

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

Mariana Berlato Casagrande

**Efeitos da suplementação com diferentes ácidos graxos
sobre a síntese de prostaglandina F2 α e E2 em células
trofoblásticas bovinas cultivadas *in vitro***

Dracena
2024

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

Mariana Berlato Casagrande

**Efeitos da suplementação com diferentes ácidos graxos
sobre a síntese de prostaglandina F2 α e E2 em células
trofoblásticas bovinas cultivadas *in vitro***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas –
Unesp, Câmpus de Dracena como parte das
exigências para graduação em Zootecnia.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Dracena

2024



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



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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Efeitos da suplementação com diferentes ácidos graxos sobre a síntese de prostaglandina F2 α e E2 em células trofoblásticas bovinas cultivadas *in vitro*.

Modalidade: Trabalho de Pesquisa.

Autor: Mariana Berlato Casagrande.

Orientador (a): Claudia Maria Bertan Membrive.

Número de Créditos: 15.

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 13/06/2024.

		
Claudia Maria Bertan Membrive	Ricardo da Fonseca	Adriano Felipe Mendes

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, ***Solange Aparecida Berlato Casagrande*** e ***Valdemir Casagrande***, que sempre me apoiam e incentivam, sendo fundamentais nessa trajetória e possibilitando mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, pela vida e as oportunidades que me possibilitaram mais essa conquista, por me guiar e abençoar e sempre ser generoso comigo.

Agradeço aos meus pais, **Solange Aparecida Berlato Casagrande** e **Valdemir Casagrande**, pelo apoio incondicional e suporte em todos os momentos da minha vida e trajetória acadêmica.

Agradeço também a todos que fizeram parte dessa jornada, pelos bons momentos e recordações. Ao **Silas Eduardo da Silva**, por todo o apoio e companheirismo. Aos **meus amigos** que estiveram presentes durante a trajetória.

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

À **Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPE)** pela concessão da bolsa de Iniciação Científica **PIBIC**, que permitiu a realização do referido trabalho.

Em especial agradeço a **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**, minha orientadora, por todo o empenho e dedicação, pelos ensinamentos e oportunidades que contribuem com a minha formação, como a de realizar uma iniciação científica e este trabalho de conclusão de curso.

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

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

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

Ao **Prof. Dr. Guilherme Pugliesi**, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na realização das mensurações por ELISA para a quantificação da PGF2 α e PGE₂ e pela valiosa ajuda nas análises estatísticas.

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

A **Ms. Amanda Guimarães da Silva**, do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pela colaboração, disposição e atenção dispensada para auxiliar nas análises de mensurações por ELISA para a quantificação da PGF2 α e PGE2.

Ao **Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE)** e a todos os seus integrantes. Agradeço o apoio, companheirismo e principalmente por todo trabalho que desenvolvemos juntos durante esse tempo. Em especial, aos meus amigos e companheiros de equipe **Adriano Felipe Mendes, Lucas de Oliveira Bezerra, Laura Chuba Machado Rolniche, Gabriel Souza da Silva, Maria Eduarda Rocha Pinto, Catarina Lazarevicius Prestes, Emily Silva do Nascimento, Eduardo Carvalho Bernardo**, agradeço pelo apoio e amizade durante o desenvolvimento de todo experimento. Agradeço principalmente ao Lucas e a Laura pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho, sem vocês este projeto de pesquisa não teria sido concluído com êxito.

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

“Nós não precisamos de magia para mudar o mundo. Nós já temos todo o poder que precisamos dentro de nós mesmos. Nós temos o poder de imaginar o melhor.”

(J.K. Rowling)

RESUMO

As prostaglandinas E2 e F2 α são sintetizadas pelo endométrio materno e células trofoblásticas do embrião. A PGE2 exerce efeitos luteotróficos que favorecem o reconhecimento materno-fetal (RMF) enquanto a PGF2 α exerce ações luteolíticas. Ácidos graxos (AG) específicos alteram a biossíntese das prostaglandinas. Modificações que resultem no aumento síntese de PGE2, diminuição na síntese de PGF2 α e/ou aumento da razão PGE2/PGF2 α , podem beneficiar o embrião no RMF. A hipótese é que a suplementação com CLA, AL, AO ou EPA + DHA no meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1) reduz a síntese de PGF2 α , aumenta síntese de PGE2 e aumenta a razão PGE2/PGF2 α . Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com AG específicos no meio de cultivo das células trofoblásticas bovinas (CT-1) na síntese de PGE2, PGF2 α e na razão PGE2/PGF2 α . As CT-1 foram cultivadas por 24 dias em garrafas de cultivo, a 38,5°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após, foram transferidas para placas de 6 poços contendo meio acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB), onde foram cultivadas por 5 dias. As CT-1 receberam meio de cultivo isento de SFB por 24 horas. Em seguida, os poços receberam meio sem SFB contendo 100 μ M de ácido linoleico conjugado (CLA), 100 μ M de ácido linoleico (AL), 100 μ M de ácido oleico (AO) ou 50 μ M de ácido eicosapentaenoico (EPA) + 50 μ M de ácido docosahexaenoico (DHA) durante 5 minutos, 24, 48 e 72 horas; em um total de 5 replicatas. As concentrações de PGE2 e PGF2 α foram determinadas por ELISA. A análise estatística foi realizada pelo PROC MIXED do SAS, considerando o poço como unidade experimental. Não houve diferença estatística para a síntese de PGE2 e PGF2 α no tempo de 5 minutos entre os diferentes grupos. No grupo tratado com AL, comparado ao controle, observou-se uma maior síntese de PGE2 após 24, 48 e 72 horas. A síntese PGF2 α foi maior no grupo AL e AO quando comparado ao controle nos tempos 24, 48 e 72 horas. A síntese de PGF2 α foi menor no grupo EPA+DHA comparado ao grupo controle em 48 e 72 horas. A razão PGE2/PGF2 α foram maiores nos grupos CLA, AL, EPA+DHA comparados ao grupo controle para 24, 48 e se manteve por 72 horas apenas no grupo EPA+DHA comparado ao controle. Em conclusão, o AL aumenta síntese de PGE2 e PGF2 α com 24, 48 e 72 horas de cultivo, contudo a razão PGE2/PGF2 α foi aumentada em 24 e 48 horas de tratamento. O EPA+DHA diminui a síntese de PGF2 α e aumentou a razão PGE2/PGF2 α em 48 e 72 horas de tratamento.

Palavras-chave: ácidos graxos, prostaglandina, células trofoblásticas, bovino.

ABSTRACT

Prostaglandins E₂ and F₂ α are synthesized by the maternal endometrium and embryo trophoblastic cells. PGE₂ exerts luteotrophic effects favoring maternal pregnancy recognition (MPR), while PGF₂ α exerts luteolytic actions. Specific fatty acids (FA) alter the biosynthesis of prostaglandins. Modifications that result in increased PGE₂ synthesis, decreased PGF₂ α synthesis, and/or increased PGE₂/PGF₂ α ratio; may benefit the embryo in the MPR. The hypothesis is that supplementation with CLA, AL, AO or EPA + DHA in the culture medium of bovine trophoblastic cells (TC-1) reduces PGF₂ α synthesis, increases PGE₂ synthesis and increases the PGE₂/PGF₂ α ratio. This study aimed to evaluate the effects of supplementation with specific FAs in the culture medium of bovine trophoblastic cells (TC-1) on the synthesis of PGE₂, PGF₂ α , and the PGE₂/PGF₂ α ratio. TC-1 was cultivated in culture bottles at 38.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Afterward, they were transferred to 6-well cell culture dishes containing medium added with 10% fetal bovine serum (FBS) and were cultured for 5 days. TC-1 received an FBS-free culture medium for 24 hours. Then, the wells received FBS-free medium containing 100 μ M conjugated linoleic acid (CLA), 100 μ M linoleic acid (LA), 100 μ M oleic acid (OA), or 50 μ M eicosapentaenoic acid (EPA) + 50 μ M docosahexaenoic acid (DHA) for 5 minutes, 24, 48 and 72 hours; in a total of 5 replicates. PGE₂ and PGF₂ α concentrations were determined by ELISA. Statistical analysis was performed by SAS PROC MIXED, considering the well as the experimental unit. There was no difference in the synthesis of PGE₂ and PGF₂ α within 5 minutes between the different groups. In the group treated with LA compared to the Control, a greater synthesis of PGE₂ was observed after 24, 48 and 72 hours. PGF₂ α synthesis was higher in the AL and OA groups when compared to the Control at times 24, 48 and 72 hours. PGF₂ α synthesis was lower in the EPA+DHA group compared to the Control group at 48 and 72 hours. The PGE₂/PGF₂ α ratio was higher in the CLA, LA, EPA+DHA groups compared to the Control group for 24, 48, and was maintained for 72 hours only in the EPA+DHA group compared to the Control. In conclusion, LA increases the synthesis of PGE₂ and PGF₂ α at 24, 48, and 72 hours of culture, however, the PGE₂/PGF₂ α ratio was increased at 24 and 48 hours of treatment. EPA+DHA decreased PGF₂ α synthesis and increased the PGE₂/PGF₂ α ratio at 48 and 72 hours of treatment.

Keywords: fatty acids, prostaglandin, trophoblastic cells, bovine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Matrigel sendo depositada no fundo da garrafa de cultivo para a adesão das CT-128
- Figura 2** - CT-1 descongeladas sendo ressuspensas em tubo cônico contendo 15 mL de meio DMEM suplementado com SFB29
- Figura 3** - CT-1 durante a segunda replicação, onde as células ficaram 12 dias na incubadora com atmosfera controlada e atingiram 80-90% de confluência, momento em que estão prontas para serem transferidas para as placas de 6 poços.....30
- Figura 4** - Coleta do meio de cultivo para mensuração das concentrações de PGE2 e PGF2 α por ELISA 32
- Figura 5** - Diluição da curva padrão para validação da placa de amostras de PGF2 α33
- Figura 6** - Figura 5. Esquema do preparo da curva padrão da placa de amostras para PGF2 α com as adequações necessárias de acordo com o modelo esquemático 34
- Figura 7** - Esquema do preparo da curva padrão da placa de amostras para PGE2 com as adequações necessárias de acordo com o modelo esquemático 34
- Figura 8** - Placa de ELISA após as duas séries de incubações pronta para ser lida no espectrofotômetro..... 36
- Figura 9** - Efeito da suplementação com 100 M de diferentes ácidos graxos (CLA, AL, AO e EPA+DHA) e um grupo controle (CT) em meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na síntese de PGE2 por 5 min, 24, 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). 39
- Figura 10** - Efeito da suplementação com 100 M de diferentes ácidos graxos (CLA, AL, AO e EPA+DHA) e um grupo controle (CT) em meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na síntese de PGF2 α por 5 min, 24, 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). 40
- Figura 11** - Efeito da suplementação com 100 M de diferentes ácidos graxos (CLA, AL, AO e EPA+DHA) e um grupo controle (CT) em meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na razão PGE2/PGF2 α por 5 min, 24, 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema de pipetagem da placa de validação da curva padrão e concentração de amostras para ELISA 35

Tabela 2 - Modelo esquemático da montagem da placa de ELISA para uma das prostaglandinas, onde nas strips 1 e 2 continha a curva padrão validada na primeira placa e nas strips de 3 a 12, 40 amostras de meio de cultivo de células CT-1, na diluição 1:300 e 1:1000 tratado ou não com os ácidos graxos.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
μL	Microlitro
AA	Ácido araquidônico
AGI	Ácidos graxos insaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AL	Ácido linoleico
BSA	Albumina sérica bovina
CL	Corpo lúteo
CLA	Ácido linoleico conjugado
CT1	Células trofoblásticas tipo 1
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMEM	Meio de Dulbecco Modificado
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPA	Ácido eicosapentaenóico
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IFN-t	Interferon-tau
LA	Ácido linoleico
OA	Ácido oleico
P4	Progesterona
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2α	Prostaglandina F2 alfa
PGI2	Prostaglandina I2
PIVE	Produção de embriões <i>in vitro</i>
RMF	Reconhecimento materno-fetal
RMP	Reconhecimento materno da prenhez
SFB	Soro fetal bovino
TETF	Transferência de embriões em tempo fixo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA... ..	18
3.1 Mortalidade embrionária precoce e reconhecimento materno-fetal	18
3.2 Prostaglandinas F2 α e E2.....	20
3.3 Efeitos dos ácidos graxos na síntese de prostaglandinas em células reprodutivas... ..	23
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS	26
5 MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1 Local do experimento	27
5.2 Preparação da Matriz de Membrana Basal Matrigel para o Início do Cultivo Celular... ..	27
5.3 Propagação das células trofoblásticas... ..	28
5.4 Cultivo das células trofoblásticas... ..	30
5.5 Suplementação do meio com os diferentes ácidos graxos... ..	31
5.6 Coleta do meio de cultivo e das CT-1.....	32
5.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).	32
5.8 Análise estatística	37
6. RESULTADOS	38
6.1 Concentrações de PGE2	38
6.2 Concentrações de PGF2 α	39
6.3 Razão PGE2/PGF2 α	41
7 DISCUSSÃO.....	43
8 CONCLUSÃO... ..	45
7 REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande representatividade no cenário da pecuária mundial. O rebanho bovino brasileiro alcançou o recorde de 234,4 milhões de animais em 2022, com alta de 4,3% em relação ao ano anterior, segundo a Pesquisa Produção da Pecuária Municipal 2022 divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O tamanho do rebanho mundial de bovinos é de cerca de 1 bilhão de animais, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), sendo a Índia o país com maior rebanho em número de cabeças, seguida do Brasil, China e Estados Unidos. O maior rebanho bovino comercial do mundo é do Brasil, considerando o número de cabeças abatidas, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, sigla do inglês Food and Agriculture Organization), 2022. O Brasil ocupa também a vice-liderança em produção de carne, atrás apenas dos Estados Unidos (USDA, 2023). Assim sendo, a pecuária brasileira tem grande destaque internacional, por sua produtividade e tamanho.

Segundo dados do IBGE, foram produzidas 8,91 milhões de toneladas de carne bovina em 2023, alcançando um recorde, 11,2% a mais que em 2022 e 8,6% acima do recorde anterior de 2019. De acordo com pesquisadores do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), a quantidade de carne aumentou em 900 mil toneladas frente a 2022, ao passo que a exportação foi de 2,29 milhões de toneladas, aumentando apenas 22,8 mil toneladas. A previsão para a exportação em 2024 é de 2,955 milhões de toneladas de carne bovina, superando as 2,898 milhões de toneladas do ano passado. O consumo interno deve ficar em 8,465 milhões de toneladas neste ano, à frente das 8,107 milhões de toneladas em 2023, segundo o USDA.

A demanda mundial por alimentos cresce de forma proporcional ao aumento da população (FEDOROFF, 2010). A alta produção nacional visa atender esta demanda. Para alcançar esse objetivo é necessário ter uma excelente produtividade, que na bovinocultura de corte depende da eficiência reprodutiva das fêmeas, as quais devem produzir um bezerro por matriz a cada ano, o que significa um intervalo entre partos de doze meses.

Para uma melhor eficiência reprodutiva dos bovinos, a definição da estação de monta na época certa, a detecção de cio, o controle sanitário do rebanho, a

quantidade de bezerros nascidos vivos e desmamados, e a determinação da idade de desmama são fatores importantes. Para alcançar o sucesso reprodutivo, o melhoramento genético também é um aliado, para isso devem ser escolhidos os melhores reprodutores, que passem as características positivas de produção aos seus descendentes. A busca por melhores índices reprodutivos é contínua e grandes oportunidades podem ser encontradas na rotina do sistema de produção (SUMMERS et al., 2004).

Para alcançar o sucesso reprodutivo, o emprego de biotecnologias é crescente. Um exemplo é a inseminação artificial (IA), com observação de cio, ou a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que permite eliminar a necessidade de detecção de estro além de concentrar mais as concepções, que trazem inúmeras vantagens: controle de doenças, cruzamento entre raças, melhoramento genético do rebanho em menor tempo, controle zootécnico do rebanho, entre outras (ASBIA, 2019).

Além da IA e IATF, há a Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF), com produção *in vivo* de embriões bovinos, que consiste na estimulação hormonal dos ovários para superovulação ou indução de ovulações múltiplas de uma vaca, doadora, para induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente. Os embriões são coletados através de uma lavagem uterina e transferidos para outras vacas, receptoras, que deverão levar a gestação adiante. O número de transferências de embriões realizadas na América do Sul entre 2019 e 2020 cresceu 20,7%, sendo essa região responsável pela transferência de 55,2% dos embriões *in vitro* do mundo (VIANA, 2021).

Outra biotecnologia utilizada é a Produção *in Vitro* de Embriões (PIVE), que produz embriões fora do organismo materno, em condições laboratoriais. O Brasil consagrou-se como o 2º maior produtor de embriões bovinos do mundo em 2019, sendo que 93,8% dos embriões foram gerados pela PIVE (SBTE, 2021). A produção total de embriões *in vitro* transferíveis no Brasil em 2022 foi de 434,198, ficando apenas atrás dos Estados Unidos com 745,684 embriões (IETS, 2022). Também pode ser feito o cultivo de células reprodutivas *in vitro*, como as células trofoblásticas.

O almejado sucesso na reprodução bovina encontra um empecilho, a falha no reconhecimento materno-fetal (RMF), que causa mortalidade embrionária precoce, que ocorre no período crítico situado entre os dias 15 e 17 após a fecundação (BINELLI et al., 2001).

Para que ocorra a prenhez, a liberação pulsátil de $\text{PGF2}\alpha$ deve ser inibida pelo concepto (embrião e membranas anexas), uma vez que esta causa a luteólise, promove falência do corpo lúteo e reduz as concentrações circulantes de progesterona, hormônio essencial para a manutenção da prenhez. O primeiro sinal do reconhecimento materno da prenhez é o bloqueio da produção pelo endométrio de $\text{PGF2}\alpha$. Tal reconhecimento envolve uma comunicação bioquímica entre o concepto e a mãe (SHOLL et al., 1983). Já a síntese de prostaglandina E2 (PGE2) no endométrio impede as ações luteolíticas da $\text{PGF2}\alpha$ no CL, além de exercer efeitos luteotróficos favorecendo a angiogênese e o aumento na síntese de P4 pelo CL, condição fisiológica determinante para o estabelecimento da prenhez.

O interferon-tau (IFN-t) produzido pelas células trofoblásticas do concepto, constitui a principal molécula envolvida no RMF. As ações parácrinas do IFN-t determinam alterações na biossíntese de prostaglandinas nas células endometriais, desfavorecendo a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e favorecendo a síntese de PGE2 . O IFN-t e a PGE2 , por mecanismos luteotróficos, garantem a permanência do CL e manutenção de altas concentrações circulantes de P4 , condição fundamental para o estabelecimento da prenhez (TANIKAWA et al., 2005). Estratégias que possam favorecer o RMF tornam-se de fundamental interesse econômico. Tais estratégias objetivam reduzir a capacidade de síntese de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo concepto, incluindo o aumento da síntese de PGE2 endometrial.

Existem evidências que os ácidos graxos, como o ácido linoleico (AL; ômega 6), ácido linoleico conjugado (CLA; ômega 6), ácido oleico (AO; ômega 9), ácido eicosapentanóico (EPA; ômega 3) e ácido docosahexanóico (DHA; ômega 3) podem alterar a biossíntese de PGE2 e $\text{PGF2}\alpha$ no endométrio. Embora existam diversos estudos onde foi investigado o uso de ácidos graxos em modelos *in vivo* e *in vitro*, na maior parte deles o mecanismo de ação dos ácidos graxos foi muito pouco esclarecido. Além disso, nenhum destes estudos investigaram a ação dos ácidos graxos em células trofoblásticas bovinas em comparação com embriões produzidos *in vitro*, tornando a proposta do presente estudo inédita.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mortalidade embrionária precoce e reconhecimento materno-fetal

Em rebanhos bovinos a mortalidade embrionária precoce, ocasionada por falhas no reconhecimento materno-fetal (RMF) entre os dias 14 e 19 após a fecundação, constitui uma das maiores causas de falhas reprodutivas, conforme revisado por Santos et al. (2004) e Sartori (2004). Neste período, o CL é mantido no RMP bem sucedido ou o CL é destruído quando o RMP não é realizado com êxito. O interferon-tau (IFN-t), sintetizado e secretado pelas células trofoblásticas do conceito, foi caracterizado como o principal fator envolvido no RMF na espécie bovina (ROBINSON et al., 2006; EALY; YANG, 2009). Segundo Arosh et al. (2016) e Pate (2020), o IFN-t foi identificado em 1987, sendo constituído por 172 aminoácidos e classificado como membro da família de interferon do tipo I. O IFN-t é secretado pelas células trofoblásticas do conceito no período compreendido do 10º ao 22º a 25º dias após o estro.

Fazendo uma retrospectiva do desenvolvimento embrionário, o embrião bovino inicia o seu desenvolvimento na ampola do oviduto. Por volta do 5º dia após o estro, o embrião vai para a cavidade uterina, onde atinge sequencialmente o estágio de mórula (de 4 a 7 dias de desenvolvimento) e blastocisto (de 7 a 12 dias de desenvolvimento). O blastocisto por volta do 9º a 11º dia, medindo aproximadamente 340 µm de diâmetro, apresenta uma eclosão da zona pelúcida; a partir de então assume uma forma ovóide e aumenta o seu comprimento no 14º dia de desenvolvimento. A partir deste momento, o conceito (embrião + membranas anexas) sofre um intenso e progressivo alongamento (aumento no comprimento) alcançando no 19º dia de desenvolvimento aproximadamente 190 mm. A capacidade de alongamento do conceito é altamente dependente da quantidade e composição das moléculas que constituem o ambiente uterino (histotrofo). A produção de histotrofo depende diretamente das concentrações circulantes de P4. Quanto maior o alongamento e o comprimento do conceito, maior será a produção de IFN-t pelo mesmo, condição determinante para o êxito no RMP.

Segundo Arosh et al. (2016), em fêmeas bovinas as células endometriais secretam PGF2α e PGE2 ao longo do ciclo estral, entretanto o padrão de secreção é

diferenciado de acordo com as diferentes fases do ciclo estral. As ações parácrinas do IFN- τ determinam alterações na biossíntese de prostaglandinas nas células endometriais, desfavorecendo a síntese de PGF 2α e favorecendo a síntese de PGE 2 . Estratégias que possam favorecer o RMF tornam-se de fundamental interesse econômico. Tais estratégias objetivam reduzir a capacidade de síntese de PGF 2α pelo endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo conceito, incluindo o aumento da síntese de PGE 2 endometrial.

O conceito deve ser suficientemente competente para produzir moléculas que possam estabelecer uma sinalização denominada "diálogo materno-fetal" com as células endometriais, assim bloqueando a síntese de PGF 2α endometrial. Falhas no processo de RMP, por incompetência do conceito em realizar tal sinalização, determinam a "mortalidade embrionária precoce", que acomete 20 a 40% das fêmeas bovinas de corte acasaladas. Por volta do dia 19, o embrião começa se fixar no endométrio e completa sua implantação no dia 42. A presença do embrião por volta do dia 16 do ciclo inibe a síntese e liberação de PGF 2α do endométrio (revisado por Geisert et al., 1994; Mann et al., 1999; Thatcher et al., 2001; Okuda et al., 2002), prevenindo assim a luteólise e o conseqüente declínio na produção de P 4 . Em resumo, no êxito do RMF, a prevenção da luteólise é reconhecidamente determinada pelas ações conjugadas e complementares do IFN- τ e PGE 2 (AROSH et al. 2016; PATE, 2020).

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). De maneira geral, as células trofoblásticas produzem diversos hormônios e fatores de crescimento, que estão associados com o crescimento fetal e manutenção da gestação (SCHLAFER et al. 2000, RICI et al. 2009). Em fêmeas bovinas, entre 14 e 16 dias de desenvolvimento, modificações morfológicas nas células trofoblásticas aliadas ao aumento de proliferação das mesmas, transformam o conceito esférico em uma estrutura alongada e filamentosa que ocupa a maioria da extensão do corno uterino ipsolateral a ovulação (BAZER, 1989; GUILLOMOT, 1995; ROBINSON et al., 2006). Quanto mais alongado, maior expansão das células trofoblásticas e maior síntese de IFN- τ . A produção de IFN- τ aumenta acentuadamente de 14 a 18 dias de prenhez coincidindo com a rápida alongação do conceito (EALY et al., 2001; ROBINSON et al., 2006).

Essa expressão diminui abruptamente depois de 21 dias de prenhez (XAVIER et al., 1997; ROBINSON et al., 2006).

Durante o alongamento o conceito é nutrido apenas pela secreção endometrial, denominada histotrofo. O histotrofo se caracteriza como a única fonte nutritiva para a proliferação das células trofoblásticas e alongação do conceito durante o período crítico (THATCHER et al., 2001; INSKEEP; DAILEY, 2005). A migração das células trofoblásticas é fundamental para a reorganização e morfogênese das mesmas, que exercem um papel chave no desenvolvimento do conceito durante o período que antecede a adesão (GUILMOT 1995; FERRETTI et al., 2007; BAZER et al., 2009). A adesão das células trofoblásticas ao útero não é evidenciada até 19 a 21 dias de prenhez. Assume-se que quanto mais enriquecido o histotrofo, maiores são as possibilidades de alongamento e produção de IFN- γ pelo conceito.

2.2 Prostaglandinas F2 α e E2

Durante o período de reconhecimento materno-fetal, a síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α) endometrial promove a falência funcional e estrutural do corpo lúteo (CL) caracterizando uma redução nas concentrações circulantes de progesterona (P4), condição fisiologicamente incompatível com a prenhez. A PGE2 exerce efeitos anti-luteolíticos e luteotróficos, ambos fundamentais para o êxito da prenhez (McCRACKEN et al., 1999). A prostaglandina E2 (PGE2) está envolvida em quase todo o processo reprodutivo como ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário e implantação precoce (NIRINGIYUMUKIZA et al., 2018). A PGF2 α possui uma função particularmente importante na ovulação, desenvolvimento lúteo, parto e contração da musculatura lisa uterina (SAITO et al., 2003).

O modelo do mecanismo de síntese da PGF2 α foi descrito por Burns et al. (1997). Nesse modelo clássico, os receptores de ocitocina (OXTR) fazem parte da família de receptores acoplados à proteína G. Sua ativação estimula a fosfolipase C (PLC), que atua na membrana celular hidrolisando o fosfatidil-inositol bisfosfato (PIP2) em inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG). O IP3 causa a liberação de cálcio armazenado no retículo endoplasmático, aumentando as concentrações de

cálcio no citosol. Algumas enzimas componentes da cascata de síntese de $\text{PGF}_2\alpha$, tais como proteínas quinases (PKCs) e fosfolipases A (PLAs) são dependentes do cálcio para sua ativação. Assim, o DAG na presença de cálcio ativa sequencialmente as proteínas quinases ($\text{PRKC}\alpha$, $\text{PRKC}\beta$, $\text{PRKC}\gamma$) e a fosfolipase A2 (PLA2). A PLA2 cliva o ácido araquidônico (AA) da membrana plasmática e o AA livre no citosol é convertido, pela ação da cicloxigenase 2; COX-2 (PTGS2), à prostaglandina reduzida (PGH2). A PGH2, através da ação de enzimas PGF sintases (AKR1B1 , AKR1C1 , AKR1C2 e AKR1C3) é convertida à $\text{PGF}_2\alpha$. A PGH2 também pode ser convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE2. Uma vez que $\text{PGF}_2\alpha$ e PGE2 são produzidas a partir de PGH2, as concentrações específicas destas prostaglandinas dependem da disponibilidade de PGH2 e da atividade específica de PGF e PGE sintases. A PGE2, pela ação da enzima CBR1, também pode ser transformada em $\text{PGF}_2\alpha$.

As ações do IFN-t no RMP foram relacionadas por Arosh et al. (2016) e Pate (2020) em um âmbito bastante complexo. A ação parácrina do IFN-t inicia-se no momento da sinalização, quando o IFN-t secretado no lúmen uterino se liga aos seus receptores (IFNR) na membrana das células endometriais. Tais receptores são constituídos por duas subunidades (IFNR1 e IFNR2). A ligação do IFN-t ao IFNR inicia a cascata de sinalização JAK/STAT, que resulta na formação do fator de transcrição ISGF3, que é transportado ao núcleo da célula onde inibe a transcrição gênica dos receptores de estradiol e consequentemente OXTRs. A ausência de OXTRs impede que a OT se ligue aos seus receptores, desta forma inibindo a síntese e a ocorrência dos pulsos de $\text{PGF}_2\alpha$ endometrial, impedindo a luteólise. A inibição da síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ e da luteólise pelo IFN-t é o mecanismo chave para o êxito do RMP. O IFN-t, nas células do estroma e do epitélio endometrial ainda aumenta a síntese de PGE2, onde atua desfavorecendo a via que forma $\text{PGF}_2\alpha$ e favorecendo a via de síntese da PGE2. O IFN-t também age aumentando os receptores de PGE2 nas células endometriais. Segundo Arosh et al. (2016) e Pate (2020), na ação endócrina, o IFN-t produzido pelo conceito no lúmen uterino é transportado para a veia uterina, onde pode seguir dois caminhos: A) o IFN-t vai para a circulação sistêmica onde estimula nas células imunes a expressão dos genes específicos (genes específicos estimulados pelo IFN-t; ISGs); B) o IFN-t, pela via de transporte por contracorrente, passa da veia uterina para a artéria ovariana chegando ao ovário onde irá promover um conjunto ações no CL. No CL o IFN-t exerce várias funções: A) aumenta a

proliferação celular; B) estimula a expressão de genes que promovem o aumento da secreção de P4 no CL; C) promove a sobrevivência das células endoteliais mantendo a perfusão sanguínea do CL e D) aumenta o RNAm para as proteínas que medeiam a angiogênese. Assim, o IFN- τ desfavorece no CL a luteólise funcional. O IFN- τ ainda promove no CL várias outras ações: A) diminui a síntese de citocinas no CL; B) previne a resposta das células do sistema imune que participam da luteólise estrutural e C) diminui o RNAm das proteínas que medeiam a apoptose protegendo o CL da morte celular e D) aumenta a proliferação celular no CL e diminui a abundância de RNAm nas células endoteliais de forma a prevenir a luteólise. Assim, o IFN- τ desfavorece no CL a luteólise estrutural. O IFN- τ aumenta a proliferação celular no CL e diminui a abundância de RNAm nas células endoteliais de forma a prevenir a luteólise. Sabe-se que existe um influxo de neutrófilos no CL durante o RMP, onde o IFN- τ altera a funcionalidade das células imunes, desfavorecendo a luteólise funcional e estrutural. Além do IFN- τ , o embrião bovino a partir do dia 13 de desenvolvimento também secreta prostaglandinas, como a PGE2 e a prostaglandina I2 (PGI2) que atuam de forma parácrina no endométrio, regulando a expressão de genes e funções importantes para a receptividade uterina, crescimento e desenvolvimento do conceito durante a fase inicial da prenhez. Sabe-se também que as PGE2 e PGI2 desempenham ações luteotróficas importantes no CL, favorecendo a secreção de P4. O IFN- τ favorece a síntese de PGE2 endometrial (quando não prioriza a síntese de PGF2 α e prioriza PGE2), que esta irá exercer um conjunto de ações luteotróficas que irão favorecer a manutenção e a atividade do CL. Os mecanismos de ação da PGE2 decorrem de: A) diminui a sensibilidade do CL à ação da PGF2 α ; B) estimula o aumento da produção de P4 nas células luteais e C) aumenta no tecido luteal as concentrações de AMPc e a ativação da PKA, que estimularia a síntese de P4. Portanto temos três mecanismos conjugados que favorecem o RMP, a inibição na síntese de PGF2 α , maior resistência do CL às ações luteolíticas da PGF2 α e um amplo conjunto de ações luteotróficas desencadeadas pelo IFN- τ e PGE2.

Existem três mecanismos conjugados que favorecem o RMF, a inibição na síntese de PGF2 α , maior resistência do CL às ações luteolíticas da PGF2 α e um amplo conjunto de ações luteotróficas desencadeadas pelo IFN- τ e PGE2. Diante desse contexto, ampliar o entendimento dos mecanismos de biossíntese e secreção de PGF2 α e PGE2 pelas células trofoblásticas e embriões bovinos tornam-se de grande interesse.

2.3 Efeitos dos ácidos graxos na síntese de prostaglandinas em células reprodutivas

É reconhecido que o uso de diferentes ácidos graxos pode alterar a proporção de PGF2 α e PGE2 produzidas nas células trofoblásticas em embriões e conceptos (HWANG et al., 1998). Desse modo, objetiva-se com a suplementação com os lipídios a redução da síntese de PGF2 α e o aumento da síntese de PGE2, e o aumento na relação PGE2/PGF2 α para favorecer o RMP e a redução na mortalidade embrionária precoce. A maioria dos grupos de pesquisa tem focado nos benefícios dos AO e ácido linolênico (ALA), com base em dados que sugerem que esses ácidos graxos essenciais modulam diretamente a função reprodutiva em bovinos (WILLIAMS; STANKO, 2000; HESS et al., 2005; HESS et al., 2008).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) representantes da família ômega 6, especialmente o ácido linoleico AL e o CLA reconhecidamente determinam modificações na biossíntese das prostaglandinas. De acordo com Moussavi et al. (2013), em meio de cultura de células epiteliais endometriais bovinas expostas a quantidades > 50 mM de CLAs por 24 horas, as concentrações de PGE2 e PGF2 α diminuíram significativamente. Ainda nesse estudo, o CLA t10, c12 promoveu diminuição na produção de prostaglandinas de forma mais acentuada do que o CLA c9, t11. Porém, segundo Cheng et al. (2003), em células endometriais de ovelhas, o CLA em doses mais altas suprimiu a geração de PGF2 α , enquanto baixas doses de CLA (20mM) aumentaram a geração de PGE2. Diferentes CLAs parecem ter diferentes efeitos na produção de PGF2 α e PGE2, essas diferenças são atribuídas às diferentes vias celulares afetadas por esses isômeros do LA (MOUSSAVI et al., 2013).

O AO, 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 mais de uma dupla ligação. 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 (AO, 18: 1 cis 9), é um ácido carboxílico de cadeia longa constituído por 18 carbonos e um grupo funcional COOH. Por possuir uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 do grupo metil final, é classificado como monoinsaturado e sua fórmula química é CH₃(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇COOH (ROSE;

CONNOLLY, 1999). O AO pode ser sintetizado por todos os mamíferos, incluindo humanos, a partir dos AGPI ômega 3 e 6 provenientes da dieta (PARK et al., 2014). Um único cis, a ligação dupla na posição 9, confere ao AO uma alta capacidade de solubilizar lipídios (PEREIRA et al., 2014). O AO 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 estradiol e a progesterona, além de contribuir para o aumento da absorção de vitaminas A, D, E e K e atuar em funções metabólicas e estruturais (WARZYCH et al., 2017). 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-ESTEVES, 2013).

Os AGPI, como os da família ômega 3, têm efeitos inibitórios conhecidos na PGF2 α endometrial ou uterina (Wathes et al., 2007). Meier et al. (2009) avaliaram os efeitos do ácido eicosapentanoico (EPA; 20:53 ômega 3), ácido docosahexanóico (DHA; 22:63 ômega 3) e ácido linoleico (AL; C18:26 ômega 6) em uma concentração final de 10 μ M idêntica para todos os ácidos na liberação de PGF2 α e PGE2 endometrial e do tecido trofoblástico durante uma breve cultura. Após a cultura por 5 horas a 37°C, não houve alteração na síntese de PGF2 α e PGE2, no endométrio de fêmeas prenhes e não prenhes no D16 e D17 e também em células trofoblásticas. Tais tratamentos não tiveram efeito na liberação de PGE2 nos tecidos trofoblásticos, embora houvesse uma tendência dos ácidos graxos ômega 3 (EPA e DHA) reduzirem a liberação de PGE2. Os autores alegam que utilizaram um período curto de tratamento e uma dose relativamente baixa dos diferentes ácidos graxos.

Recentemente o nosso grupo realizou um estudo (MALDONADO et al., 2023) especificamente com a suplementação com ácido linoleico conjugado [CLA; cis-9, trans-11 (c9, t11) e trans-10, cis-12 (t10, c12)] em meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1). Verificou-se que células trofoblásticas tratadas com CLA (10, 20, 50 e 100 μ M) tiveram uma redução na síntese de PGF2 α com 24, 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle (0 μ M). Também, observou-se que a razão PGE2/PGF2 α foi maior em todos os grupos tratados com CLA com 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle; tendo havido modificações na abundância de transcritos envolvidos na biossíntese de PGF2 α e PGE2. Em complemento, em outro estudo recente realizado pelo grupo (LOURENÇO, 2022), células trofoblásticas

bovinas (CT-1) foram cultivadas com AO nas concentrações de 0, 50, 100, 200, 500 e 1000 μM durante 72 horas. Em tal estudo, foi observada uma redução na síntese de $\text{PGF}_2\alpha$, aumento na síntese de PGE_2 , embora tenha sido ocasionada uma diminuição na razão $\text{PGE}_2/\text{PGF}_2\alpha$.

3. HIPÓTESE

A hipótese é que a suplementação com CLA, AL, AO ou EPA + DHA no meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1) reduz a síntese de $\text{PGF2}\alpha$, aumenta síntese de PGE2 e aumenta a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$.

4. OBJETIVOS

Objetiva-se avaliar os efeitos da suplementação com ácido linoleico conjugado [CLA; cis-9, trans-11 (c9, t11) e trans-10, cis-12 (t10, c12)], ácido linoleico (AL; C18:26; ômega 6), ácido oleico (AO; C18:1;ômega 9) e uma mistura contendo ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:53; ômega 3) + docosahexaenóico (DHA; 22:63; ômega 3) na síntese de prostaglandinas $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 e na razão $\text{PGE2/ PGF2}\alpha$ em cultivo *in vitro* de células trofoblásticas bovinas (células CT-1) com 24, 48 e 72 horas de tratamento.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local do experimento

Os procedimentos de multiplicação, propagação e cultivo *in vitro* de CT-1, os tratamentos e coleta de amostras desta pesquisa 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), campus de Pirassununga.

5.2 Preparação da Matriz de Membrana Basal Matrigel para o Início do Cultivo Celular

A matriz Matrigel® (Ref. 356237, BD Bioscience, Bedford, MA, USA) foi diluída 1:3 e 1:10, com meio não suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB), contendo 50 ml de DMEM (1X) + GlutaMAX TM -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 aminoácidos não essenciais MEM (100X) (Gibco, Ref. 11140050, Grand Island, NY, USA). Para a diluição 1:3, em 10ml de Matrigel (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) adicionou-se 20 mL de DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Para a diluição 1:10, em 10ml de Matrigel® (Ref. 356237, BD Bioscience, Bedford, MA, USA) adicionou-se 90 mL de DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). A diluição 1:3 foi utilizada apenas na primeira propagação das células imediatamente após o descongelamento. Nas passagens celulares subsequentes a diluição de Matrigel utilizada foi de 1:10.

5.3 Propagação das células trofoblásticas

As CT-1 que estavam contidas no interior do criotubo, congeladas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em água morna a 38 °C por alguns minutos e posteriormente cultivadas em garrafas de cultivo de 75 cm² (Corning, Ref. 430641U), anteriormente preparadas com uma quantia de 15 mL da matriz de membrana basal Matrigel® em diluição 1:3 (Ref. 356237, BD Bioscience, Bedford, MA, USA) e levadas para a incubadora a uma temperatura de 38,5 °C, por 2 horas, conforme ilustrado na **Figura 1**. Logo após o descongelamento, as células CT-1 contidas no criotubo foram ressuspensas em 15 mL de meio de cultivo suplementado com 10% de SFB, conforme ilustrado na **Figura 2**.

Figura 1. Matrigel sendo depositada no fundo da garrafa de cultivo para a adesão das CT-1.



Fonte: Lucas de Oliveira Bezerra.

Figura 2. CT-1 descongeladas sendo ressuspensas em tubo cônico contendo 15 mL de meio DMEM suplementado com SFB.



Fonte: Lucas de Oliveira Bezerra.

O meio de cultivo de manutenção das CT-1 foi preparado contendo 450 mL DMEM (1X), GlutaMAX TM –I (Gibco, Ref. 10569-010, Grand Island, NY, USA), 50 mL de SFB, 50 mL de solução antibiótica e antimicótica (100X) (Gibco, Ref. 15240062, Grand Island, NY, USA), 5 mL de aminoácidos não essenciais MEM (100X) (Gibco, Ref. 11140050, Grand Island, NY, USA) e 500 µL de 2-mecarptoetanol (1000X) (Gibco, Ref. 21985023, Grand Island, NY, USA).

Depois do meio contendo as CT-1 ter sido propagado dentro da garrafa, as mesmas foram cultivadas na incubadora (Panasonic, COM-19AIC(UV) a 38,5 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Aguardou-se três dias para que o meio de cultivo fosse removido. Após esse período, procedeu-se a troca de meio a cada 48 horas até as CT-1 atingirem 80-90% de confluência. A cada troca de meio utilizou-se 15 mL de meio suplementado.

Após atingirem 100% de confluência, o que ocorreu em aproximadamente 12 dias, as células foram transferidas para duas novas garrafas de cultivo, previamente preparadas com Matrigel® (1:10) contendo 15 mL de meio de manutenção suplementado. Para o processo de ressuspensão as CT-1 foram removidas das garrafas de cultivo com auxílio de um “cell scraper”, onde raspou-se toda a superfície

da garrafa de forma a promover o descolamento das células das garrafas. Posteriormente, as CT-1 foram transferidas para um tubo falcon 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 final obtido foi dividido igualmente entre duas novas garrafas previamente preparadas com Matrigel 1:10 e contendo 15 mL de meio de manutenção suplementado. Novamente, as CT-1 foram incubadas por mais 12 dias a 38,5 °C, onde realizou-se a troca do meio das novas garrafas de cultivo a cada 48 horas, conforme ilustrado na **Figura 3**, até atingirem 80-90% de confluência.

Figura 3. CT-1 durante a segunda replicação, onde as células ficaram 12 dias na incubadora com atmosfera controlada e atingiram 80-90% de confluência de confluência, momento em que estão prontas para serem transferidas para as placas de 6 poços.



Fonte: Lucas de Oliveira Bezerra.

5.4 Cultivo das células trofoblásticas

Após atingirem 80-90% de confluência em média 12 dias, as CT-1 foram novamente ressuspensas e transferidas para placas de 6 poços (Corning, Ref. 3516, NY, USA) para realização dos tratamentos com CLA, AL, AO e EPA + DHA e grupo Controle.

Após serem transferidas para as placas de 6 poços as CT-1 foram incubadas a 38,5 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ durante 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, mais os componentes de solução antibiótica e antimicótica e aminoácidos não essenciais, como relatado acima.

No 5º dia, o meio de cada poço foi novamente substituído por 4 mL de meio não suplementado com SFB contendo os respectivos tratamentos CLA, AL, AO e EPA + DHA e o grupo controle.

5.5 Suplementação do meio com os diferentes ácidos graxos

Os ácidos graxos utilizados foram CLA (Sigma-Aldrich, EUA, Cat N°. O5507), AL (Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. L1376), AO (Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. O1383), EPA (Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. PHR1790) e DHA (SigmaAldrich, USA, Cat N°. D2532). Uma solução estoque de cada ácido graxo foi preparada na concentração de 1.000.000 µM/mL para o CLA, AL e EPA, 200.000 µM/mL para o DHA e 177.000 µM/mL para o AO. Todas as soluções foram preparadas em etanol 100%, conforme descrito por Cheng et al. (2003) e armazenado a -20 °C até o uso. Para o preparo da suplementação, o estoque de cada ácido graxo foi diluído em DMEM na ausência de SFB contendo os demais suplementos e foi utilizado 0,1125% de BSA como carreador.

O CLA, AL e AO foram utilizados na concentração final de 100 µM, dose estabelecida em estudos dose-resposta pilotos prévios realizados pelo grupo. O EPA e DHA foram associados utilizando-se a concentração final de 50 µM para cada um deles, também resultando em 100 µM. Em todos os grupos de tratamento e inclusive no controle, a concentração de etanol no meio de cultivo foi exatamente a mesma. Cada poço da placa continha as células confluentes, onde foram incubadas por 5 min, 24, 48 e 72 horas com 4 mL de DMEM isento de SFB e acrescido de albumina sérica bovina (BSA) e os tratamentos na concentração final de 100 µM. Para todos os tratamentos foram realizadas cinco repetições.

5.6 Coleta do meio de cultivo e das CT-1

Após a adição dos tratamentos contendo os diferentes ácidos graxos nos poços das placas de cultivo que continham as CT-1, o meio de cultivo foi coletado para mensuração das concentrações de PGE2 e PGF2 α por ELISA, conforme ilustrado na **figura 4**. Coletou-se 4 mL/poço do meio de cultivo, dividido em 4 microtubos (1mL/microtubo) livres de DNase e RNase em cada tempo de tratamento. Em seguida, o meio de cultivo coletado foi centrifugado a 12.000g 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.

Figura 4. Coleta do meio de cultivo para mensuração das concentrações de PGE2 e PGF2 α por ELISA.



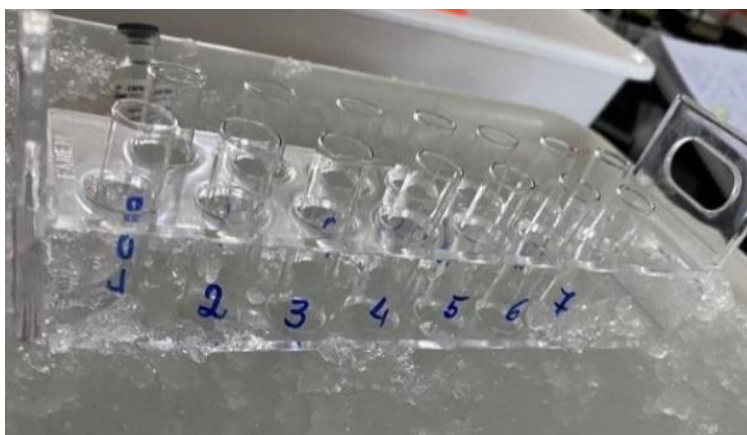
Fonte: arquivo pessoal.

5.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

O ELISA foi realizado utilizando os kits Prostaglandin F2 α ELISA kit, N° 516011 e Prostaglandin E2 ELISA kit – Monoclonal, N° 514010, ambos da Cayman Chemical. Resumidamente, os reagentes e buffers de cada kit foram pré-preparados,

segundo métodos descritos pelo fabricante. No ensaio o reagente ELISA Buffer foi substituído pela Matriz, a matriz utilizada nos ensaios foi o meio de cultivo das células CT-1 não suplementado com SFB, conforme ilustrado na **Figura 5**.

Figura 5. Diluição da curva padrão para validação da placa de amostras de PGF2 α .

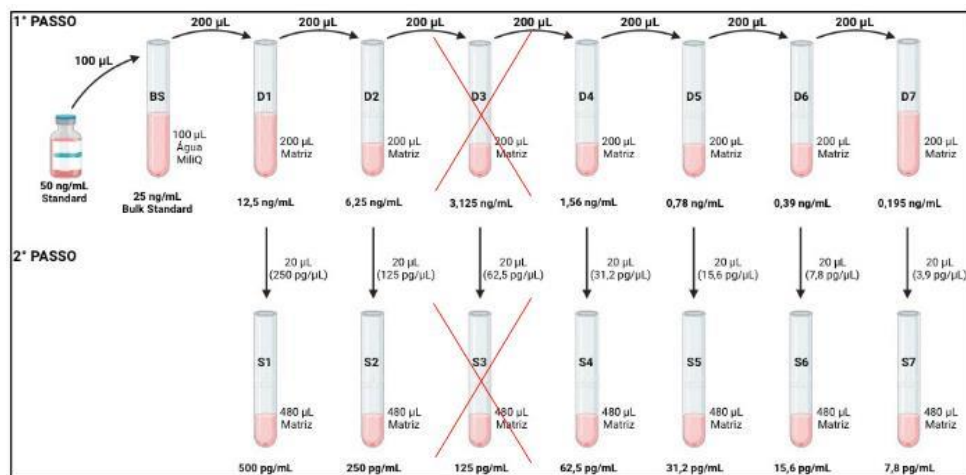


Fonte: Lucas de Oliveira Bezerra.

No preparo da curva padrão do ELISA, para cada prostaglandina, foi necessário alguns ajustes para diluição do efeito matriz no ensaio. A preparação da curva está elucidada nos modelos esquemáticos apresentados nas **Figuras 6 e 7**. Para a validação da concentração das amostras de meio de cultivo de CT-1, foi escolhido o tempo de 24 h de cultivo das CT-1, onde tínhamos 5 repetições x 5 tratamentos x 1 tempo, totalizando 25 amostras, destas, 20 μ L de cada amostra foi utilizado para formar um pool de 500 μ L das amostras, em seguida, foram realizadas as diluições 1:10, 1:100 e 1:1000.

Figura 6. Esquema do preparo da curva padrão da placa de amostras para PGF2 α com as adequações necessárias de acordo com o modelo esquemático.

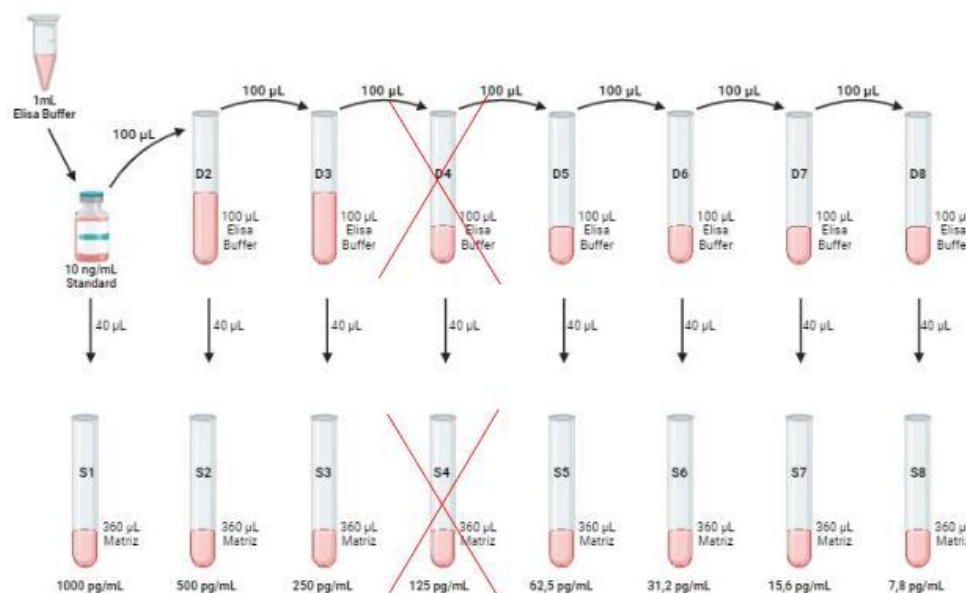
X significa que foi utilizado apenas para a diluição em série.



Fonte: Lucas de Oliveira Bezerra.

Figura 7. Esquema do preparo da curva padrão da placa de amostras para PGE2 com as adequações necessárias de acordo com o modelo esquemático.

X significa que foi utilizado apenas para a diluição em série.



Fonte: Lucas de Oliveira Bezerra.

Após o preparo dos padrões para a curva e pool de amostras nas diluições 1:10, 1:100 e 1:1000 foi realizada a montagem da placa de validação da curva de

ELISA e concentração de amostras de acordo com a **Tabela 1**. Após a pipetagem, a placa foi embalada em papel alumínio e incubada por 18 horas a 4°C e, posteriormente, cada poço da placa foi lavado com ELISA Wash e adicionado 200 uL de reagente de Ellman. Após a lavagem, foi feita uma nova incubação por 120 minutos em homogeneizador orbital e, por fim, se fez a leitura da placa, em ondas de 415 nm, em espectrofotômetro com capacidade de leitura de comprimento de onda entre 405-420 nm (Synergy HTX, sendo controlado pelo software Gen5 versão 3.03).

Tabela 1. Esquema de pipetagem da placa de validação da curva padrão e concentração de amostras para ELISA.

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

Branco (Blk): representa a absorbância 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.

Após as validações da curva padrão ($R^2 > 0,9$) e da concentração das amostras (1:300 e 1:1000) foi realizado o ensaio de ELISA para cada prostaglandina, de acordo com o descrito no manual do fabricante de cada kit (PGE2 e PGF2 α), citados acima. Na **Tabela 2**, está representado o modelo esquemático da montagem de uma das placas do ELISA para uma das prostaglandinas. Para cada placa do ELISA havia 40 amostras pipetadas em duplicata, conforme ilustrado na **Figura 8**. As placas passaram pelos processos de primeira incubação (18 horas a 4°C),

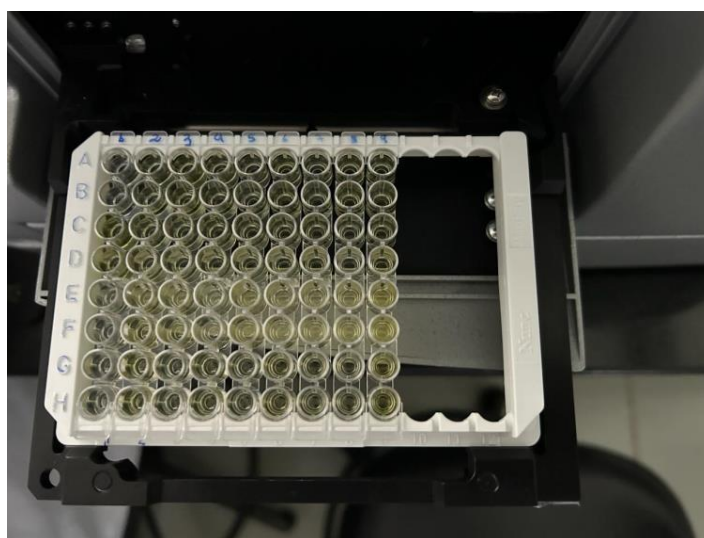
lavagem dos poços e adição do reagente de Ellman, segunda incubação (120 minutos) e leitura em espectrofotômetro.

Tabela 2. Modelo esquemático da montagem da placa de ELISA para uma das prostaglandinas, onde nas strips 1 e 2 continha a curva padrão validada na primeira placa e nas strips de 3 a 12, 40 amostras de meio de cultivo de células CT-1, na diluição 1:300 e 1:1000 tratado ou não com os ácidos graxos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NSB	S3	Amostra 1	Amostra 5	Amostra 9	Amostra 13	Amostra 17	Amostra 21	Amostra 25	Amostra 29	Amostra 33	Amostra 37
B	NSB	S3	Amostra 1	Amostra 5	Amostra 9	Amostra 13	Amostra 17	Amostra 21	Amostra 25	Amostra 29	Amostra 33	Amostra 37
C	B ₀	S4	Amostra 2	Amostra 6	Amostra 10	Amostra 14	Amostra 18	Amostra 22	Amostra 26	Amostra 30	Amostra 34	Amostra 38
D	B ₀	S4	Amostra 2	Amostra 6	Amostra 10	Amostra 14	Amostra 18	Amostra 22	Amostra 26	Amostra 30	Amostra 34	Amostra 38
E	S1	S5	Amostra 3	Amostra 7	Amostra 11	Amostra 15	Amostra 19	Amostra 23	Amostra 27	Amostra 31	Amostra 35	Amostra 39
F	S1	S5	Amostra 3	Amostra 7	Amostra 11	Amostra 15	Amostra 19	Amostra 23	Amostra 27	Amostra 31	Amostra 35	Amostra 39
G	S2	S6	Amostra 4	Amostra 8	Amostra 12	Amostra 16	Amostra 20	Amostra 24	Amostra 28	Amostra 32	Amostra 36	Amostra 40
H	S2	S6	Amostra 4	Amostra 8	Amostra 12	Amostra 16	Amostra 20	Amostra 24	Amostra 28	Amostra 32	Amostra 36	Amostra 40

Fonte: Lucas de Oliveira Bezerra.

Figura 8. Placa de ELISA após as duas séries de incubações pronta para ser lida no espectrofotômetro.



Fonte: Lucas de Oliveira Bezerra.

5.8 Análise Estatística

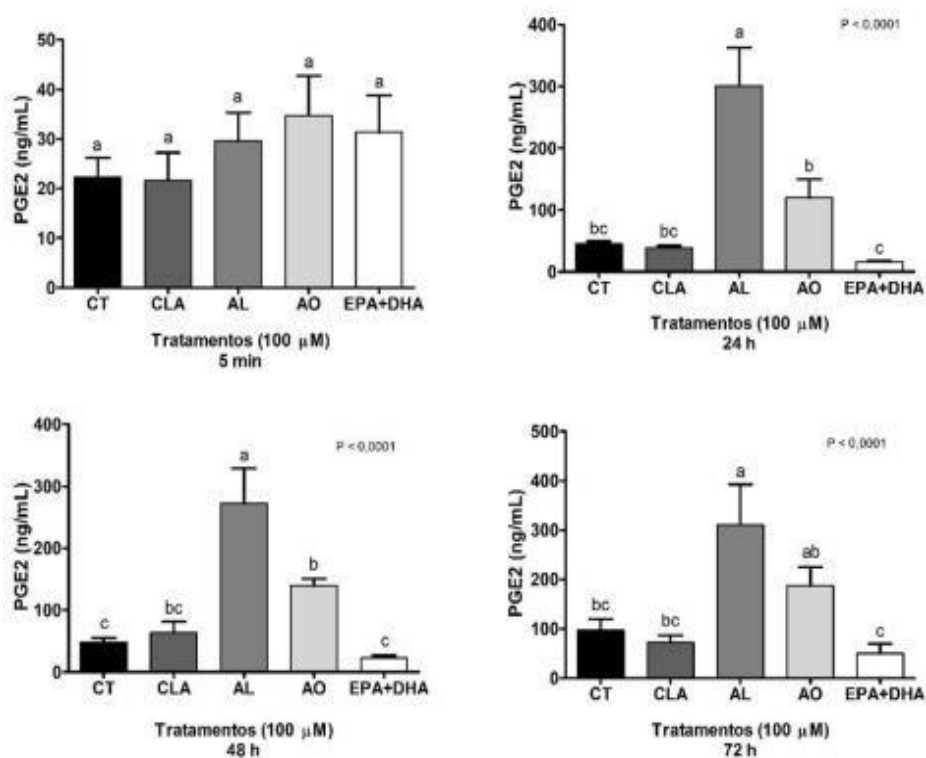
As análises estatísticas foram realizadas usando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) considerando o poço como unidade experimental. A suposição de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificadas para cada modelo por meio do teste de Shapiro-Wilk.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

6. RESULTADOS

6.1 Concentrações de PGE2

Conforme ilustrado nos gráficos da **Figura 9**, no tempo 0 horas (5 min) não houve diferença na síntese de PGE2 entre o grupo controle ($22,32 \pm 3,83$ ng/mL) e os outros grupos que receberam os tratamentos com 100 μ M de CLA, AL, AO e EPA+DHA ($21,66 \pm 5,58$; $29,55 \pm 5,79$; $34,74 \pm 7,98$ e $31,32 \pm 7,44$ ng/mL, respectivamente). No tempo 24 horas ($301,19 \pm 61,83$ ng/mL) e 48 horas ($272,42 \pm 56,82$ ng/mL), o AL aumentou a síntese de PGE2 comparado com os demais grupos de tratamento. No tempo 72 horas o AL não diferiu do AO ($310,58 \pm 81,54$ vs. $187,16 \pm 37,65$ ng/mL; respectivamente), mas promoveu maiores concentrações de PGE2 comparado ao outro grupo ($310,58 \pm 81,54$ vs. $97,40 \pm 22,40$ respectivamente; $P < 0,0001$).

Figura 9. Efeito da suplementação com 100 M de diferentes ácidos graxos (CLA, AL, AO e EPA+DHA) e um grupo controle (CT) em meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na síntese de PGE2 por 5 min, 24, 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

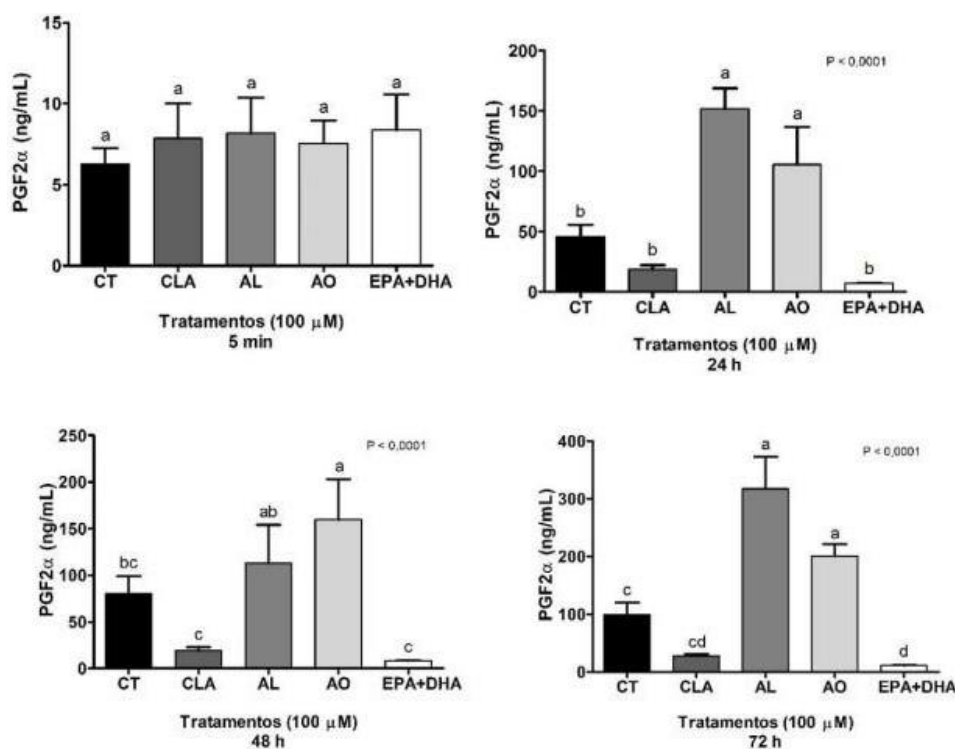


6.2 Concentrações de PGF2α

Conforme ilustrado nos gráficos da **Figura 10**, no tempo de 0 horas (5 min) não houve diferença na síntese de PGF2α entre o grupo controle ($6,27 \pm 0,97$ ng/mL) e os outros grupos que receberam os tratamentos com 100 μM de CLA, AL, AO e EPA+DHA ($7,86 \pm 2,14$; $8,17 \pm 2,19$; $7,54 \pm 1,42$ e $8,37 \pm 2,19$ ng/mL respectivamente). No tempo de 24 horas, a síntese de PGF2α foi maior nos grupos AL e AO ($151,67 \pm 17,01$ e $105,71 \pm 30,86$ ng/mL respectivamente) comparados aos grupos controle, CLA e EPA+DHA ($45,89 \pm 9,86$; $18,89 \pm 3,29$ e $7,28 \pm 0,54$ ng/mL respectivamente). No tempo de 48 horas, houve maior síntese de PGF2α no grupo AO comparado ao controle ($159,41 \pm 43,67$ vs. $80,10 \pm 19,10$ ng/mL respectivamente;

$P < 0,001$). No tempo de 72 horas, houve maior síntese de $\text{PGF2}\alpha$ nos grupos AL e AO ($317,67 \pm 55,52$ e $200,81 \pm 20,39$ ng/mL respectivamente; $P < 0,0001$) comparado aos grupos controle, CLA e EPA+DHA ($98,77 \pm 21,81$; $27,79 \pm 3,74$ e $11,07 \pm 0,71$ ng/mL respectivamente). O grupo EPA+DHA apresentou menor síntese de $\text{PGF2}\alpha$ quando comparado ao grupo controle ($11,07 \pm 0,71$ vs. $98,77 \pm 21,81$ ng/mL respectivamente; $P < 0,0001$).

Figura 10. Efeito da suplementação com 100 M de diferentes ácidos graxos (CLA, AL, AO e EPA+DHA) e um grupo controle (CT) em meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ por 5 min, 24, 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

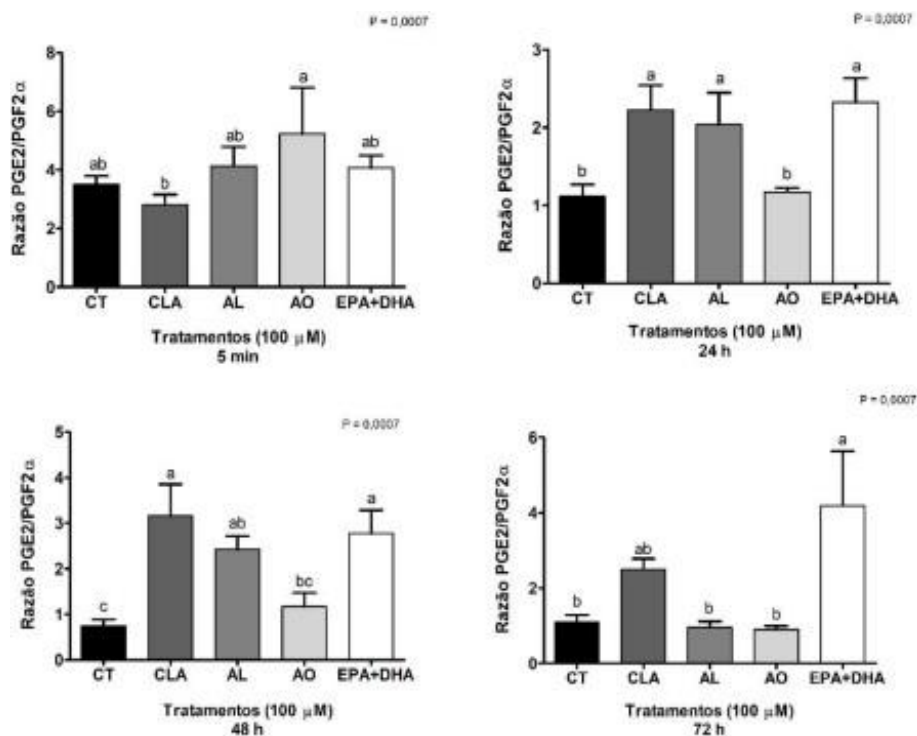


6.3 Razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$

Conforme ilustrado nos gráficos da **Figura 11**, no tempo 0 horas (5 min) a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$ no grupo controle ($3,49 \pm 0,29$ ng/mL) não diferiu dos grupos que

receberam os tratamentos com CLA, AL, AO e EPA+DHA ($2,81 \pm 0,34$; $4,13 \pm 0,65$; $5,22 \pm 1,57$ e $4,06 \pm 0,42$ ng/mL respectivamente; $P = 0,0007$) e no grupo AO a razão foi maior quando comparado ao CLA ($5,22 \pm 1,57$ vs. $2,81 \pm 0,34$ ng/mL respectivamente). No tempo de 24 horas, os grupos CLA, AL e EPA+DHA apresentaram maior razão ($2,23 \pm 0,31$; $2,04 \pm 0,40$ e $2,32 \pm 0,31$ ng/mL; respectivamente) comparados ao controle e AO ($1,11 \pm 0,15$ e $1,17 \pm 0,05$ ng/mL; respectivamente). No tempo de 48 horas, o grupo AO não diferiu do AL ($1,17 \pm 0,30$ e $2,42 \pm 0,29$ ng/mL; respectivamente). No tempo 72 horas, a razão foi maior no grupo EPA+DHA comparado ao controle ($4,19 \pm 1,44$ vs. $1,09 \pm 0,18$ ng/mL; respectivamente).

Figura 11. Efeito da suplementação com 100 M de diferentes ácidos graxos (CLA, AL, AO e EPA+DHA) e um grupo controle (CT) em meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na razão PGE2/PGF2 α por 5 min, 24, 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).



7. DISCUSSÃO

Observamos a partir dos dados deste estudo que as CT-1 sintetizam PGF2 α e PGE2, sendo modificada de maneira diferente conforme o tipo de ácido graxo adicionado ao meio de cultivo e o tempo de exposição aos mesmos. Segundo Hwang et al. (1998), a produção de PGE2 predomina antes do dia 12 do desenvolvimento embrionário, PGE2 e PGF2 α entre os dias 13 e 15 e adicionalmente PGI2 após o dia 15 de desenvolvimento. Uma maior concentração de PGE2 em relação a de PGF2 α , que foi observada quando as CT1 foram tratadas com AL nos tempos de 24, 48 e 72 horas e AO no tempo de 48 horas, já era esperada, uma vez que as CT-1 utilizadas no estudo foram isoladas de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com 10 a 11 dias de desenvolvimento.

No início do desenvolvimento dos embriões bovinos, apresentam quantidades distintas de PGE2 sintases a partir de suas células, sendo capazes de sintetizar PGE2 (BORUSZEWSKA et al., 2019). A partir dos dados desta pesquisa, sustentamos que as células trofoblásticas possuem, pelo menos em parte, responsabilidade pela produção de PGE2 pelo embrião, uma vez que tais células fazem parte da composição celular dos embriões. Maiores concentrações de PGE2 são requeridas para a manutenção do corpo lúteo e prenhez, pelos seus conhecidos efeitos luteotróficos. O AL utilizado no presente estudo nos tempos de 24, 48 e 72 horas foi capaz de aumentar a síntese de PGE2. A PGE2 atua no desenvolvimento do embrião, aumentando a proliferação das suas células embrionárias e trofoblásticas permitindo a sobrevivência da implantação após a transferência de embriões (NIRINGIYUMUKIZA et al., 2018).

De acordo com Moussavi et al. (2013), foi verificada diminuição nas concentrações de PGF2 α e PGE2 em células epiteliais endometriais bovinas suplementadas com concentrações acima de 50 μ M por 24 horas de cultivo. No presente estudo, essa concentração não foi reduzida pelos 100 μ M CLA utilizados em todos os tempos testados, mas ocorreu um aumento na razão PGE2/PGF2 α causado pelo CLA em 24 e 48 horas, o que acreditamos que seja um fator positivo no estabelecimento da prenhez. E, segundo Bazer, Ott e Spencer, 1998, a maior razão PGE2 /PGF2 α é mais importante do que as concentrações absolutas no contexto reprodutivo de bovinos.

Segundo Cheng et al. (2003), a concentração de $\text{PGF2}\alpha$ foi reduzida de forma dose dependente pela suplementação de CLA em células endometriais ovinas e a síntese de PGE2 foi aumentada por baixas concentrações de CLA ($20\text{ }\mu\text{M}$), proporcionando maior razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$. Os dados do presente estudo não indicam um aumento na síntese de PGE2 e $\text{PGF2}\alpha$ devido a suplementação com CLA, porém, houve maior diminuição de $\text{PGF2}\alpha$, aumentando a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$, corroborando com os dados do referido autor. Existem evidências que apontam que o incremento de PGE2 é tão importante quanto a supressão de $\text{PGF2}\alpha$ (AROSH et al. 2016). A PGE2 atua de forma parácrina (curta distância) 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, além de exercer ação luteotrófica protegendo o CL da luteólise espontânea ou induzida em fêmeas ruminantes (MAGNESS et al., 1981).

No estudo recente realizado pelo nosso grupo (MALDONADO et al., 2023) com a suplementação com ácido linoleico conjugado em meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1), observou-se que a razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$ foi maior em todos os grupos tratados com CLA com 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle. No presente estudo também houve uma maior razão $\text{PGE2/PGF2}\alpha$ no grupo tratado com CLA no tempo de 48 horas.

Os presentes dados, em conjunto, indicam que as linhagens celulares de diferentes origens, o ácido graxo utilizado e tempo de exposição aos tratamentos influenciam sobre a síntese de prostaglandinas, podendo favorecer o reconhecimento materno-fetal, e assim contribuindo para o sucesso da reprodução bovina e aumentando a produtividade.

8. CONCLUSÃO

A produção das prostaglandinas E2 e F2 α é influenciada pelo tipo de ácido graxo, bem como o tempo de exposição aos tratamentos. A suplementação com AL no meio de cultivo das CT-1 aumentou a síntese de PGE2 em 24, 48 e 72 horas de cultivo, aumentou síntese de PGF2 α com 24 e 72 horas, e aumentou a razão PGE2/PGF2 α com 24 e 48 horas, podendo ser um aliado no reconhecimento materno-fetal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Vantagens da inseminação artificial**, 2019. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/artigos/inseminacao-artificial/>. Acesso em: 17/05/2024.

AZEVEDO, G. **Produção de carne bovina no Brasil deve crescer em 2024, diz USDA.** Canal Rural. Publicado em 04/03/2024 18:07. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/pecuaria/boi/producao-de-carne-bovina-no-brasil-deve-crescer-em-2024-diz-usda/>. Acesso em: 18/05/2024.

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.

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.

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

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA. ESALQ - USP. **PECUÁRIA/CEPEA: PRODUÇÃO BRASILEIRA DE CARNE BOVINA BATE RECORDE EM 2023.** Publicado em 23/02/2024. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/pecuaria-cepea-producao-brasileira-de-carne-bovina-bate-recorde-em-2023.aspx>. Acesso em: 18/05/2024.

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

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

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA; LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Produção in vivo.** Embrapa. Publicado em: 22/12/2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/reproducao-animal/tecnologias/producao-in-vivo#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20in%20vivo%20de,matura%C3%A7%C3%A3o%20de%20v%C3%A1rios%20fol%C3%ADculos%20simultaneamente>. Acesso em: 18/05/2024.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. **Meat market review: emerging trends and outlook.** Rome: FAO, 2022.

FEDEROFF N; BATTISTI DS, BEACHY RN; COOPER PJ; FISCHHOFF DA; HODGES CN; KNAUF VC; LOBELL D; MAZUR BJ; MOLDEN D; REYNOLDS MP; RONALD PC; ROSEGRANT MW; SANCHEZ PA; VONSHAK A; ZHU JK. **Radically rethinking agriculture for the 21st century.** Science. 2010 Feb 12;327(5967):833-4. doi: 10.1126/science.1186834. PMID: 20150494; PMCID: PMC3137512.

FUNARI, S.S.; BARCELO, F.; ESCRIBA, P. V. **Effects of oleic acid and its congeners, elaidic and stearic acids, on the structural properties of phosphatidylethanolamine membranes.** J. Lipid Res., [S.l.], v. 44, p. 567–75, 2003.

GEISERT RD; SHORT EC; MORGAN GL. **Establishment of pregnancy in domestic species.** In: Geisert RD, Zavy MT (eds.), Embryonic mortality in domestic species. Florida: CRC Press; 1994: 23-53.

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

HESS, B. W.; LAKE, S. L.; SCHOLLJEGERDES, E. J.; WESTON, T. R.; NAYIGIHUGU, V.; MOLLE, J. D. C.; MOSS, G. E. **Nutritional controls of beef cow reproduction.** J. Anim. Sci., [S.l.], v. 83, E90–E106, 2005.

HESS, B. W.; MOSS, G. E.; RULE, D. C. **A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep.** J. Anim. Sci., [s.l.], v. 86, n. 14, Suppl., E188–E204, 2008.

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

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

MALDONADO, M. B. C.; LOURENÇO, V. C.; BEZERRA L. O.; FELTRIN, I. R.; MENDES, A. F.; ROCHA, C. C.; PUGLIESE, G.; EALY, A. D.; MEMBRIVE, C. M. B.; NOGUEIRA, M. F. G. **Conjugated linoleic acid supplementation changes prostaglandin concentration ratio and alters the expression of genes involved in maternal-fetal recognition from bovine trophoblast cells *in vitro*.** Theriogenology., [S.l.], v. 206, p. 87-95, 2023.

MANN GE; LAMMING GE; ROBINSON RS; WATHES DC. **The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy.** J Reprod Fertil 1999: 317-328.

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*. American Journal Veterinary Research, v. 74, p. 491-498, 2013.

NICACIO, A; **Artigo: A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) serve ou não para a minha propriedade?** Embrapa. Publicado em: 05/08/15. Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4227153/artigo-a-inseminacao-artificial-em-tempo-fixo-iatf-serve-ou-nao-para-a-minha-propriedade#:~:text=A%20insemina%C3%A7%C3%A3o%20artificial%20\(IA\)%20%2D,organiza%C3%A7%C3%A3o%20dos%20manejos%3B%20possibilita%20melhor](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4227153/artigo-a-inseminacao-artificial-em-tempo-fixo-iatf-serve-ou-nao-para-a-minha-propriedade#:~:text=A%20insemina%C3%A7%C3%A3o%20artificial%20(IA)%20%2D,organiza%C3%A7%C3%A3o%20dos%20manejos%3B%20possibilita%20melhor). Acesso em: 17/05/2024.

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

PARK, E. J.; LEE, A. Y.; CHANG, S. H.; YU, K. N.; KIM, J. H.; CHO, M. H. **Role of p53 in the cellular response following oleic acid accumulation in Chang liver cells**. Toxicology Letters, [S.l.], v. 224, n. 1, p. 114-120, 2014.

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

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.

PODESTÀ, I; **Rebanho bovino brasileiro alcançou recorde de 234,4 milhões de animais em 2022**. gov.br. Publicado em 25/09/2023 12h26. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/rebanho-bovino-brasileiro-alcançou-recorde-de-234-4-milhoes-de-animais-em-2022>. Acesso em: 18/05/2024.

RICI R.E.; FACCIOTTI P.R.; AMBRÓSIO C.E.; MARIA D.A; KFOURY J.R. Jr; BERTOLINI M.; MIGLINO M.A. 2009. **Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placentae**. Anim. Reprod. Sci. 115(1-4):29-38.

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

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

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

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

SAITO, O.; GUAN, Y.; QI, Z.; DAVIS, L. S.; KÖMHOFF, M.; SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; BREYER, R. M.; BREYER, M. D. **Expression of the prostaglandin F receptor (FP) gene along the mouse genitourinary tract**. Am. J. Physiol. Renal Physiol., [S.l.], v. 284, F1164–1170, 2003.

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

SARTORI, R. **Fertilização e morte embrionária em bovinos**. Acta Scientiae Veterinariae 32 (supl.): 35-50, p.19, 2004.

SCHLAFER D.H., Fischer P.J. & Davies C.J. 2000. **The bovine placenta before and after birth: Placental development and function in health and disease**. Anim. Reprod. Sci. 60/61:145-160.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES – SBTE. **A pandemia e o mercado de embriões**. Jornal O embrião, [S.l.], v. 36, n. 67, 2021. Disponível em: https://www.sbte.org.br/arquivos/jornal/Ed_67_Oembriao_Site-4.pdf. Acesso em: 18/05/2024.

SUMMERS, R. N., PETERSON, C. A., LOCK, T. F., POLLACK, C., IRELAND, F. A., FAULKNER, D. B., & KESLER, D. J. **The effect of exogenous progesterone administered intravaginally, via CIDR, on embryo survival in beef cattle**. Illini BeefNet, University of Illinois. 2004.

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.

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

THATCHER WW; BINELLI M; ARNOLD D; MATTOS R; BADINGA L; MOREIRA F; STAPLES CR; GUZELOGLU A. **Endocrine and physiological events from ovulation to establishment of pregnancy in cattle**. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occ Publ. Br Soc. Anim. Sci.; 2001: 81-91.

VIANA, J. H. 2020. **Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals**. Embryo Technology Newsletter, v. 39, n. 4, 2021.

VIANA, J.H.M. – IETS Data Retrieval Committee; 2022. **Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals**. Embryo Technology Newsletter, v. 41, n.4, 2023.

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, J.R., 2007. **Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction**. Biol. Reprod. 77, 190–201.

WILLIAMS, G. L.; STANKO, R. L. **Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle**. J. Anim. Sci., [S.l.], v. 77, p. 1–12, 2000. DOI 10.2527/jas2000.77E-Suppl1n.

XAVIER, F.; LAGARRIQUE, S.; GUILOMOT, M.; GAILLARD-SANCHEZ, I. **Expression of c-fos and jun proto-oncogenes in ovine trophoblasts in relation to interferon-tau expression and early implantation process**. Molecular, Reproduction and Development, [S.l.], v.46, p. 127-137, 1997.