seu receptor (OXTR), (2) ocorre a liberação de Ca^{+2} no citosol que ativa proteína kinase C (PKC); (3) a maquinaria enzimática para a biossíntese de $PGF2\alpha$ é ativada sequencialmente; (4) ocorre a produção de $PGF2\alpha$ na célula endometrial e pulsos de $PGF2\alpha$ são liberados pela célula endometrial; (5) a $PGF2\alpha$, é transportada através de proteínas transportadoras (PGT) pelo plexo útero-ovariano (UOP); (6) a $PGF2\alpha$ 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 $PGF2\alpha$ endometrial, a $PGF2\alpha$ se liga ao seu receptor (FP) presente nas células luteais grandes; (8) a ligação $PGF2\alpha$ -FP promove a liberação de Ca^{+2} no citosol que ativa PKC; (9) a maquinaria enzimática de biossíntese de $PGF2\alpha$ no CL é ativada sequencialmente; (10) produção de $PGF2\alpha$ pelas células luteais grandes; (11) por mecanismos autócrinos e parácrinos, ocorre uma auto amplificação da produção de $PGF2\alpha$ nas células luteais grandes; (12) $PGF2\alpha$ 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 $PGE2$ é suprimida no momento da luteólise; (15) a não ligação de $PGE2$, 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 resultará na (20) regressão funcional e estrutural do CL, evento denominado de luteólise.

(II) Reconhecimento materno-fetal (Painel C): (21) o interferon-tau (IFNT) se liga aos seus receptores específicos IFNR1 e IFNR2; (22) tal ligação suprime os receptores α de estrógeno (ESR-1) e os receptores de ocitocina (OXTR); (23) o Fator 2 regulador do IFNT (IRF-2) ou (24) proteínas específicas tipo 1 (SP1) sinalizam sequencialmente a cascata de IFNR e IRF2 ou SP1. Em paralelo, o IFNT 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 $PGF2\alpha$ do endométrio para o CL, através do UOP, não ocorre; (29) interessantemente o IFNT não inibe a produção basal de $PGF2\alpha$ endometrial, e a $PGF2\alpha$ pode ser transportada por um mecanismo independente de PGT ou por difusão simples do endométrio para o UOP, (30) a concentração basal de $PGF2\alpha$ nesse momento é registrada no UOP; (31) esta $PGF2\alpha$ atua ligando-se aos seus receptores (FP) nas células luteais grandes do CL no início da prenhez tornando estas células resistentes a ação luteolítica da $PGF2\alpha$; (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) e (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 IFNT ou a $PGE2$ produzida pelo endométrio e CL promove a resistência do CL em relação à $PGF2\alpha$ através de múltiplos mecanismos intracelulares que protegerão o CL da regressão durante o reconhecimento materno fetal.

4.4 Características do CLA e OA

O CLA é o termo geral utilizado para um grupo de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico (LA; C18:2n-6) (CHENG *et al.*, 2003; MOUSSAVI *et al.*,

2013). Os CLAs apresentam duplas ligações conjugadas, separadas apenas por uma ligação simples entre dois carbonos (GATTÁS; BRUMANO, 2005). Os CLAs podem ser sintetizados no rúmen, pela bactéria *Butyrovibrio fibrisolvens*, através da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados fornecidos na dieta. Sabe-se que os CLAs também podem ser sintetizados endogenamente através da dessaturação do ácido graxo C18:1 trans-11, realizada pela enzima esteroil-CoA dessaturase ou Delta-9 dessaturase (SCD), presentes na glândula mamária e tecido adiposo. Dentre ambas as possibilidades, o C18:1 trans 11 (ácido vacênico) é produzido principalmente através da biohidrogenação ruminal, caracterizando tal processo como a maior fonte de CLA em animais ruminantes (DONOVAN *et al.*, 2000; PARIZA *et al.*, 2001; CORL *et al.*, 2001; GATTÁS; BRUMANO, 2005; MOUSSAVI *et al.*, 2013).

Os isômeros do LA cis-9, trans-11 (c9, t11) e trans-10, cis-12 (t10, c12) são os tipos predominantes de CLA na gordura dos ruminantes e compõem de 80 a 90% do CLA total na gordura do leite, embora sua proporção no tecido adiposo seja menor (CHIN *et al.*, 1992; PARODI, 1997; SEHAT *et al.*, 1998; PARIZA *et al.*, 2001). Tais CLAs, foram utilizados com maior frequência em estudos nos quais os efeitos dos CLAs foram avaliados (MOUSSAVI *et al.*, 2013), principalmente em relação a deposição de gordura na carcaça de animais em crescimento, como suínos (OSTROWSKA *et al.*, 1999); ao desenvolvimento de tumores e modulação da resposta imune (PARIZA, *et al.*, 2001); a regulação de processos angiogênicos durante o início da prenhez (BASAK; DUTTAROY, 2013); nas modificações no metabolismo de eicosanóides e regulação da metaloproteinase de matriz (MMP) em tecido reprodutivo; e ao desenvolvimento embriões produzidos *in vitro* (STINSHOFF *et al.*, 2014; ABSALÓN-MEDINA *et al.*, 2014).

Os AGPI representantes da família ômega 6, especialmente o LA; C18:26; ômega 6) e os isômeros de CLA c9, t11 e t10, c12, reconhecidamente determinam modificações na biossíntese de eicosanóides incluindo as PG. Cheng *et al.* (2003), reportaram que o consumo de dietas compostas por CLA pode afetar a via metabólica do ácido graxo poliinsaturado n-6 para biossíntese de eicosanóides. Os CLAs podem ser metabolizados para formar trienos conjugados (C18:3 e C20:3) e um dos isômeros do ácido araquidônico (AA; C20:4). Tais compostos intermediários, através

da competição por dessaturação e sistemas de alongamento da cadeia de enzimas, podem diminuir a síntese de eicosanóides (CHENG *et al.*, 2003).

O OA, caracterizado com um ácido graxo monoinsaturado da família ômega 9, também foi relacionado com benefícios no contexto reprodutivo. Os ácidos graxos insaturados podem ser divididos em monoinsaturados (MUFA), com uma dupla ligação, ou poliinsaturados (AGPI), com múltiplas duplas ligações. A dupla ligação, quando ocorre em um ácido graxo natural, é sempre do tipo *cis* (BELL *et al.*, 1997). O ômega 9, também chamado de ácido oleico (OA, 18: 1 *cis* 9), é um ácido carboxílico de cadeia longa com 18 carbonos e um grupo funcional COOH. Por possuir uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 do grupo metil final, é chamado de ácido graxo monoinsaturado e sua fórmula química é $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ (ROSE; CONNOLLY, 1999). O OA se destaca por ser um dos principais ácidos graxos monoinsaturados nos extratos lipídicos de bovinos, ovinos e suínos (HOMA *et al.*, 1986; PRATES *et al.*, 2013; DUNNING *et al.*, 2014). Este ácido graxo pode ser sintetizado por todos os mamíferos, incluindo humanos, a partir dos AGPI ômega 3 e 6 provenientes da dieta (LEE; PARK, 2014; HAN *et al.*, 2017). Um único *cis*, a ligação dupla na posição 9, dá uma alta capacidade ao OA de solubilizar lipídios (PEREIRA *et al.*, 2014). O OA é um dos principais determinantes da fluidez da membrana plasmática (FUNARI *et al.*, 2003), e está associado a funções importantes, incluindo interação célula-célula, transporte de membrana, eventos de sinalização, regulação da temperatura do corpo, produção de hormônios sexuais, como o estrogênio e progesterona, além de contribuir para o aumento da absorção de vitaminas A, D, E e K e atuar como fonte de em funções metabólicas e estruturais (WARZYCH; 2017). Este ácido graxo 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). Além disso, OA pode ser diretamente ligado a proteínas, o que é conhecido como uma etapa importante no crescimento e diferenciação de vários tipos de células (RIOS-ESTEVEZ, 2013).

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 Obtenção e Origem das Células Trofoblásticas Bovinas (Linhagem CT-1)

As CT-1 utilizadas nesse estudo, foram obtidas da cultura de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com 10 a 11 dias de desenvolvimento, conforme técnica descrita por Rexroad e Powell (1999) e Talbot *et al.* (2000). Resumidamente, culturas primárias de blastocistos bovinos foram cultivadas em um meio de 1:1 de DMEM suplementado com 10% de SFB, 2-mercaptoetanol (0,1mM), aminoácidos não essenciais, L-glutamina e antibióticos e incubados em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 39,5 °C. As CT-1 foram cultivadas em placas de cultura de 4 poços (NUNC) contendo camadas de manutenção de células de fibroblastos de camundongo (STO). A passagem secundária das culturas das células foi feita por tratamento com tripsina-EDTA. O tratamento com tripsina-EDTA ou somente com EDTA foi considerado prejudicial para as células, e a passagem subsequente das culturas foi realizada apenas por desnudamento das camadas de células dos blastocistos, as camadas de células foram fragmentadas por repetidas aspirações com auxílio de uma pipeta sorológica. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação em um tubo Falcon. Depois de aspirar o meio, usando pipeta sorológica de 2 mL, o pellet foi ressuspendido em DMEM-199 a 10% e semeados em células alimentadoras STO. As CT-1 foram cultivadas continuamente por mais de 2 anos e 76 passagens com porções congeladas a cada 5-10 passagens. As passagens das CT-1 foram realizadas em diluição de 1:3 ou 1:5 para as primeiras 15 passagens e depois disso diluída em uma proporção de 1:10. Nenhuma mudança aparente na morfologia ou expressão de IFN-t ocorreu ao longo deste tempo. As CT-1 constituem, portanto, uma linhagem celular

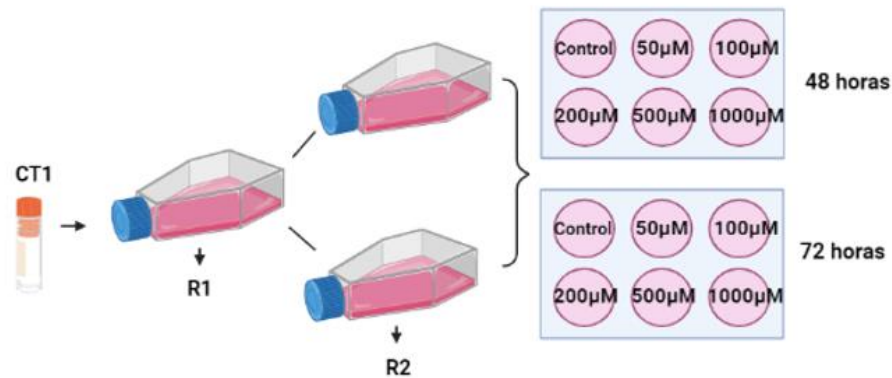
imortalizada. Após todo o procedimento relatado, as CT-1 passaram por análise citogenética, ensaio de atividade antiviral, análise por Immunoblotting do meio condicionado, microscopia eletrônica de transmissão e transfecção de DNA por cálcio/fosfato. Ocasionalmente foram encontrados grandes vacúolos lipídicos, embora o lipídio tenha sido frequentemente removido total ou parcialmente durante a preparação. Em geral, as CT-1 foram semelhantes ao trofoblasto bovino *in vivo* examinado a partir de blastocistos de pré-implantação expandidos.

As CT-1 utilizadas como modelo biológico nesse estudo, foram doadas pelo Prof. Dr. Alan Ealy da Virginia Tech, Blacksburg, VA, Estados Unidos, em colaboração ao Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e Embrião (LIFE), FCAT, UNESP, Dracena-SP. As CT-1 constituem um interessante modelo biológico de estudo para o maior entendimento dos mecanismos envolvidos no RMF que determinam o êxito no estabelecimento da prenhez. Para a obtenção de tais células foi estabelecida de uma parceria científica para a realização de um conjunto de experimentos em parceria com o Prof. Dr. Alan Ealy, que participou do isolamento de tais células.

5.3 Delineamento Experimental

Neste experimento, CT-1 foram cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de OA (50, 100, 200, 500 e 1000 μM , além do grupo controle; **Figura 5**) durante 48 ou 72 horas. As CT-1 foram submetidas a diferentes concentrações de CLA (10, 20, 50, 100 μM , e o grupo controle; **Figura 6**) durante 0, 24, 48 ou 72 horas. Para cada ácido graxo foram realizadas 5 repetições, sendo utilizado 1 poço de cultivo para cada tratamento e tempo avaliados.

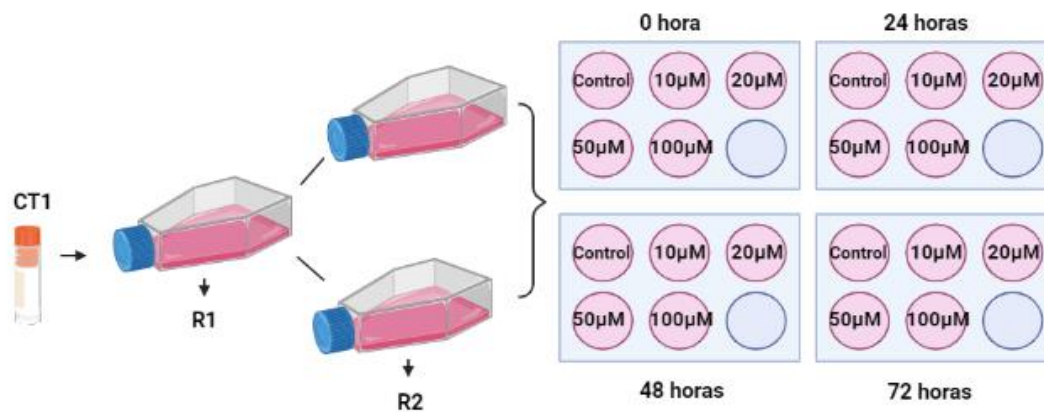
Figura 5 - Representação esquemática dos tratamentos de OA realizados nas CT-1



Fonte: elaborado pela própria autora.

As 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 antes da adição dos tratamentos com OA o meio de suplementação das CT-1 foi substituído por meio sem SFB. No 6º 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 °C até o momento do ELISA. As CT-1 foram coletadas e armazenadas a -80 °C para análises futuras. Foram realizadas 5 repetições experimentais.

Figura 6 - Representação esquemática dos tratamentos de CLA realizados nas CT-1



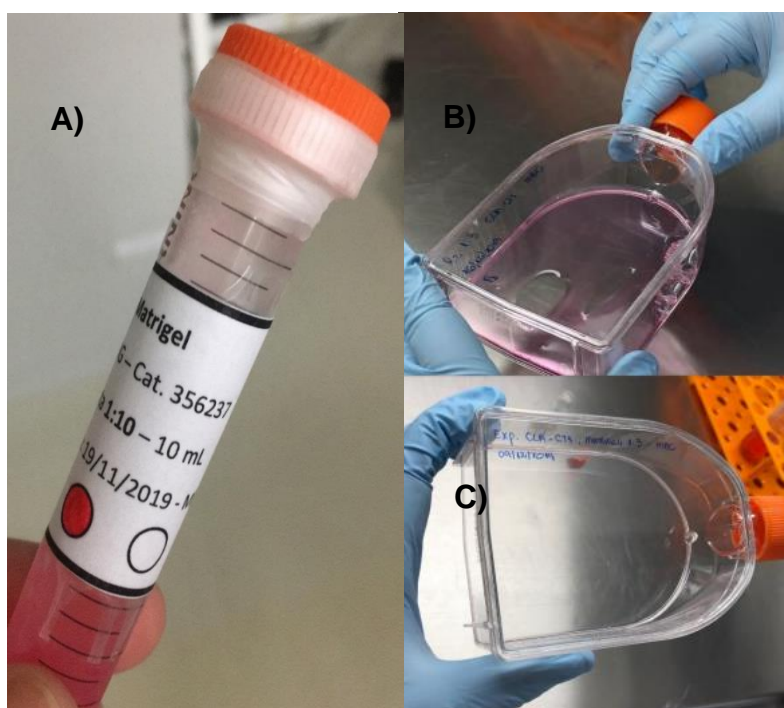
Fonte: elaborado pela própria autora

As 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 antes da adição dos tratamentos com CLA o meio de suplementação das CT-1 foi substituído por meio sem SFB. No 6º dia de cultivo os tratamentos com CLA foram adicionados nas concentrações 10, 20, 50 ou 100 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°C até o momento do ELISA. As CT-1 foram coletadas e armazenadas a -80 °C para análises futuras. Foram realizadas 5 repetições experimentais.

5.4 Preparação da Matriz de Membrana Basal Matrigel

O preparo da matriz está ilustrado na **Figura 7 A, B e C**. A matriz de membrana basal Matrigel® (Ref. 356237, BD Bioscience, Bedford, MA, USA), foi diluída a 1:3 e 1:10 em meio não suplementado com SFB, composto por 50 mL de DMEM (1X) + GlutaMAX™ –I (Gibco, Ref. 10569-010, Grand Island, NY, USA); 500 µL de solução antibiótica e antimicótica (100X) (Gibco, Ref. 15240062, Grand Island, NY, USA); e 500 µL de aminoácidos não essenciais, MEM NEAA (100X) (Gibco, Ref. 11140-050, Grand Island, NY, USA). Para a diluição 1:3, em 10 mL de Matrigel adicionaram-se 20 mL de meio não suplementado com SFB. Para a diluição 1:10, em 10 mL de Matrigel adicionaram-se 90 mL de meio não suplementado com SFB. A diluição 1:3 é foi utilizada apenas na primeira propagação das CT-1, imediatamente após o descongelamento das mesmas. Nas passagens celulares subsequentes a diluição de Matrigel utilizada foi de 1:10.

Figura 7 - Matriz de membrana basal (Matrigel)



Fonte: elaborado pela própria autora.

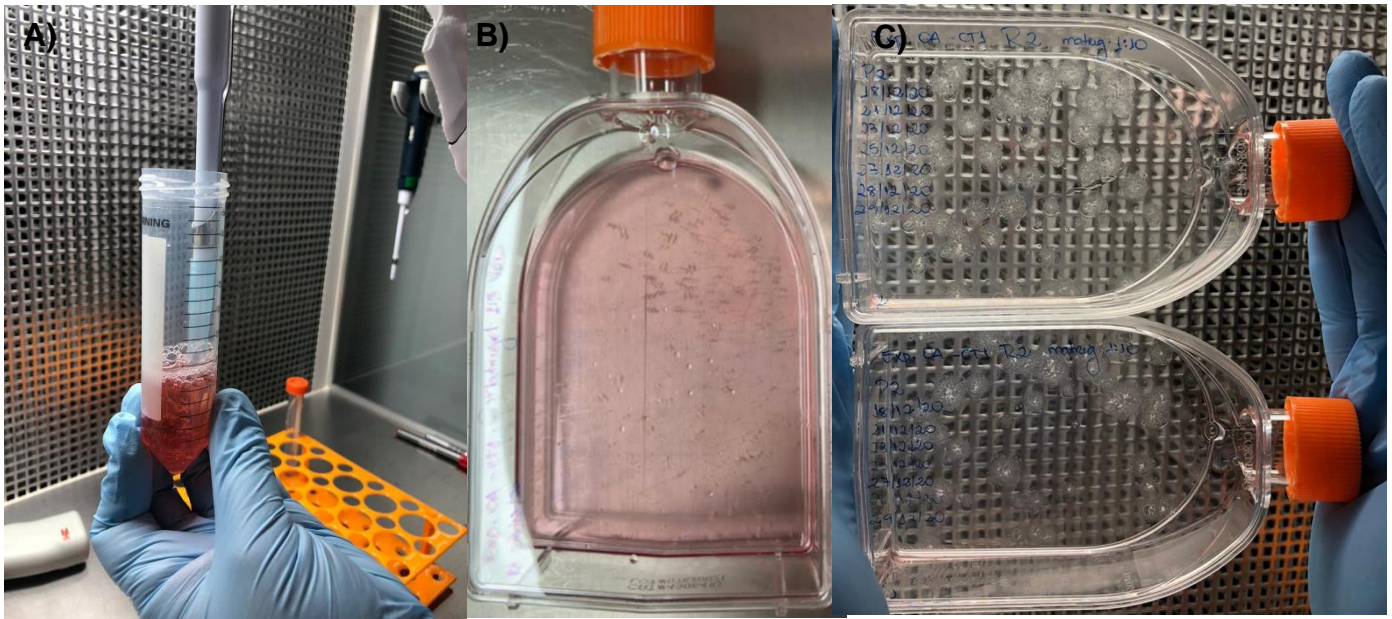
A) Matriz de membrana basal (Matrigel) alicotado em tubo Falcon contendo 10 mL. B) Matrigel em garrafas de cultivo de 75 cm². C) Matrigel em garrafas de cultivo de 75 cm², após duas horas de incubação à 38,5°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

5.5 Propagação das CT-1

Previamente ao descongelamento das CT-1, preparou-se a garrafa (R1) de cultivo de 75cm² (Corning, Ref. 430641U) com 15 mL de Matrigel diluída a 1:3, incubada (Panasonic, COM-19AIC(UV)) a 38,5 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 2 horas (**Figuras 8 A, B e C**). Posteriormente, as células contidas no interior de um criotubo, armazenado em nitrogênio líquido, foram descongeladas em água a 38°C por 3 minutos. Após descongelamento, as CT-1 foram ressuspensas em 15 mL de meio de cultivo suplementado com 10% de SFB (meio de manutenção), composto por 450 mL DEMEM (1X) + GlutaMAX TM –I (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); 5 mL de aminoácidos não essenciais, MEM NEAA(100X) (Gibco, Ref. 11140050, Grand Island, NY, USA); e 500 µL de 2-mecarptoetanol (1000X) (Gibco, Ref. 21985023, Grand Island, NY, USA). Depois da ressuspensão das CT-1, as mesmas foram adicionadas à garrafa (R1), 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, procedeu-se a troca de meio de manutenção a cada 48 horas 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 células foram transferidas para duas novas garrafas de cultivo (R2), previamente preparadas com Matrigel (1:10) contendo 15 mL de meio suplementado (**Figura 8**). Para o processo de ressuspensão as CT-1 foram removidas da garrafa de cultivo com auxílio de um “*cell scraper*”, raspando toda a superfície da garrafa de forma a promover o descolamento 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 18 G. O volume obtido foi dividido igualmente entre as duas garrafas R2. 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. As trocas do meio de manutenção foram realizadas a cada 48 horas. Após atingirem 100% de confluência, as CT-1 foram novamente ressuspensas e transferidas para placas de 6 poços (Corning, Ref. 3516, NY, USA) para realização dos tratamentos com OA ou CLA.

Figura 8 - Células CT-1



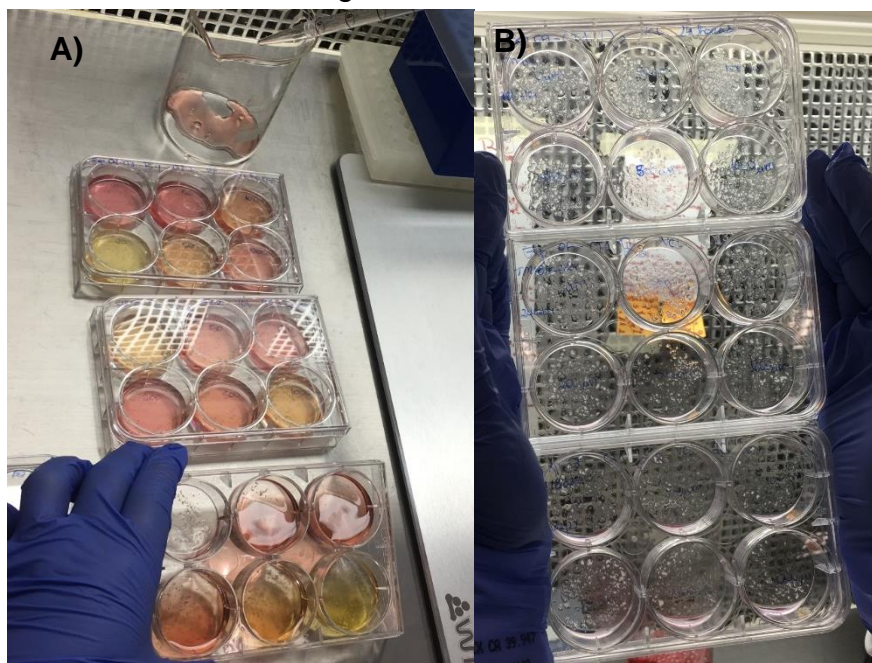
Fonte: elaborado pela própria autora.

A) Células CT-1 descongeladas e ressuspensas em tubo Falcon contendo 15 mL de meio suplementado. B) Dia 1 das CT-1 ressuspensas em garrafas de cultivo de 75 cm². C) CT-1 em desenvolvimento

5.6 Cultivo das CT-1 e Aplicação dos Tratamentos com OA e CLA

Após serem transferidas para as placas de 6 poços (**Figura 7**) as CT-1 foram incubadas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 5 dias, até atingirem 50% de confluência. No 4º dia de cultivo o meio de manutenção de cada poço foi retirado e substituído por 4 mL de meio não suplementado com SFB, adicionado dos componentes de solução antibiótica e antimicótica e aminoácidos não essenciais, como descrito no item 5.4. No 5º dia de cultivo, o meio de cada poço foi novamente retirado e substituído por 4 mL de meio não suplementado contendo os tratamentos com ou sem OA ou CLA.

Figura 9 - Placas de cultivo



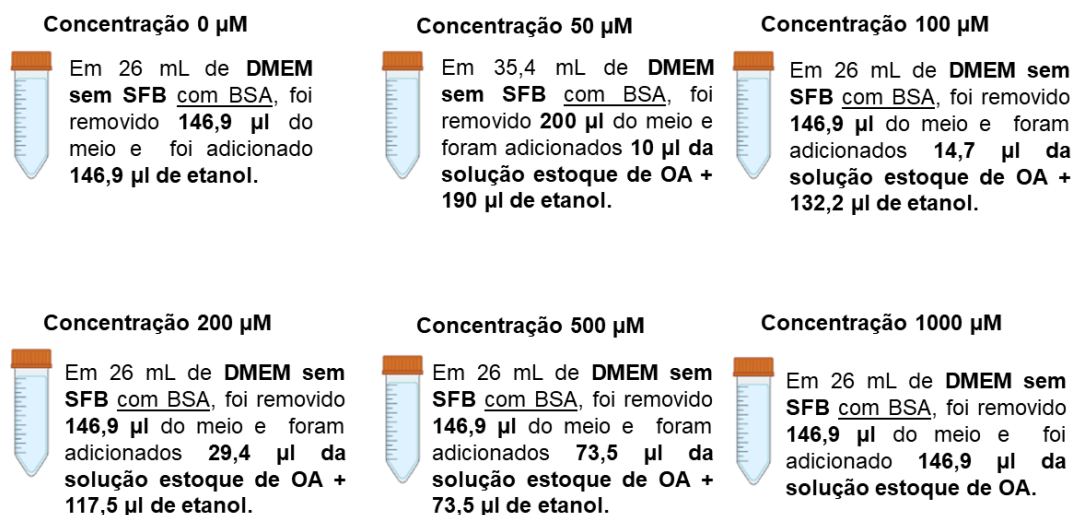
Fonte: elaborado pela própria autora.

A) Troca de meio suplementado das placas de cultivo. B) CT-1 com 50% de confluência, prontas para receber seus respectivos tratamentos.

5.7 Preparo da Solução Estoque de OA e das Soluções com as Diferentes Concentrações Utilizadas nos Tratamentos

Neste experimento utilizamos o OA (Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. O1383). Realizou-se o preparo da solução estoque do OA baseado no método descrito por Vanholder et. al (2005). Para a preparação da solução estoque do OA o conteúdo total da ampola (5g) foi diluído em etanol até completar o volume final de 100 mL, resultando em uma **solução estoque de 50 mg/mL ou 177.000 $\mu\text{M/mL}$** , considerando o peso molecular do OA de 282,46g. Então, essa solução estoque foi alíquotada em microtubos e armazenada a -20°C . No momento do uso, a solução estoque de OA foi descongelada e diluída em meio não suplementado (sem FBS), contendo 0,1125% de BSA como veículo, de forma a obter a concentração final desejada de 50, 100, 200, 500 ou 1000 μM e grupo controle, conforme representado na **Figura 10**.

Figura 10 - Preparo das soluções de trabalho em diferentes concentrações de OA



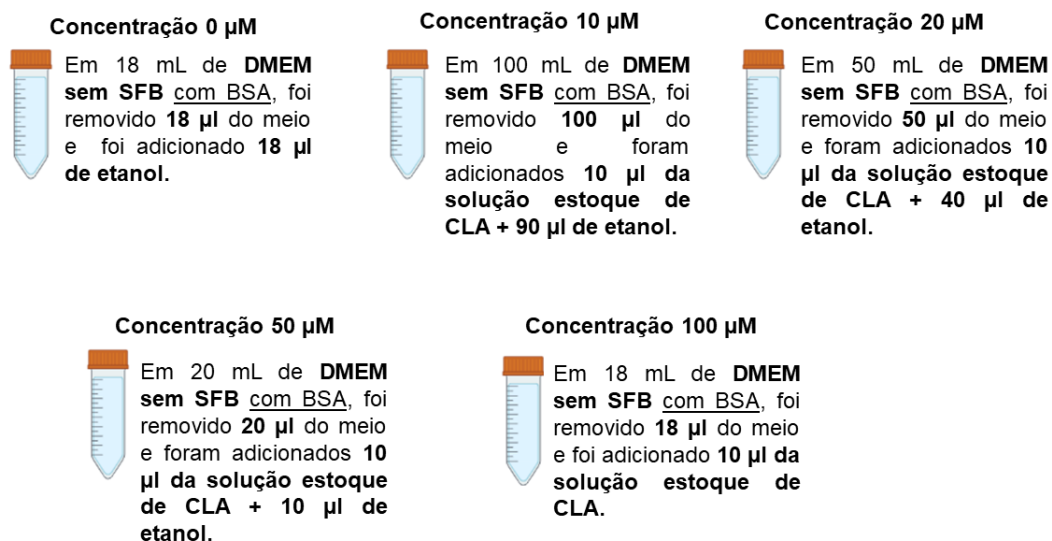
Fonte: elaborado pela própria autora.

Preparo das soluções de trabalho com meio não suplementado contendo 0,1125% de BSA como veículo em diferentes concentrações de OA (50, 100, 200, 500, 1000 µM e o grupo controle) para compor os tratamentos com a solução estoque e/ou etanol.

5.8 Preparo da solução estoque de CLA e das soluções com as diferentes concentrações utilizadas nos tratamentos

Neste experimento utilizamos o CLA (Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. O5507). Realizou-se o preparo da solução estoque do CLA baseado no método descrito por Vanholder et. al (2005). Para a preparação da solução estoque do CLA o conteúdo total da ampola (250 mg) foi diluído em 8,92 mL de etanol 100% até obter uma solução estoque de 100 mM, considerando o peso molecular do CLA 280,4g/mol. Então, essa solução estoque foi alíquotada em microtubos e armazenada a -20°C. No momento do uso, a solução estoque de OA foi descongelada e diluída em meio não suplementado (sem FBS), contendo 0,1125% de BSA como veículo, de forma a obter a concentração final desejada de 10, 20, 50 ou 100 µM e grupo controle, conforme representado na **Figura 11**.

Figura 11 - Preparo das soluções de trabalho em diferentes concentrações de CLA



Fonte: elaborado pela própria autora.

Preparo das soluções de trabalho com meio não suplementado contendo 0,1125% de BSA como veículo em diferentes concentrações de CLA (10, 20, 50, 100 μM e o grupo controle) para compor os tratamentos com a solução estoque e/ou etanol.

5.9 Coleta do Meio e das CT-1

Após a adição dos tratamentos contendo as diferentes concentrações de OA ou CLA os 4 mL/poço do meio de cultivo foram aspirados e alíquotados em 4 microtubos do tipo eppendorf livre de RNase e DNase (1 mL/microtubo). Em seguida, o meio de cultivo coletado foi centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C até o momento das análises.

5.10 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)

5.10.1 ELISA para PGE₂

5.10.1.1 Pré-preparo para o ensaio de ELISA

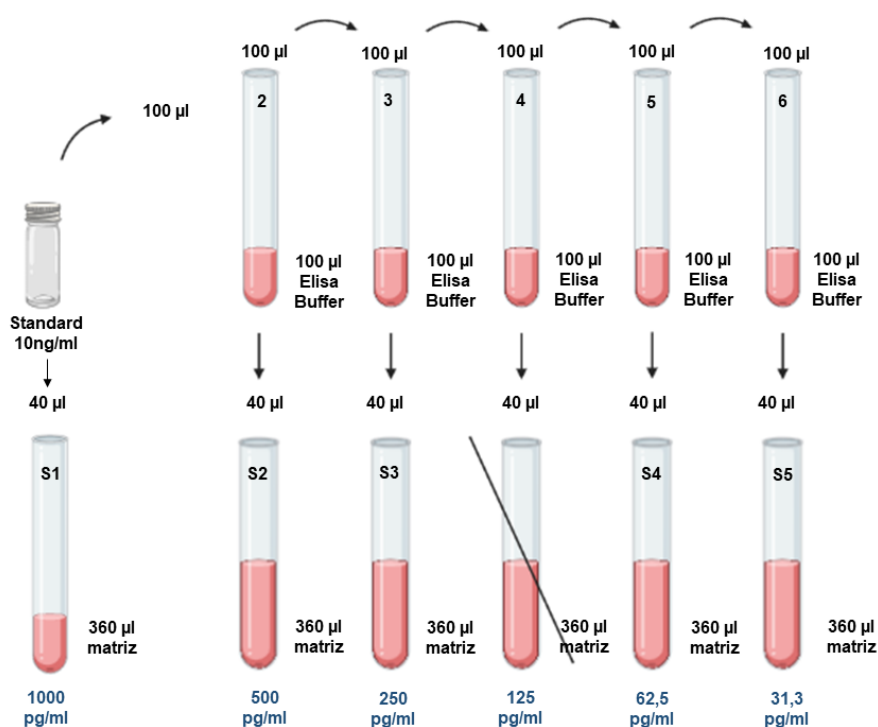
Para o ELISA para PGE₂ foi utilizado o kit *Prostaglandin E₂ ELISA kit – Monoclonal, Nº 514010 (Cayman Chemical)*. Os reagentes e buffers de cada kit foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Para preparo de todos os reagentes e buffers do ensaio de ELISA utilizou-se água deionizada e livre de contaminantes orgânicos – Água ultrapura (Milli-Q). A matriz utilizada no ensaio foi o meio de cultivo das células CT-1 não suplementado com SFB, descrito no item 5.4.

Para validação da curva padrão e das amostras, foram utilizadas 5 concentrações de OA (50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , ou 1000 μM), mais o grupo controle, nos tempos 48 ou 72 horas de tratamento em 5 repetições experimentais. Assim, o ensaio de validação compreendeu um total de 30 amostras por tempo de tratamento (5 repetições x 6 grupos experimentais x 1 tempo = 30 amostras). Para validação da curva padrão e das amostras, foram utilizadas 4 concentrações de CLA (10 μM , 20 μM , 50 μM ou 100 μM), mais o grupo controle, nos tempos 0, 24, 48 ou 72 horas de tratamento em 5 repetições experimentais. Assim, o ensaio de validação compreendeu um total de 25 amostras por tempo de tratamento (5 repetições x 5 grupos experimentais x 1 tempo = 25 amostras).

5.10.1.2 Preparo da validação da curva padrão e das amostras do ELISA para PGE₂ para OA

O *Standard* do kit de ELISA para PGE₂ apresenta-se em estado sólido. Assim, o *Standard* foi previamente diluído em 100 μL de *Eliza Buffer* para OA, conforme representado na **Figura 12**.

Figura 12 - Modelo esquemático do preparo da curva padrão e das amostras do ELISA para mensuração de PGE₂ (OA)



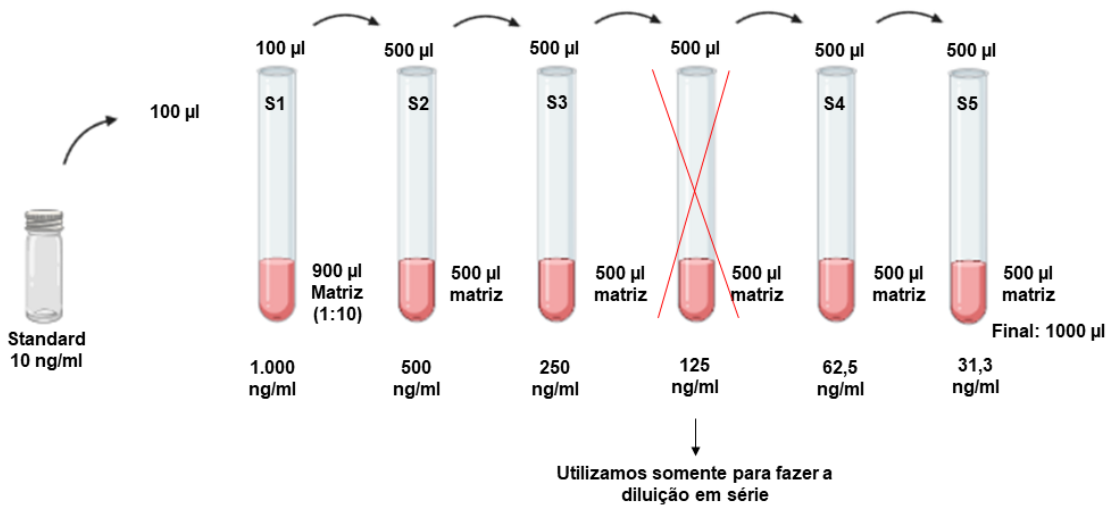
Fonte: elaborado pela própria autora.

100 µL de *Standard* foram transferidos para um tubo de ensaio (2) contendo 100 µL de ELISA Buffer, e assim sucessivamente, (3), (4), (5) e (6), todos contendo 100 µL de ELISA Buffer. Após esses processos, foi pipetado 360 µL de matriz em novos tubos de ensaio S2, S3, X, S4 e S5. Após esses processos foram pipetados 40 µL do meio do tubo de ensaio (2) para o S2, obtendo a concentração de 1000 pg/ml; 40 µL do meio do tubo de ensaio (3) para o S3, obtendo a concentração de 500 pg/ml; 40 µL do meio do tubo de ensaio 5 para o S4, obtendo a concentração de 250 pg/ml e 40 µL do meio do tubo de ensaio 6 para o S5, obtendo a concentração de 62,5 pg/ml. No tubo de ensaio S1 foi pipetado 40 µL de *Standard* diretamente na matriz, obtendo a concentração de 31,3 pg/ml.

5.10.1.3 Preparo da validação da curva padrão e das amostras do ELISA para PGE₂ para o CLA

O *Standard* do kit de ELISA para PGE₂ apresenta-se em estado sólido. Assim, o *Standard* foi previamente diluído em 1 mL de matriz para o CLA. Como o *Standard* foi diluído em matriz não foi necessário fazer o passo 2 da curva padrão, conforme representado na **Figura 13**.

Figura 13 - Modelo esquemático do preparo da curva padrão e das amostras do ELISA para mensuração de PGE₂ (CLA)



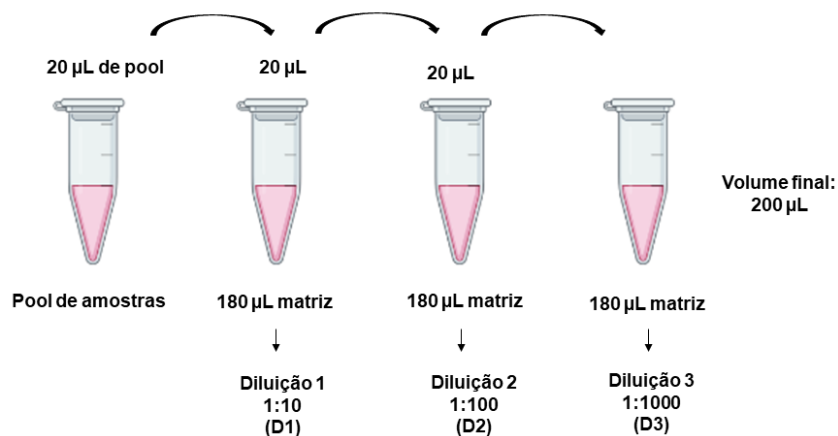
Fonte: elaborado pela própria autora.

100 µL de *Standard* foram transferidos para um tubo de ensaio (S1) contendo 900 µL de matriz, obtendo a concentração de 1.000 ng/ml. Após esse processo, foram pipetados 500 µL do tudo de ensaio S1 em 500 µL de matriz (S2), obtendo a concentração de 500 ng/ml. Assim sucessivamente, 500 µL do tudo de ensaio S2 para o tudo de ensaio S3 obtendo a concentração 250 ng/ml; 500 µL do tudo de ensaio S3 para o tudo de ensaio X obtendo a concentração 125 ng/ml; 500 µL do tudo de ensaio X para o tudo de ensaio S4 obtendo a concentração 62,5 e 500 µL do tudo de ensaio S4 para o tudo de ensaio S5 obtendo a concentração 31,3.

Para validação da concentração das amostras experimentais tratadas com OA ou CLA, mencionadas acima, foram preparados “pools” das amostras nas diluições 1:10, 1:100, 1:1000 de acordo com o modelo esquemático apresentado na **Figura 14**.

Figura 14 - O “pool” de amostras foi realizado com o intuito de obter a concentração

ideal para cada ácido graxo (OA ou CLA)



Fonte: elaborado pela própria autora.

Para o preparo do “pool” foi feita pipetagem seriada partindo de 20 µL pool de amostras para 3 subsequentes volumes de 180 µL matriz obtendo-se, respectivamente, as diluições 1:10 (D1), 1:100 (D2) e 1:1000 (D3).

Após o preparo dos padrões e pools de amostras, fez-se a pipetagem, em duplicata, da placa de validação da curva padrão e da concentração de amostras do ELISA de acordo com a **Tabela 1 e Figura 15 e 16**.

Tabela 1 - Resumo da pipetagem para o ELISA PGE₂

| POÇO | MATRIZ | PADRÃO/AMOSTRA | TRACER | ANTISERUM |
|----------------|--------|----------------|--------|-----------|
| BLK | - | - | - | - |
| NSB | 100 µL | - | 50 µL | - |
| B ₀ | 50 µL | - | 50 µL | 50 µL |
| PADRÃO/AMOSTRA | - | 50 µL | 50 µL | 50 µL |

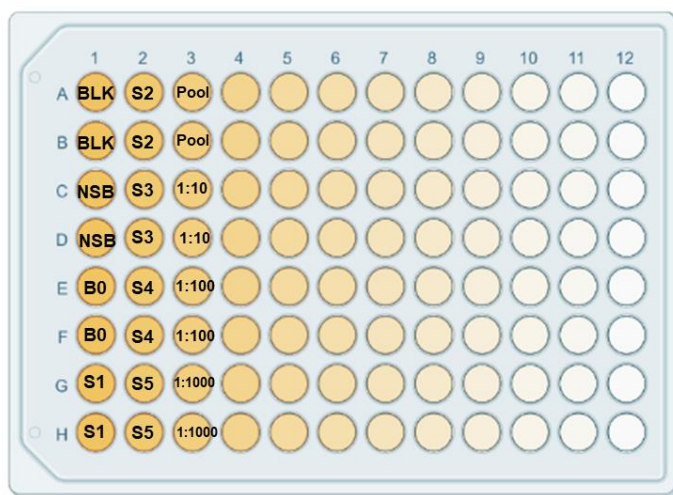
Fonte: elaborado pela própria autora.

Branco (Blk): representa a absorvância de fundo causada pelo reagente de Ellman.

Ligações não específicas (NSB): representa os compostos que irão se ligar ao poço, mas não irão se ligar ao anticorpo específico para a prostaglandina.

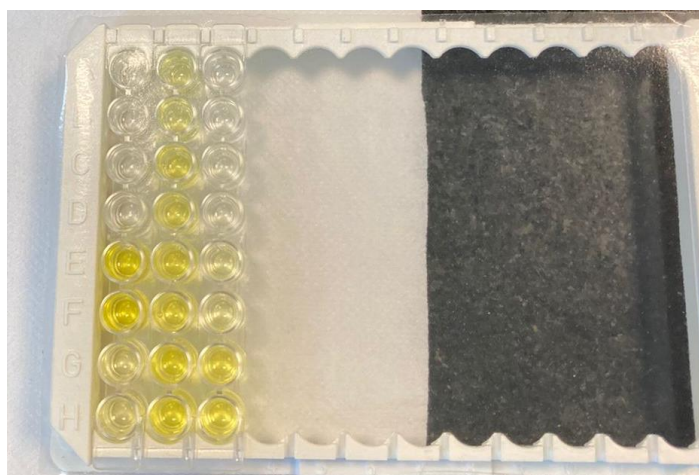
Máxima ligação (B₀): representa a máxima ligação do Tracer com o anticorpo.

Figura 1 - Modelo esquemático da placa de validação da curva padrão do ELISA



Fonte: elaborado pela própria autora.

Figura 16 - Placa de validação da curva padrão do ELISA



Fonte: elaborado pela própria autora.

Após a pipetagem da curva padrão e dos “pools” de amostras, a placa foi coberta com plástico filme adesivo e papel alumínio, inserida em uma caixa de papel para proteger da luz e incubada por 18 horas a 4°C em homogeneizador orbital em baixa velocidade. Depois do período da primeira incubação os poços foram esvaziados e lavados 5 vezes com “Wash Buffer”. Imediatamente após as lavagens, o reagente Ellman foi reconstituído com água Mili-Q (20 mL do reagente é suficiente para 100 poços) e foram adicionados 200 µL do mesmo em cada poço da placa, logo após as lavagens. Após a adição do reagente Ellman a placa foi novamente coberta com plástico filme adesivo e papel alumínio, inserida em uma caixa de papel e incubada por 90 minutos em homogeneizador orbital em baixa velocidade. A leitura da placa foi realizada após a segunda incubação em espectrofotômetro com capacidade de leitura de comprimento de onda entre 405-420 nm (Synergy HTX, sendo controlado pelo software Gen5 versão 3.03). A leitura foi realizada em ondas de 415nm. Após a leitura da placa de ELISA, contendo o pool de amostras (1:10, 1:100 e 1:100) para testarmos na curva padrão do ELISA. A partir dos resultados obtidos, observamos que a melhor diluição foi 1:700 para OA e 1:300 para CLA onde os pontos não se apresentam fora da curva padrão. Após as validações, montaram-se as placas contendo a curva padrão e as amostras de meio de cultivo de CT-1 tratadas com OA ou CLA nas diluições necessárias (1:700 ou 1:300).

5.10.2 ELISA para PGF_{2α}

Para o ELISA foi utilizado o kit *Prostaglandin F_{2α} ELISA kit, N° 516011 (Cayman Chemical)*. A matriz utilizada no ensaio também foi o meio de cultivo das CT-1 não suplementado com SFB. O preparo do Standard do kit de ELISA para PGF_{2α} vem em estado líquido. Os reagentes e *buffers* de cada kit foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

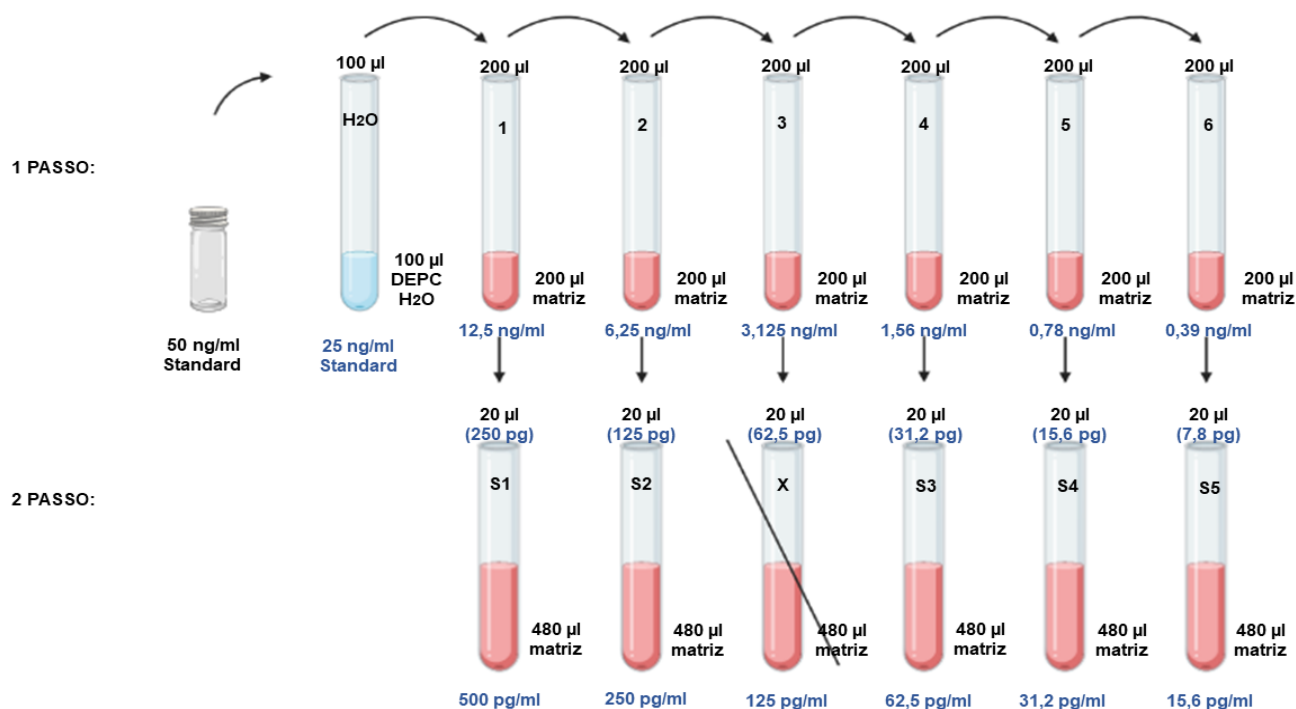
5.10.2.1 Preparo da validação da curva padrão e das amostras do ELISA para PGF_{2α} para o OA

A curva padrão foi preparada com as adequações necessárias de acordo com o modelo esquemático apresentado na **Figura 17**.

A montagem, incubações e leitura da placa para o ELISA PGF_{2α}, se assemelham com o ELISA PGE₂. Dessa forma, serão descritos somente os passos do ensaio que foram divergentes. No momento da segunda incubação, após adição

A montagem, incubações e leitura da placa para o ELISA PGF_{2α}, se assemelham com OA. Dessa forma, serão descritos somente os passos do ensaio que foram divergentes. Os pontos usados para o preparo da curva padrão e das amostras para o CLA foram (S1: 500 pg/mL; S2: 250 pg/mL; S3: 62,5 pg/mL; S4: 31,2 pg/mL e S5: 15,6 pg/mL).

Figura 18 - Modelo esquemático do preparo da curva padrão e das amostras do ELISA para mensuração de PGF_{2α} (CLA)



Fonte: elaborado pela própria autora.

100 µL de *Standard* (50 ng/mL) foram pipetados para um tudo de ensaio (H₂O) contendo 100 µL de água ultrapura (DEPC) obtendo assim a concentração de 25 ng/mL, o volume total (200 µL) foram pipetados para um novo tudo de ensaio (1) contendo 200 µL de matriz gerando uma concentração de 12,5 ng/mL. Diluições em série foram realizadas, pipetando 200 µL do tubo de ensaio (1) para o tubo de ensaio (2), e assim sucessivamente até o tudo de ensaio (7). Após esses processos, foram pipetados 480 µL de matriz em novos tubos de ensaio S1, S2, X, S3, S4, S5 e S6. Foram pipetados 20 µL do meio do tubo de ensaio (1) para o tubo de ensaio S1, obtendo a concentração de 500 pg/ml. 20 µL do meio do tubo de ensaio (2) para o S2, obtendo a concentração de 250 pg/ml. 20 µL do meio do tubo de ensaio 4 para o S3, obtendo a concentração de 125 pg/ml. 20 µL do meio do tubo de ensaio 5 para o S4, obtendo a concentração de 62,5 pg/ml. 20 µL do meio do tubo de ensaio 6 para o S5, obtendo a concentração de 31,2 pg/ml. 20 µL do meio do tubo de ensaio 7 para o S6, obtendo a concentração de 15,6 pg/ml.

Figura 19 - Curva padrão do ELISA



Fonte: elaborado pela própria autora.

5.11 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 de medidas repetidas 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 principal do grupo de tratamento e o efeito aleatório da replicação da cultura. A significância estatística foi estabelecida em $P \leq 0,05$.

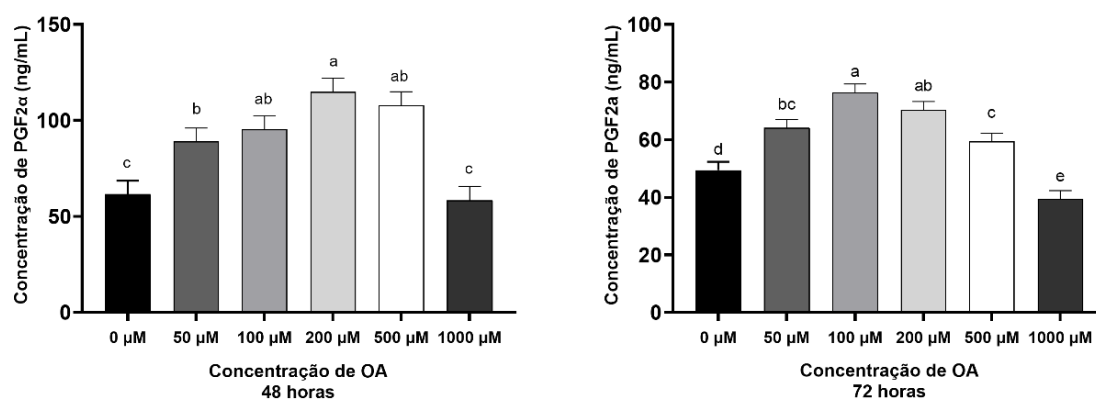
6 RESULTADOS

6.1 Efeito da Suplementação com OA Sobre a Síntese de $PGF_{2\alpha}$ Após 48 e 72 horas

Para a $PGF_{2\alpha}$ foi evidenciado um efeito de repetição para 48 horas ($P=0,0145$) e 72 horas ($P=0,0161$). Observou-se efeito de tratamento ($P<0,0001$) para as comparações estabelecidas com 48 e 72 horas.

Conforme ilustrado na **Figura 20**, no tempo 48 horas, a concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi maior nos tratamentos com 50 μM , 100 μM , 200 μM e 500 μM de OA, comparado ao grupo controle. No tratamento de 1000 μM de OA a concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não diferiu do grupo controle. A concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ após 72 horas de tratamento foi maior para os grupos 50 μM , 100 μM , 200 μM e 500 μM de OA comparado ao grupo controle, entretanto, com 72 horas a concentração de 1000 μM diminuiu a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ comparado ao grupo controle.

Figura 20 - Média \pm erro padrão (ng/mL) das diferentes concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de OA (50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1000 μM , e o grupo controle) nos tempos 48 e 72 horas de tratamento



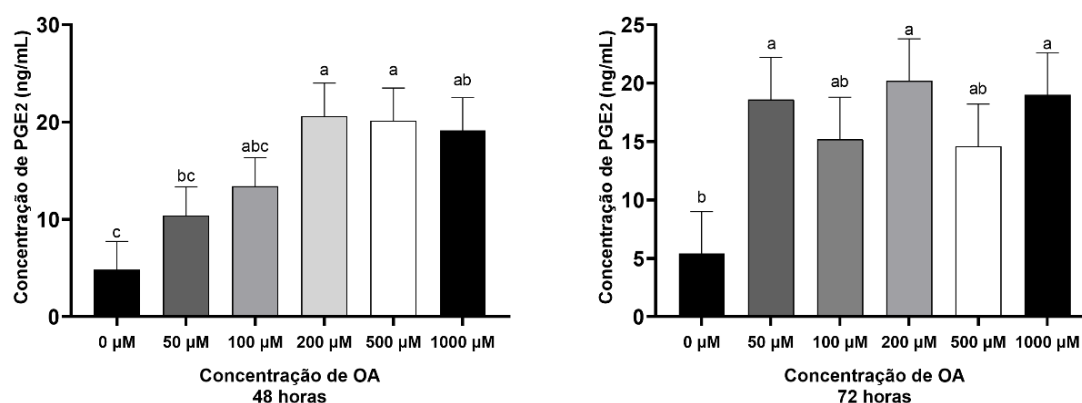
a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística considerando um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

6.2 Efeito da Suplementação com OA Sobre a Síntese de PGE_2 com 48 e 72 Horas

Para a PGE_2 não foi observado efeito de repetição para 48 horas ($P=0,9317$) e 72 horas ($P=0,5177$). Evidenciou-se efeito de tratamento ($P<0,0001$) para as comparações entre os grupos de tratamento estabelecidas com 48 e 72 horas. A **Figura 21**, ilustra o efeito das diferentes concentrações de OA (50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1000 μM e o grupo controle) sobre a síntese de PGE_2 (ng/mL) em meio de cultivo das CT-1 durante 48 e 72 horas, através da mensuração pela técnica de ELISA.

Conforme ilustrado na **Figura 21**, as CT-1 suplementadas com 200 μM , 500 μM e 1000 μM de OA apresentaram um aumento na síntese de PGE_2 48 horas após o tratamento comparado ao grupo controle, enquanto as concentrações de 50 μM e 100 μM de OA não diferiram do grupo controle. Com 72 horas de tratamento foi evidenciado que a síntese de PGE_2 foi aumentada quando as CT-1 foram suplementadas com 50 μM , 200 μM e 1000 μM de OA comparado ao grupo controle (0 μM), enquanto as concentrações de 100 μM e 500 μM de OA não diferiram do grupo controle.

Figura 21 - Média \pm erro padrão (ng/mL) das diferentes concentrações de PGE_2 em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de OA (50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 1000 μM e o grupo controle) nos tempos 48 e 72 horas de tratamento



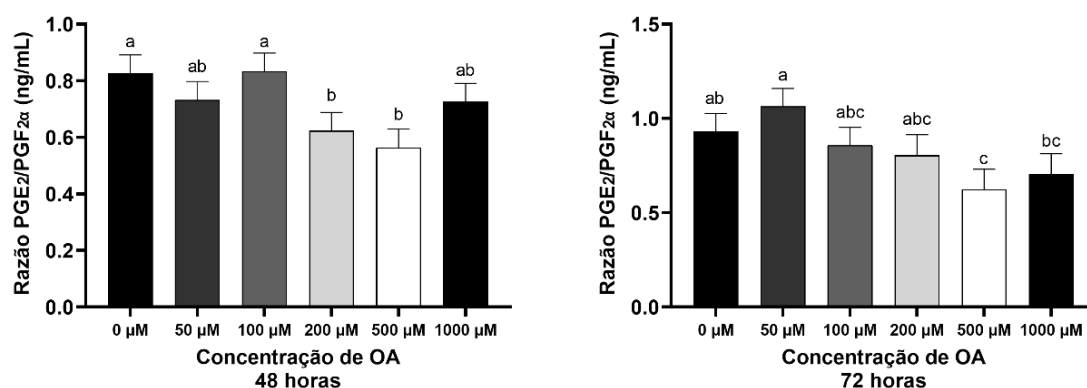
a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística considerando um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

6.3 Efeito da Suplementação com OA na Razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ com 48 e 72 Horas

Na **Figura 22** estão representadas as razões $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ durante a suplementação do meio de cultivo *in vitro* das CT-1 com diferentes concentrações de OA nos tempos 48 e 72 horas de cultivo. Com 48 horas a razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ foi menor quando as CT-1 foram suplementadas com 200 μM e 500 μM de OA comparado ao grupo controle (0 μM), enquanto as concentrações de 50, 100 e 1000 μM de OA não tenham diferido do grupo controle. Com 72 horas a razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ foi menor apenas quando as CT-1 foram suplementadas com 500 μM de OA

comparado ao grupo controle (0 μM), enquanto as concentrações de 50 μM , 100 μM , 200 μM e 1000 μM de OA não tenham diferido do grupo controle.

Figura 22 - Média \pm erro padrão (ng/mL) da razão das concentrações de $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de OA (50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM , 100 μM e o grupo controle) nos tempos 48 e 72 horas de tratamento

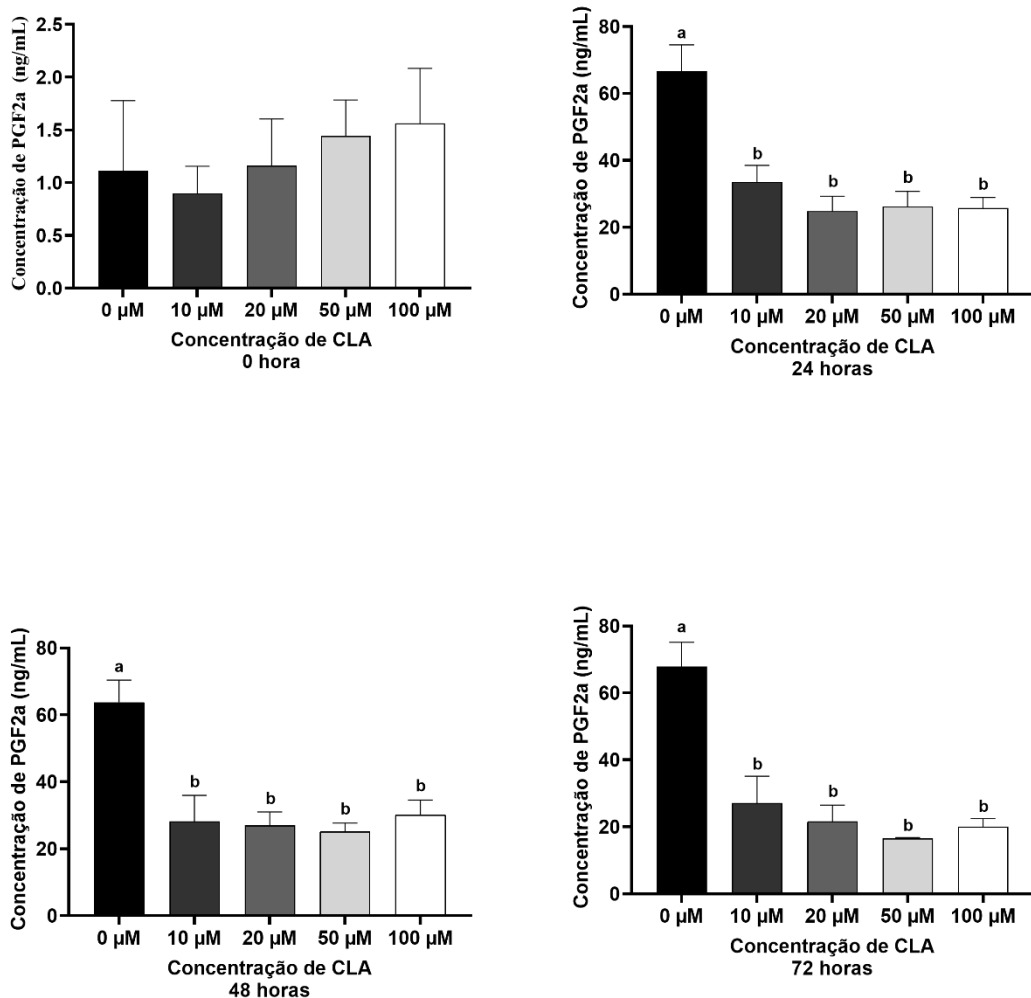


a, b, c Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística considerando um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

6.4 Efeito da Suplementação com CLA Sobre a Síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com 0, 24, 48 e 72 Horas

Na **Figura 23** estão representados os efeitos da suplementação do meio de cultivo *in vitro* das CT-1 com diferentes concentrações de CLA sobre a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de cultivo. As concentrações não diferiram entre os diferentes grupos de tratamento no tempo 0 hora. Para os tempos 24, 48 e 72 horas as concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foram menores para todas as concentrações de CLA utilizadas (10 μM , 20 μM , 50 μM e 100 μM) comparado ao grupo controle.

Figura 23 - Média \pm erro padrão (ng/mL) das diferentes concentrações de PGF2 α em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de CLA (10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M e o grupo controle) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento

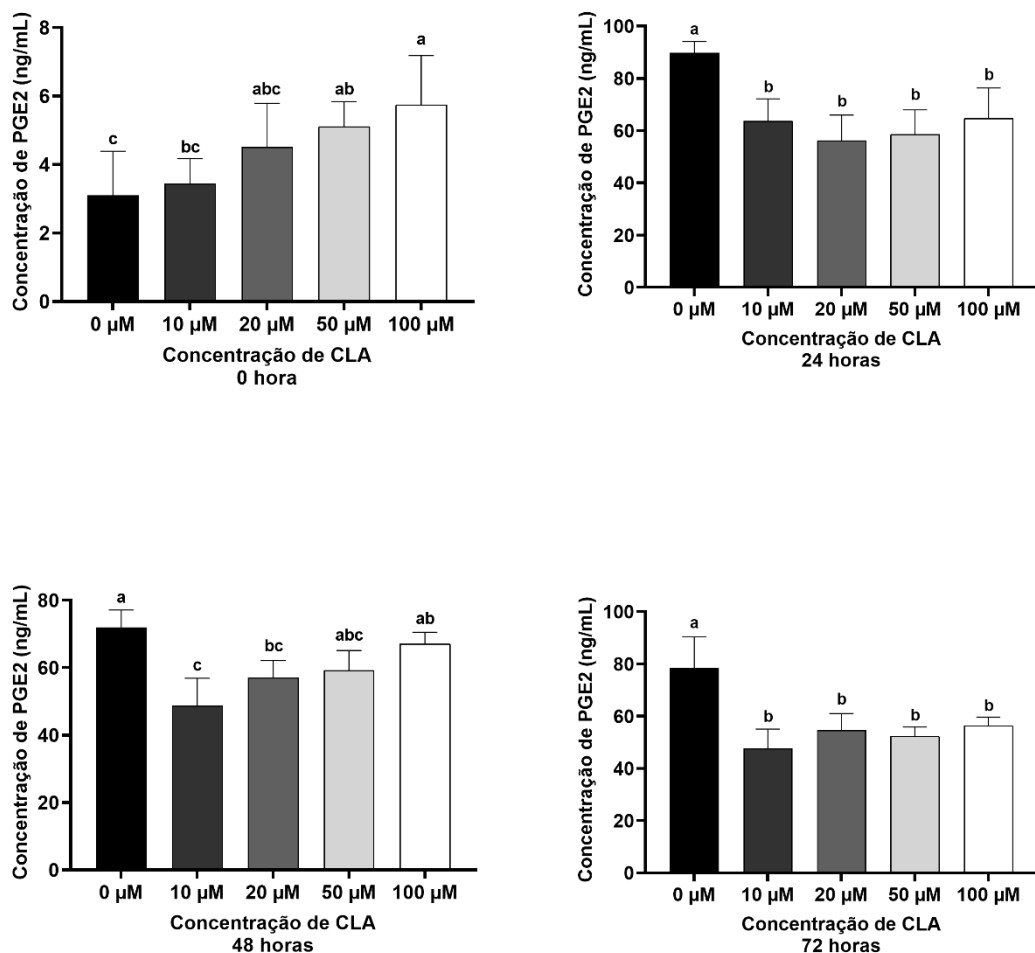


a, b Letras diferentes indicam diferença estatística considerando um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

6.5 Efeito da Suplementação com CLA Sobre a Síntese de PGE $_2$ com 0, 24, 48 e 72 Horas

Na **Figura 24** estão representados os efeitos da suplementação do meio de cultivo *in vitro* das CT-1 com diferentes concentrações de CLA durante diferentes períodos sobre a síntese de PGE₂, nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento. As concentrações diferiram no tempo 0 hora, onde no grupo 50 µM e 100 µM de CLA a concentração de PGE₂ foi maior que no grupo controle. Com 24 horas de tratamento as concentrações de PGE₂ foram reduzidas em todos os grupos tratados com CLA (10 µM, 20 µM, 50 µM e 100 µM) comparado ao grupo controle. Com 48 horas de tratamento o grupo tratado com 10 µM e 20 µM de CLA apresentou menor concentração de PGE₂ comparado ao grupo controle, entretanto, as concentrações de 50 µM e 100 µM não tenham diferido do grupo controle. Com 72 horas de cultivo, todos os grupos tratados com CLA (10 µM, 20 µM, 50 µM e 100 µM) apresentaram menores concentrações de PGE₂ comparado ao grupo controle.

Figura 24 - Média ± erro padrão (ng/mL) das diferentes concentrações de PGE₂ em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de CLA (10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM e o grupo controle) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento

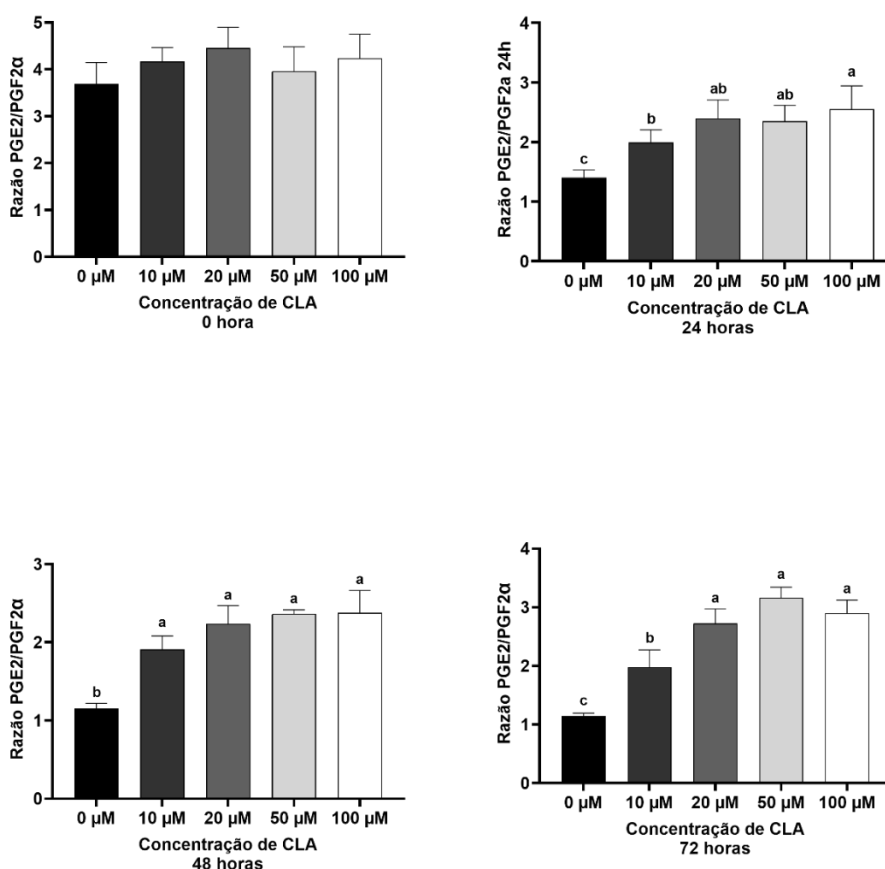


a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística considerando um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

6.6 Efeito da Suplementação com CLA na Razão PGE₂/PGF_{2α} com 0, 24, 48 e 72 Horas

Na **Figura 25** estão representadas as razões de PGE₂/PGF_{2α} durante a suplementação do meio de cultivo *in vitro* das CT-1 com diferentes concentrações de CLA sobre a síntese de PGE₂, nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento. Não houve diferença na razão entre os diferentes grupos com 0 horas de tratamento. Com 24 horas de tratamento, a razão foi maior ($P < 0,0006$) para os grupos tratados com 10 μM, 20 μM, 50 μM e 100 μM de CLA comparado ao grupo controle. Com 48 horas a razão foi maior ($P < 0,0027$) para os grupos tratados com 10 μM, 20 μM, 50 μM e 100 μM de CLA comparado ao grupo controle. Com 72 horas de cultivo, a razão foi maior ($P < 0,0001$) para os grupos tratados com 10 μM, 20 μM, 50 μM e 100 μM de CLA comparado ao grupo controle.

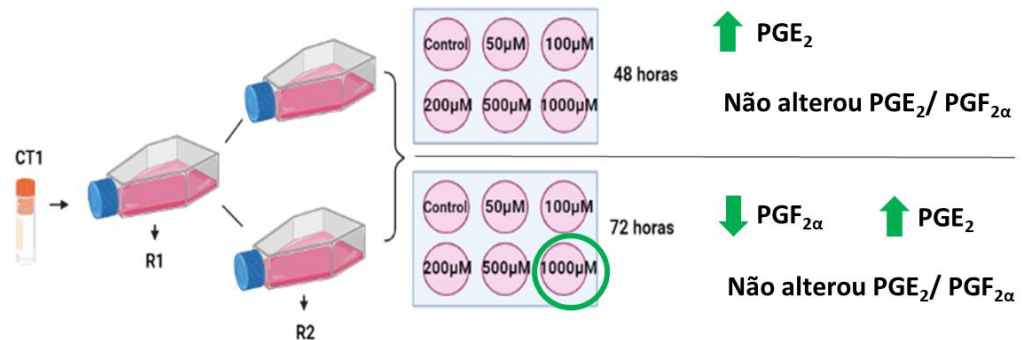
Figura 25 - Média ± erro padrão (ng/mL) da razão das concentrações de PGE₂/PGF_{2α} em meio de cultivo das CT-1, mensuradas pela técnica de ELISA, tratadas com diferentes concentrações de CLA (10 μM, 20 μM, 50 μM, 100 μM e o grupo controle) nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de tratamento



a, b, c Letras diferentes indicam diferença estatística considerando um nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

A sumarização dos resultados observados está apresentada nas figuras a seguir (**Figura 26 e Figura 27**).

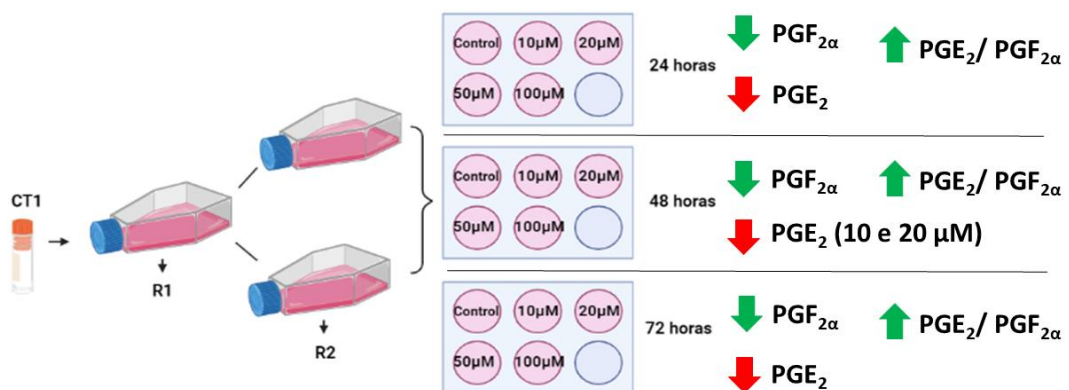
Figura 26 - Sumarização dos resultados com OA



Fonte: elaborada pela própria autora.

Nos tempos de 48 e 72 horas, a secreção de PGF_{2α} aumentou nas doses de 50 µM, 100 µM, 200 µM e 500 µM comparadas ao grupo controle. Com 72 horas de cultivo a secreção de PGF_{2α} foi diminuída, comparada ao grupo controle, na dose de 1000 µM. A secreção de PGE₂ aumentou comparado ao grupo controle nas doses de 200 µM, 500 µM e 1000 µM com 48 horas e com 50 µM, 200 µM e 1000 µM com 72 horas. A razão PGE₂/PGF_{2α} foi diminuída comparado o ao grupo controle, nas doses de 200 µM e 500 µM com 48 horas e nas doses de 500 µM e 1000 µM com 72 horas.

Figura 27 - Sumarização dos resultados com CLA



Fonte: elaborada pela própria autora.

Nos tempos de 24, 48 e 72 horas, a secreção de PGF_{2α} diminuiu comparado ao grupo controle, para todas as doses testadas. A secreção de PGE₂ diminuiu, comparado ao grupo controle, em todas as doses testadas, com 24 e 72 horas e nas doses de 10 µM, 20 µM com 48 horas. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas, a razão PGE₂/PGF_{2α} foi aumentada comparado o ao grupo controle, para todas as doses testadas.

7 DISCUSSÃO

Nesse estudo, verificamos que as CT-1 sintetizam $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 e que tal biossíntese é modificada pela suplementação com OA e CLA. Sabe-se que os embriões bovinos produzem predominantemente PGE_2 antes do dia 12, PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ entre os dias 13 e 15 e adicionalmente PGI_2 após o dia 15 de desenvolvimento (HWANG *et al.*, 1998). Considerando que as CT-1 foram isoladas de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com 10 a 11 dias de desenvolvimento, era esperado que as concentrações de PGE_2 prevalecessem em relação as concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Em nosso estudo, a biossíntese das PGs demonstrou um comportamento diferenciado para o OA e CLA. Observamos que a suplementação do meio de cultivo de CT-1 com 1000 μM de OA reduziu a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e aumentou a síntese de PGE_2 , não afetando a razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$, porém a razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentou quando as CT-1 foram suplementadas com CLA.

De acordo com Moussavi *et al.* (2013), em meio de cultura de células epiteliais endometriais bovinas expostas a quantidades maiores que 50 μM de isômeros de CLA por 24 horas, as concentrações de PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ diminuiriam significativamente. Em nosso estudo, quando utilizamos CLA em CT-1 verificamos que o cultivo com CLA durante 24, 48 ou 72 horas resultou em diminuição da concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em todas as doses testadas. Este fato também foi descrito segundo Cheng *et al.* (2003), em células endometriais de ovelhas, com ou sem ocitocina ou lipopolissacarídeo, o CLA (100 μM) suprimiu a geração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de forma dose-dependente. Dessa forma, esses achados indicam que o CLA é capaz de suprimir a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em diferentes linhagens celulares envolvidas no RMF. O efeito de redução da $\text{PGF}_{2\alpha}$ proporcionada pelo CLA não se limita ao ambiente uterino e embrião, Harris *et al.* (2001), demonstram que o uso de CLA reduz a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na placenta, útero e fígado de ratos. Como descrito anteriormente, a supressão da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é essencial para manutenção do CL e estabelecimento da prenhez.

Segundo Cheng *et al.* (2003), em células endometriais de ovelhas, com ou sem ocitocina ou lipopolissacarídeo, o CLA em baixas concentrações (20 μM) aumentou a

síntese de PGE₂. Em contraste, após análises dos resultados deste estudo, as CT-1 se comportaram de forma diferente, uma vez que a suplementação com CLA diminuiu a síntese de PGE₂ em todas as concentrações (após 24 e 72 horas) ou com concentrações baixas (10 e 20 µM) após 48 horas. Em um estudo cujo design experimental utilizando o cultivo celular *in vitro* se aproxima do nosso experimento, Meier *et al.* (2009) avaliaram os efeitos do LA na liberação de PGF_{2α} e PGE₂ endometrial e do tecido trofoblástico durante 5 horas de cultivo foi capaz de alterar a síntese das PGs. Quando utilizamos a concentração de 10 µM de CLA foi possível observar uma redução na síntese de PGF_{2α} e PGE₂ a partir de 24 horas de cultivo. Diante dos nossos resultados, sugere-se que o tempo de cultivo utilizado no estudo do referido autor possa ter sido curto a ponto de limitar a detecção das moléculas investigadas. A PGE₂ atua 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, além de exercer ação luteotrófica protegendo o CL da luteólise espontânea ou induzida em fêmeas ruminantes (MAGNESS *et al.*, 1981). Em nosso estudo, embora a redução da concentração absoluta de PGE₂ indique um fator negativo para a manutenção da prenhez, ao avaliar o contexto geral, observamos diminuição tanto da PGE₂ quanto a PGF_{2α}, e após calcular a razão entre PGE₂/PGF_{2α} notamos aumento significativo em relação ao controle (0 µM), pois acreditamos que uma maior razão seja um fator positivo no estabelecimento da prenhez.

Já foi demonstrado que a razão PGE₂/PGF_{2α} é mais importante que as concentrações absolutas no contexto reprodutivo de bovinos (BAZER; OTT; SPENCER, 1998). Arosh *et al.*, (2016) encontraram evidências que apontam que o incremento de PGE₂ é tão importante quanto a supressão de PGF_{2α}. No período do RMF a PGE₂ apresenta ações voltadas para a receptividade endometrial, quiescência miometrial e manutenção do CL, mecanismos imprescindíveis para o estabelecimento da prenhez (REYNOLDS *et al.*, 2010). Em um estudo de Mattos *et al.* (2003), quando células endometriais bovinas foram tratadas com LA a biossíntese de PGE₂ e PGF_{2α} foi diminuída, e a razão PGE₂/PGF_{2α} aumentou. Embora o referido estudo tenha sido realizado com células endometriais, os resultados obtidos com LA foram semelhantes aos resultados encontrados em nosso estudo quando utilizamos CLA. Mattos *et al.* (2003) relataram ainda que o LA apresenta uma ação inibidora na enzima COX-2,

fundamental para a síntese de PGH_2 . Considerando que a PGH_2 é precursora de ambas as PGs, haveria a possibilidade da ação do CLA estar sendo realizada pela inibição da COX-2. Outra possibilidade é que o CLA possa atuar diminuindo o substrato especialmente o AA, nas células trofoblásticas, restringindo a principal matéria prima para a síntese de ambas as PGs. De maneira interessante, Cheng *et al.*, (2003), também relataram que a suplementação com CLA, aumentou a razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ nas células endometriais. Reforçando que ambas as PGs são produzidas a partir de PGH_2 , as concentrações específicas destas PGs dependem da disponibilidade de PGH_2 e da atividade específica de PGF e PGE isomerase e sintase. O CLA pode atuar inibindo PGF sintase, priorizando a rota do AA para a PGE sintase, dessa forma favorecendo a síntese de PGE_2 em relação à $\text{PGF}_{2\alpha}$. No nosso estudo, quando as CT-1 foram suplementadas com CLA, foi observado um aumento na razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Parent *et al.* (2002) demonstraram que em vacas o aumento da razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o início da gestação suporta a função lútea para o desenvolvimento adequado do embrião e implantação. Dessa forma, os resultados encontrados no nosso estudo apontam que a suplementação com CLA é uma potencial estratégia na modulação da razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ em CT-1 a favor do RMF.

Conforme mencionado anteriormente, o estabelecimento da prenhez em bovinos requer uma produção de INF-t embrionário suficiente para inibir a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e aumentar a secreção de PGE_2 pelas células endometriais (ROBINSON *et al.* 2006; NIRINGIYUMUKIZA; CAI; XIANG, 2018). Diferente do que foi observado nas concentrações menores, a concentração de 1000 μM de AO diminuiu a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ após exposição de 72 horas de cultivo comparado ao grupo controle (0 μM), efeito desejado no favorecimento do RMF. Dois mecanismos poderiam estar promovendo aumento da concentração de PGE_2 na referida dose. O primeiro mecanismo poderia ser a inibição da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo OA, evento que restringiria a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ promovendo um acúmulo de AA nas células, levando a uma maior síntese de PGE_2 . O segundo mecanismo refere-se ao fato de que o OA pode estimular diretamente a síntese de PGE_2 . Conforme descrito por Niringiyumukiza, Cai e Xiang (2018), a PGE_2 atua no desenvolvimento embrionário aumentando a proliferação das células embrionárias e trofoblásticas permitindo a sobrevivência da implantação após a transferência de embriões.

Caldari-Torres *et al.* (2006) relataram que a suplementação com o ácido eicosapentaenóico (EPA) utilizando 100 μM por 24 horas diminuiu a biossíntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial. Colaborando com o que foi observado no estudo anterior, Cheng *et al.* (2015), observaram que células endometriais de ovelhas expostas a baixas concentrações de OA (20 e 100 μM) por 24 horas tiveram incremento na síntese de PGE_2 , redução de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e duplicação da razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$. Diferente de Cheng *et al.* (2015), que usaram uma linhagem de origem materna, utilizamos uma linhagem de origem embrionária por períodos maiores de exposição ao OA. Observamos um efeito favorável apenas na maior concentração utilizada (1000 μM), a qual aumentou a síntese de PGE_2 e reduziu a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, embora sem alterar a razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$. Em conjunto, esses dados indicam que linhagens celulares de origem materna e embrionária respondem de forma diferente ao OA, ou seja, enquanto baixas concentrações mostram benefícios em células de origem materna, células de origem embrionárias mostram efeitos positivos quanto a síntese PGs em concentrações mais altas de OA. Além disso, o período de exposição com OA também pode ser outro fator importante no contexto da síntese das duas PGs investigadas.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se que cada uma das suplementações utilizadas, OA ou CLA, confirmam parcialmente a hipótese proposta: enquanto o OA na concentração de 1000 μM aumenta a síntese de PGE_2 e diminui a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o CLA melhora a razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ em todas as concentrações testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, [S.l.], v. 93, p. 30–36, 2010.

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.

ABSALÓNMEDINA, V. A.; BEDFORD, 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.**, [S.l.], v. 97, p. 6164–76, 2014.

ANTON, R. F.; BECKER, H. C.; RANDALL, C. L. Ethanol increases PGE and thromboxane production in mouse pregnant uterine tissue. **Life Sci.**, [S.l.], 46, p. 1145–1153, 1990.

ANTHONY, R. V.; HANSEN, T. R. Uterine vein infusion of interferon-tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v. 82, p. 725-735, 2010.

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; CHAPDELAINE, P.; EMOND, V.; KIM, J. J.; MACLAREN, L. A.; FORTIER, M. A. Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, [S.l.], v. 144, p. 3076–3091, 2003.

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, p. 5280-5293, 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. 2019. Uberaba, MG. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatórios/>. Acesso em: 15 nov. 2021.

ASSELIN, E.; BAZER, F. W.; FORTIER, M. A. Recombinant ovine and bovine interferons tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells. **Biology Reproduction**, [S.l.], v. 56, p. 402-408, 1997.

AZAIN, M. J.; HAUSMAN, D. B.; SISK, M. B.; FLATT, W. P.; JEWELL, D. E. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. **J Nutr**, [S.l.], v. 130, p. 1548–1554, 2000.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, [S.l.], v. 82/83, p. 479-486, 2004.

BASAK, S.; DUTTARROY, A. K. cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid stimulates expression of angiopoietin like-4 in the placental extravillous trophoblast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S.l.], v. 1831, p. 834–843, 2013.

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.

BEE, G. Dietary conjugated linoleic acid consumption during pregnancy and lactation influences growth and tissue composition in weaned pigs. **J. Nutr.**, [S.l.], v. 130, p. 2981–2989, 2000.

BELL, S. J.; BRADLEY, D.; FORSE, R. A.; BISTRIAN, B. R. The new dietary fats in health and disease. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, [S.l.], v. 97, p. 280-286, 1997.

BERTEVELLO, P. S.; TEIXEIRA-GOMES, A. P.; SEYER, A.; VITORINO CARVALHO, A. V.; LABAS, V.; BLACHE, M. C.; BANLIAT, C.; CORDEIRO, L. A. V.; DURANTHON, V.; PAPIILLIER, P.; MAILLARD, V.; ELIS, S.; UZBEKOVA, S. Lipid identification and transcriptional analysis of controlling enzymes in bovine ovarian follicle. **Int. J. Mol. Sci.**, [S.l.], v. 19, p. 3261, 2018.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; RODLER, D.; PFAFFL, M. W. Angiogenesis in the ovary: the most important regulatory event for follicle and corpus luteum development and function in cows: an overview. **Anatomia, Histologia, Embryologia: journal of veterinary medicine**, [S.l.], v. 45, n. 2, p. 124-130, 2016.

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.

BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J. A.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces fat mass in overweight and obese humans. **J. Nutr.**, [S.l.], v. 130, p. 2943–2948, 2000.

BOTT, R. C.; ASHLEY, R. L.; HENKES, L. E.; ANTONIAZZI, A. Q.; BRUEMMER, J. E.; NISWENDER, G. D.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; SMINOVA, N.

P.BORUSZEWSKA, D.; GRZYMACHER, K.; ZIEBA, I. K.; SINDEREWICZ, E.; CHODOR J. S; POTOCKA, I. W. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in early- and late-cleaved bovine embryos at different stages of preimplantation development, **Theriogenology**, [S./], v. 133, p. 45-55, 2019.

CALDARI-TORRE, C.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.; GREENE, E. S.; BADINGA, L. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F2a production by bovine endometrial cells. **J. Dairy Sci.**, [S./], v. 89, p. 971-977, 2006.

CAO, J.; YOSIDA, M.; KITAZAWA, T.; TANEIKE, T. Uterine region-dependent differences in responsiveness to prostaglandins in the non-pregnant porcine myometrium. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, [S./], v. 75, n. 1-4, p. 105-122, 2005.

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./], v. 79, p. 687-694, 2013.

CASTANEDA-GUTIERREZ, E.; OVERTON, T. R.; BUTLER, W. R.; BAUMAN, D. E. Dietary supplements of two doses of calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation. **J. Dairy Sci.**, [S./], v. 88, p. 1078–1089, 2005.

CHAMBAZ, J.; RAVEL, D.; MANIER, M. C.; MULLIEZ, N.; BEREZIAT, G. Interconversion of essential fatty acids in human fetal liver. **Biol. Neonate**, [S./], v. 47, p. 136, 1985.

CHEN, Y.; GREEN, J. A.; ANTONIOU, E.; EALY, A. D.; MATHIALAGAN, N.; WALKER, A. M.; AVALLE, M. P.; ROSENFELD, C. S.; HEARNE, L. B.; ROBERTS, R. M. Effect of interferon-tau administration on endometrium of non-pregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. **Endocrinology**, [S./], v. 147, p. 2127-2137, 2006.

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./], v. 1633, p. 170–178, 2003.

CHENG, W. L.; LII, C. K.; CHEN, H. W.; LIN, T. H.; LIU, K. L. Contribution of conjugated linoleic acid to the suppression of inflammatory responses through the regulation of the NF-kappaB pathway. **J Agric Food Chem**, [S./], v. 52, p. 71–78, 2004.

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./], v. 36, p. 1011–1017, 2015.

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

CHIN, S. F.; LIU, W.; STORKSON, J. M.; HA, Y. L.; PARIZA, M. W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens, **J. Food Compos. Anal.**, [S./], v. 5, p. 185–197, 1992.

CHIN, S. F.; STORKSON, J. M.; ALBRIGHT, K. J.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. **J. Nutr.**, [S./], v. 124, p. 2344–2349, 1994.

COOK, M. E.; MILLER, C. C.; PARK, Y.; PARIZA, M. W. Immune modulation by altered nutrient metabolism control of immune-induced growth depression. **Poultry Sci**, [S./], v. 72, p. 1301–1305, 1993.

CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; DWYER, D. A.; GRINARI, J. M.; PHILLIPS, B. S.; BAUMAN, D. E. The role of Delta (9)-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA, **J. Nutr. Biochem**, [S./], v. 12, p. 622–630, 2001.

CHRISTIANSON, W. T. Stillbirths, Mummies, Abortions, and Early Embryonic Death. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, [S./], v. 8, p. 623–639, 1992.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N. Z.; LOPES, F. L.; GASPAR, R. C.; PADILHA, L. C.; COSTA, R. R.; ROSSI, G. F.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, [S./], 2015. DOI 10.1071/RD15067.

DEL COLLADO, M.; DA SILVEIRA, J. C.; OLIVEIRA, M. L. F.; ALVES, B. M. S. M.; SIMAS, R. C.; GODOY, A. T.; COELHO, M. B.; MARQUES, L. A.; CARRIERO, M. M.; NOGUEIRA, M. F. G.; EBERLIN, M. N.; SILVA, L. A.; MEIRELLES, F. V.; PERECIN, F. In vitro maturation impacts cumulus–oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, [S./], v. 154, p. 881–93, 2017.

DE VETH, M. J.; BAUMAN, D. E.; KOCH, W.; MANN, G. E.; PFEIFFER, A. M.; BUTLER, W. R. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: a multi-study analysis in early-lactation dairy cows. **J. Dairy Sci.**, [S./], v. 92, p. 2662–2669, 2009.

DONOVAN, D. C.; SCHINGOETHE, D. J.; BAER, R. J.; RYALI, J.; HIPPEN, A. R.; FRANKLIN, S. T. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows, **J. Dairy Sci.**, [S./], v. 83, p. 2620–2628, 2000.

DUBE, E.; GRAVEL, A.; MARTIN, C.; DESPAROIS, G.; MOUSSA, I.; ETHIER-CHIASSE, M.; FOREST, J. C.; GIGUERE, Y.; MASSE, A.; LAFOND, J. Modulação do transporte de ácidos graxos e metabolismo pela obesidade materna na placenta humana a termo. **Biol Reprod.**, [S./], v. 87, p. 1–11, 2012.

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./], 142, p. 2906-2915, 2001.

EALY, A. D.; YANG, Q. E. Control of Interferon-tau expression during early pregnancy in ruminants. **American Journal of Reproductive Immunology**, [S./], v. 61, p. 95-106, 2009.

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

FEDEROFF, N. V.; BATTISTI, D. S.; BEACHY, R. N.; COOPER, P. J. M.; FISCHHOF, D. A.; HODGES, C. N.; KNAUF, V. C.; LOBELL, D.; MAZUR, B. J.; MOLDEN, D.; REYNOLDS, M. P.; RONALD, P. C.; ROSEGRANT, M. W.; SANCHEZ, P. A.; VONSHAK, A.; ZHU, J. K. Radically rethinking agriculture for the 21st century. **Science**, v. 327, p. 833-834, 2010.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **J. Reprod. Fertil.**, [S./], v. 116, p. 373-8, 1999.

FERREIRA, M. S.; DE OLIVEIRA, D. N.; GONCALVES, R. F.; CATHARINO, R. R. Lipid characterization of embryo zones by silica plate laser desorption ionization mass spectrometry imaging (SP-LDI-MSI). **Anal. Chim. Acta**, [S./], v. 807, p. 96-102, 2014.

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./], v. 77, p. 9-17, 2007.

FORTIER, M. A.; KRISHNASWAMY, K.; DANYOD, G.; KOVALIK, S. B.; CHAPDELAINE, P. J. A. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. **Journal of physiology and pharmacology**, [S./], v. 59, p. 65-89, 2008.

FORTUNATO, S. J.; MENON, R.; LOMBARDI, S. J. Expression of progelatinase activator (MTI-MMP) in human fetal membranes. **Am. J. Reprod. Immunol.**, [S./], v. 39, p. 316-322, 1998.

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./], v. 44, p. 567-75, 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./], v. 77, p. 9-17, 2007.

GAO, H.; WU, G.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Select nutrients in the ovine uterine lumen. II. Glucose transporters in the uterus and peri-implantation conceptuses. **Biology of Reproduction**, [S./], v. 80, p. 94-104, 2009.

GATTÁS, G.; BRUMANO, G. Ácido linoléico conjugado (CLA). **Rev. Eletrônica Nutritime**, [S./], v. 2, p. 164-171, 2005.

GIFFORD, C. A.; ASSIRI, A. M.; SATTERFIELD, M. C.; SPENCER, T. E.; OTT, T. L. Receptor transporter protein 4 (RTP4) in endometrium, ovary, and peripheral blood leukocytes of pregnant and cyclic ewes. **Biology of Reproduction**, [S.I.], v. 79, p. 518-524, 2008.

GIFFORD, C. A.; RACICOT, K.; CLARK, D. S.; AUSTIN, K. J.; HANSEN, T. R.; LUCY, M. C.; DAVIES, C. J.; OTT, T. L. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, non-pregnant dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [S.I.], v. 90, p. 274-280. 2007.

GINTHER, O. J. Producing color-flow images. *In*: GINTHER, O. J. (ed.). **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-doppler ultrasonography**. Cross Plains: Equiservices Publishing, 2007.

GINTHER, O. J.; FUENZALIDA, M. J.; SHREATHA, H. K.; BEG, M. A. Concomitance of luteinizing hormone and progesterone oscillations during the transition from preluteolysis to luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, [S.I.], 2010a.

GINTHER, O. J. SHREATHA, H. K.; BEG, M. A. Circulating hormone concentration within a pulses of a metabolite of prostaglandin F₂α during preluteolysis and early luteolysis in heifer. **Animal Reproduction Science**, [S.I.], v. 122, p. 253-258, 2010b.

GONZALEZ-SERRANO, A. F.; PIRRO, V.; FERREIRA, C. R.; OLIVERI, P.; EBERLIN, L. S.; HEINZMANN, J.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; COOKS, R. G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. **PLoS One**, [S.I.], v. 8, p. 74981. 2013.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell. **Biol. Repro.**, [S.I.], v. 38, p. 1027–1034, 1988.

GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminantes. **Journal of Reproduction and Fertility**, [S.I.], 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.I.], v. 5, p. 281-283, 1993.

HA, Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, [S.I.], v. 8, p. 1881-1887, 1987.

HA, Y. L.; STORKSON, J.; PARIZA, M. W. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. **Cancer Res.**, [S.I.], v. 50, p. 1097–1101, 1990.

HARRIS, M. A.; HANSEN, R. A.; VIDSUDHIPHAN, P.; KOSLO, J. L.; THOMAS, J. B.; WATKINS, B. A.; ALLEN, K. G. D. Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostaglandins and matrix metalloproteinase production. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, [S.I.], v. 65, p. 23-29, 2001.

HAYASHI, K.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. WNTs in the ovine uterus: potential regulation of periimplantation ovine conceptus development. **Endocrinology**, [S.l.], v. 148, p. 3496-3506, 2007.

HIZAKI, H.; SEGI, E.; SUGIMOTO, Y.; HIROSE, M.; SAJI, T.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; NODA, Y.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [S.l.], v. 96, p. 10501–10506, 1999.

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.

HAWKINS, D. E.; BELFIORE, C. J.; KILE, J. P.; NISWENDER, G. D. Regulation of messenger ribonucleic acid encoding 3 β hydroxysteroid dehydrogenase/D5-D4-isomerase in the ovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, [S.l.], v. 48, p. 1185-1190, 1993.

IP, C.; CHIN, S. F.; SCIMECA, J. A.; PARIZA, M. W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivate of linoleic acid. **Cancer Res.**, Birmingham, v. 51, p. 6118-6124, 1991.

KAWANABE, Y.; NOZAKI, K.; HASHIMOTO, N.; MASAKI, T. Involvement of extracellular Ca²⁺ influx and epidermal growth factor receptor tyrosine kinase transactivation in endothelin-1-induced arachidonic acid release. **J. Pharmacol.**, [S.l.], v.139, p. 1516-1522, 2003.

KARAŞAHİN, 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.

KAY, J. K.; MACKLE, T. R.; BAUMAN, D. E.; THOMSON, N. A.; BAUMGARD, L. H. Effects of a supplement containing trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on bioenergetic and milk production parameters in grazing dairy cows offered ad libitum or restricted pasture. **J. Dairy Sci.**, [S.l.], v. 90, p. 721–730, 2007.

KIM, S.; CHOI, Y.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Identification of genes in the ovine endometrium regulated by interferon tau independent of signal transducer and activator of transcription 1. **Endocrinology**, [S.l.], v. 144, p. 5203-5214, 2003.

LAGER, S.; GACCIOLI, F.; RAMIREZ, V.I.; JONES, H. N.; JANSSON, T.; POWELL, T. L. Oleic acid stimulates system A amino acid transport in primary human trophoblastic cells mediated by the Toll-like receptor 4. **J. Lipid Res.**, [S.l.], v. 54, p. 725–733, 2013.

LAMBERTZ, S. T.; NILSSON, C.; HALLANVUO, S.; LINDBLAD, M. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, p. 6060–6067, 2008.

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

LAPA, M.; MARQUES, C.; ALVES, S.; VASQUES, M.; BAPTISTA, M.; CARVALHAIS, I. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reprod. Domestic. Anim.**, [S./], v. 46, p. 904-910, 2011.

LEE, K. N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, [S./], v. 108, p. 19–25, 1994.

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

LIEW, C.; SHUT, H. A. J.; CHIN, S. F.; PARIZA, M. W.; DASHWOOD, R. H. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3methylimidazol[4,5-f]quinolininduced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. **Carcinogenesis, Oxford**, [S./], v. 16, p. 3037-3043, 1995.

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

LIU, C. H.; LEE, M. S.; HSIEH, C. H.; HUANG, C. C.; TSAO, H. M.; HSIEH, Y. S. Prostacyclin enhances mouse embryo development and hatching but not increased embryonic cell number and volume. **Fertil Steril.**, [S./], v. 86, Suppl. 4, p. 1047-1052, 2006.

McCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **American Physiological Society**, [S./], v. 79, p. 263-323, 1999.

MAGNESS, R. R.; HUIE, J. M.; HOYER, G. L.; HUECKSTEADT, T. P.; REYNOLDS, L. P.; SEPERICH, G. J.; WHYSONG, G.; WEEMS, C. W. Effect of chronic ipsilateral or contralateral intrauterine infusion of prostaglandin E2 (PGE2) on luteal function of unilaterally ovariectomized ewes. **Prostaglandins and Medicine**, [S./], v. 6, n. 4, p. 389-401, 1981.

MANTZIORIS, E.; JAMES, M. J.; GIBSON, R. A.; CLELAND, L. G. Differences exist in the relationships between dietary linoleic and α -linolenic acids and their respective long-chain metabolites. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, [S./], v. 61, p. 320-324, 1995.

MAPLETOFT, R. J.; GINTHER, O. J. Adequacy of main uterine vein and the ovarian artery in the local venoarterial pathway for uterine-induced luteolysis in ewes. **American Journal of Veterinary Research**, [S./], v. 36, n. 7, p. 957-963, 1975.

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./], v. 69, p. 780-787, 2003.

MAYA-SORIANO, M. J.; TABERNER, E.; LOPEZ-BEJAR, M. Retinol improves *in vitro* oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. **Zygote**, [S./], v. 21, p. 377–384, 2013.

MEIER, S.; LEDGARD, A. M.; SATO, T. A.; PETERSON, A. J.; MITCHELL, M. D. Polyunsaturated fatty acids differentially alter PGF_{2a} and PGE₂ release from bovine trophoblast and endometrial tissues during short-term culture. **Animal Reproduction Sciences**, [S.I.], v. 111, p. 353-360, 2009.

MENEZO, Y.; RENARD, J. P.; DELOBEL, B.; PAGEAUX, J. F. Kinetic study of fatty acid composition of day 7 to day 14 cow embryos. **Biol. Reprod.**, [S.I.], v.26, p. 787–790, 1982.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUMA, K. WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; WATANABE, S., HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T. J. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in cow. **Domest Anim Endocrinol**, [S.I.], v. 29, p. 329-339, 2005.

MILLER, C. C.; PARK, Y.; PARIZA, M. W.; COOK, M. E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, [S.I.], v. 198, p. 1107–1112, 1994.

MOON, E. J.; LEE, Y. M.; KIM, K. W. Anti-angiogenic activity of conjugated linoleic acid on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. **Oncol. Rep.**, [S.I.], v. 10, p. 617–621, 2003.

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.I.], v. 74, p. 491-498, 2013.

NARUMIYA, N.; NARUMIYA, Y.; SUGIMOTO, F. USHIKUBI. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol. Rev**, [S.I.], v.79, p. 1193-1226, 1999.

NIRINGIYUMUKIZA, J. D.; CAI, H.; XIANG, W. Prostaglandin E₂ involvement in mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early implantation. **Reproductive Biology And Endocrinology**, [S.I.], v. 16, n. 1, p. 211-215, 1 maio 2018.

NICOLOSI, R. J.; ROGERS, E. J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J. A.; HUTH, P. J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Artery**, [S.I.], v. 22, p. 266–277, 1997.

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.I.], v.16, p. 43, 2018.

OCHOA, J. J.; FARQUHARSON, A. J.; GRANT, I.; MOFFAT, L. E.; HEYS, S. D.; WAHLE, K. W. J. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. **Carcinogenesis**, [S.I.], v. 25, p. 1185–1191, 2004.

O'GORMAN, A.; WALLACE, M.; COTTELL, E.; GIBNEY, M. J.; MCAULIFFE, F. M.; WINGFIELD, M.; BRENNAN, L. Metabolic profiling of human follicular fluid identifies potential biomarkers of oocyte developmental competence. **Reproduction**, [S.I.], v. 146, p. 389–395, 2013.

OLDICK, B. S.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; GYAWU, P. Abomasal infusion of glucose and fat – effects on digestion, production, and ovarian and uterine functions of cows. **J. Dairy Sci.**, [S.l.], v. 80, p. 1315-1328, 1997.

OSKOLKOVA, O.; SARICH, N.; TIAN, Y.; GAWLAK, G.; MENG, F.; BOCHKOV, V. N.; BERDYSHEV, E.; BIRUKOVA, A. A.; BIRUKOV, K. G. Incorporation of iloprost in phospholipase-resistant phospholipid scaffold enhances its barrier protective effects on pulmonary endothelium. **Sci. Rep.**, [S.l.], v. 8, p. 879, 2018.

OLIVEIRA, J. F.; HENKES, L. E.; ASHLEY, R. L.; PURCELL, S. H.; SMINOVA, N. P.; VEERAMACHANENI, D. N.; ANTHONY, R. V.; HANSEN, T. R. Expression of interferon (IFN) - stimulated genes in extrauterine tissues during pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. **Endocrinology**, [S.l.], v. 149, p. 1252-1259, 2008.

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.

OLIVEIRA, M. A.; D’ALEXANDRI, F. L.; PUGLIESI, G.; HOECK, V. V.; MESQUITA, F. S.; MEMBRIVE, C. M. B.; NEGRÃO, J. A.; WHEELLOCK, C. E.; BINELLI, M. Peri-ovulatory endocrine regulation of the prostanoid pathways in the bovine uterus at early dioestrus. **Reproduction, Fertility and Development**, [S.l.], v. 29, p. 544-556, 2015.

OSTROWSKA, E.; MURALITHARAN, M.; CROSS, R. F.; BAUMAN, D. E.; DUNSHEA, F. R. Dietary Conjugated Linoleic Acids Increase Lean Tissue and Decrease Fat Deposition in Growing Pigs. **J. Nutr.**, [S.l.], v. 129, p. 2037–2042, 1999.

PACZKOWSKI, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; KRISHER, R. L. Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake and is essential to oocyte competence. **Reproduction**, [S.l.], v. 148, p. 429-39, 2014.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid, **Prog. Lipid Res.**, [S.l.], v. 40, p. 283–298, 2001.

PARODI, P. W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. **Journal Dairy Science**, [S.l.], v. 82, p. 1339-1349, 1999.

PARRY, S.; STRAUSS, J. F. Premature rupture of the fetal membranes. **New Engl. J. Med.**, [S.l.], v. 338, p. 663–669, 1998.

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.

PEREIRA, R. M. ; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PORTUGAL, P. V.; BESSA, R. J. B.; SILVA, J. C. E.; PEREIRA, M. S.; MARQUES, C. C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). **Anim. Reprod. Sci.**, [S./], v. 98, n.3–4, p. 293–301, 2007.

PHONGNIMITR, T.; LIANG, Y.; SRIRATTANA, K.; PANYAWAI, K.; SRIPUNYA, N.; TREETAMPINICH, C.; PARNPAI, R. Effect of L-carnitine on maturation, cryotolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. **Anim. Sci. J.**, [S./], v. 84, p. 719–725, 2013.

REXROAD, C. E.; POWELL, A. M. The ovine uterus as a host for in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, [S./], v.52, p. 0–364, 1999.

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./], v. 70, p. 3505-3513, 1992.

RIOS-ESTEVEZ, J.; RESH, M. D. Stearoyl CoA desaturase is required to produce active, lipid-modified Wnt proteins. **Cell Rep.**, [S./], v. 4, p. 1072–81, 2013.

RHODES, R. C.; MCCARTOR, M. M.; RANDEL, R. D. Effect of feeding protein protected lipid upon growth and reproductive development of yearling heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 46, p. 769 – 777, 1978.

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./], 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.

ROWE, T. F.; KING, L. A.; MACDONALD, P. C.; CASEY, M. L. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in human amnion mesenchymal and epithelial cells. **Am J Obstet Gynecol**, [S./], v. 176, p. 915–921, 1997.

SAITO, O.; GUAN, Y.; QI, Z.; DAVIS, L. S.; KÖMHÖFF, M.; SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; BREYER, R. M.; BREYER, M. D. Expression of the prostaglandin F receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, [S. /], v. 284, n. 6, p. F1164–F1170, 2003.

SALEHI, R.; COLAZO, M. G.; OBA, M.; AMBROSE, D. J. A pre-calving diet supplemented with oilseeds rich in oleic or linoleic acid reduced GnRH- induced LH release in dairy cows during the second week postpartum. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, [S./], v. 13, n. 69, 2015.

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./], v. 80, n. 1-2, p. 31-45, 2004.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Barra Bonita, v. 32, p. 35-50, 2004.

SCENNA, F. N.; EDWARDS, J. L.; ROHRBACH, N. R.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N. Detrimental effects of prostaglandin F2alpha on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, [S.l.], v. 73, p. 215-226, 2004.

SCHOENHERR, W.; JEWELL, D. Effect of conjugated linoleic acid on body composition of mature obese beagles. **FASEB J**, [S.l.], v. 13, p. A262, 1999.

SEIDEL, G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, [S.l.], v. 65, p. 228-35, 2006.

SEHAT, N.; KRAMER, J. K. G.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P.; ROACH, J. A. G.; EULITZ, K.; MOREHOUSE, K. M.; KU, Y. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral re-constructed ion profiles comparison of chromatographic elution sequences. **Lipids**, [S.l.], v. 33, p. 963–971, 1998.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCRACKEN, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON, L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha during luteolysis in ruminants. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 45, n. 5, p. 655–663, 1991.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle-an overview. **Reproduction Domestic Animals**, [S. l.], v. 39, p. 241-251, 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.

STAPLES, C. R; BURKE, J. M; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], 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, p. 502–510, 2014.

SUDANO, M. J.; RASCADO, T. D. S.; TATA, A.; BELAZ, K. R. A.; SANTOS, V. G.; VALENTE, R. S.; MESQUITA, F. S.; FERREIRA, C. R.; ARAÚJO, J. P.; EBERLIN, M. N.; LADIM-ALVARENGA, F. D. C. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, [S. l.], v. 86, p. 472–84, 2016.

SUGIMOTO, Y.; YAMASAKI, A.; SEGI, E.; TSUBOI, K.; AZE, Y.; NISHIMURA, T.; OIDA, H.; YOSHIDA, N.; TANAKA, T.; KATSUYAMA, M.; HASUMOTO, K.; MURATA, T.; HIRATA, M.; USHIKUBI, F.; NEGISHI, M.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. **Science**, [S. l.], v. 277, n. 5326, p. 681–683, 1997.

TALBOT, N. C.; CAPERNA, T. J.; EDWARDS, J. L.; GARRETT, W.; WELLS, K. D.; EALY, A. D. Bovine blastocyst-derived trophectoderm and endoderm cell cultures: interferon tau and transferrin expression as respective *in vitro* markers. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 62, p. 235-247, 2000.

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. 1435-1440, 2001.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; TANEMURA, K.; KIM, H. J.; TANGE, T.; OKUYAMA, H. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, [S. l.], v. 49, p. 1534–1542, 2000.

TANIKAWA, M.; ACOSTA, T. J.; FUKUI, T.; MURAKAMI, S.; KORZEKWA, A.; SHARZYNSHI, D. J.; PIOTROWSKA, K. K.; PARCK, C. K.; OKUDA, K. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin - 1 α in bovine endometrium during estrous cycle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediat**, [S. l.], v. 78, p. 279-290, 2005.

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.

VARGA, J.; DIAZ-PEREZ, A.; ROSENBLOOM, J.; JIMENEZ, S. A. PGE2 causes a coordinate decrease in the steady-state level of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts. **Biochim Biophys Res Commun**, [S. l.], v. 147, p. 1282–1288, 1987.

VANHOLDER, T.; LEROY, J. L. M. R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; MAES, D.; CORYN, M.; DE KRUIF, A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, [S. l.], v. 87, p. 33–44, 2005.

VANROOSE, G.; KRUIF, A.; SOOM, A. V. Embryonic mortality and embryo–pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 60-61, p.131-143, 2000.

VIANA, J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, Champaign, v. 38, n. 4, p. 1-15, 2020.

VILELLA, F.; RAMIREZ, L.; BERLANGA, O.; MARTINEZ, S.; ALAMA, P.; MESEGUER, M.; PELLICER, A.; SIMON, C. PGE2 and PGF2 α concentrations in human endometrial fluid as biomarkers for embryonic implantation. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, [S. l.], v. 98, p. 4123–32, 2013b.

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.; RANDEL, R. D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Vet. J.**, [S. l.], v. 171, p. 206-228, 2006.

WEEMS, C. W.; WEEMS, Y. S.; LEWIS, A. W.; NEUENDRORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Effects of agonist on bovine luteal or caruncular endometrial secretion of prostaglandin E2 and F2a (PGE2; PGF2a) or progesterone (P4). **Soc. Reprod. Fertil.**, [S. l.], Suppl. 64, p. 552, 2007.

WENTZEL, P.; WELSH, N.; ERICKSSON, UJ. 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.

WENDELL, S. G.; BAFFI, C.; HOLGUIN, F. Fatty acids, inflammation, and asthma. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 133, n. 5, p. 1255–1264, 2014.

YENUGANTI, V. R.; VIERGUTZ, T.; VANSELOW, J. Oleic acid induces specific alterations in the morphology, gene expression and steroid hormone production of cultured bovine granulosa cells. **Endocrinol.**, [S. l.], v. 232, p. 134–44, 2016.