

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

Lucas de Oliveira Bezerra

Zootecnista

**EFEITOS DE DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS NA EXPRESSÃO DE
TRANSCRITOS ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE PGF2 α E PGE2 E NO
RECONHECIMENTO MATERNO FETAL EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS
E EMBRIÕES BOVINOS**

Botucatu - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

Lucas de Oliveira Bezerra

Zootecnista

**EFEITOS DE DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS NA EXPRESSÃO DE
TRANSCRITOS ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE PGF₂ α E PGE₂ E NO
RECONHECIMENTO MATERNO FETAL EM CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS
E EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências - UNESP, Câmpus de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Biotecnologia.

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

Botucatu - SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Bezerra, Lucas de Oliveira.

Efeitos de diferentes ácidos graxos na expressão de transcritos envolvidos na síntese de PGF2? e PGE2 e no reconhecimento materno fetal em células trofoblásticas e embriões bovinos / Lucas de Oliveira Bezerra. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Claudia Maria Bertan Membrive

Coorientador: Mariangêla Bueno Cordeiro Maldonado

Capes: 50504002

1. Ácidos graxos. 2. Doença trofoblástica gestacional.
3. Embriões. 4. Prenhez. 5. Prostaglandinas.

Palavras-chave: Ácidos graxos; Célula trofoblástica;
Embrião; Prenhez; Prostaglandinas.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos de diferentes ácidos graxos na expressão de transcritos envolvidos na síntese de PGF2 e PGE2 e no reconhecimento materno fetal em células trofoblásticas e embriões bovinos

AUTOR: LUCAS DE OLIVEIRA BEZERRA

ORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

COORIENTADORA: MARIÂNGELA BUENO CORDEIRO MALDONADO

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

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

Profª. Drª. ALESSANDRA BRIDI (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC, Campus Xanxerê

Prof. Associado JOAO CARLOS PINHEIRO FERREIRA (Participação Virtual)
Depto. de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ - UNESP

Botucatu, 07 de junho de 2024

Documento assinado digitalmente
 FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Data: 10/06/2024 08:29:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu -
Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, 250, 18618689, Botucatu - São Paulo
<http://www.ibb.unesp.br/pos-graduacao/ciencias-biologicas-farmacologia/CNPJ:48031918002259>

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lucas de Oliveira Bezerra, nascido em 25 de setembro de 1998, na cidade de Tupi Paulista, no estado de São Paulo. De 2014 a 2016, realizou o curso técnico em agropecuária, pelo Centro Paula Souza (ETEC), na cidade de Dracena, estado de São Paulo. Em março de 2017, ingressou no curso de graduação em Zootecnia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), na cidade de Dracena, estado de São Paulo. Em agosto de 2019, iniciou as atividades científicas no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), situado na FCAT, onde desenvolveu duas iniciações científicas sob orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive. Durante a iniciação científica realizou treinamento no cultivo de células trofoblásticas bovinas e na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos. De 2018 a 2021, foi bolsista do Programa de Educação Tutorial - PET Zootecnia. Em março de 2022, ingressou como primeiro colocado no curso de Mestrado acadêmico em Farmacologia e Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), na cidade de Botucatu, estado de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive. Desde 2019, têm participado de um conjunto de experimentos do referido grupo utilizando como modelo biológico de estudo células trofoblásticas e embriões bovinos produzidos *in vitro*. Durante o mestrado, compreendido entre fevereiro de 2023 e maio de 2024, publicou dois artigos científicos; cinco capítulos de livro e quinze resumos em anais de congressos nacionais e internacionais. Em 2023, foi premiado com o melhor trabalho científico durante o 4th International Meeting of Agrarian Science and Technology - IMAST 2023, com o trabalho intitulado “Conjugated linoleic acid added to the culture medium of bovine oocytes and embryos produced *in vitro* alters the secretion of prostaglandin F2 α and E2”.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Roseli de Oliveira Bezerra** e **Roberto César da Silva Bezerra**, pelos ensinamentos e pela educação que me possibilitaram mais essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois nas horas mais difíceis foi ele quem me deu forças para continuar.

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

Ao **Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia**, do Instituto de Biociências - IBB, UNESP Câmpus de Botucatu, pela oportunidade oferecida.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio ao Programa e pela concessão da bolsa de estudos durante os primeiros doze meses de mestrado.

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. Pela concessão da bolsa de Mestrado durante 10 meses, Processo FAPESP nº 2022/06959-7.

Em especial agradeço a **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**, minha orientadora, que me recebeu de braços abertos. Agradeço por ter me guiado durante todo o experimento e ter enfrentado comigo todas as dificuldades encontradas. Agradeço pela constante fonte de motivação e incentivo.

À **Dra. Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado**, minha coorientadora; pelo incentivo, apoio e ensinamentos. Agradeço por ter acreditado em meu potencial e ter compartilhado suas experiências comigo. Obrigado principalmente por sempre ter me feito acreditar e ter esperanças de um futuro melhor.

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

Ao **Prof. Dr. GuilhermeMP 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 de RT-qPCR dos embriões e 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 **Camila Araújo Miranda, Adriano Felipe Mendes, Laura Chuba Machado Rolniche e Maria Eduarda Rocha Pinto** agradeço pelo apoio e amizade durante o desenvolvimento de todo experimento.

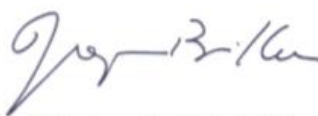
À **Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/UNESP)**, Câmpus de Dracena, pelo apoio técnico-administrativo e logístico ao desenvolvimento do referido estudo.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

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

Dracena, 10 de agosto de 2022.



Prof.ª Dra Jaqueline Dalbello Biller

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmt. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas – CEP: 17900-000 – Dracena/SP - Brasil
Tel. (18) 3821-8200 – www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br

*“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar com mais inteligência”.*

Henry Ford

RESUMO

A mortalidade embrionária precoce (MEP) ocasionada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP), entre os dias 15 e 17 após a fecundação, constitui uma das maiores causas de falhas reprodutivas em fêmeas bovinas. Estratégias para favorecer o RMP durante tal período crítico, baseiam-se na redução da síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α) pelo endométrio materno e/ou na maximização do estímulo anti-luteolítico induzido pelo conceito, incluindo o aumento da síntese de prostaglandina E2 (PGE2) e interferon-tau (IFNT). A PGE2 sintetizada pelo endométrio materno, embrião e células trofoblásticas desempenha efeitos luteotróficos e anti-luteolíticos; favorecendo o RMP. A adição de diferentes ácidos graxos em cultivos celulares modifica a biossíntese de eicosanóides, inclusive da PGE2 e PGF2 α . A hipótese é que a suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA), ácido linoleico (AL), ácido oleico (AO) e ácido eicosapentaenóico (EPA) associado ao ácido docosahexaenóico (DHA) aumenta a síntese de PGE2, diminui a síntese de PGF2 α e aumenta a razão PGE2/PGF2 α em células trofoblásticas bovinas (CT-1); modifica a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de PGE2 e PGF2 α em CT-1 e embriões bovinos produzidos *in vitro*; altera a expressão de transcritos que favorecem o RMP em CT-1 e embriões, além de favorecer o nível de metilação do DNA nos embriões. Assim, objetivou-se com o Experimento 1: a) avaliar os efeitos da suplementação com 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO ou 50 μ M EPA + 50 μ M DHA na síntese de PGE2, PGF2 α e na razão PGE2/PGF2 α em CT-1; b) avaliar a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas (PTGER4, PTGS2, PTGES2, PTGES, AKR1B1) e no RMP (IFNT) em CT-1. Assim, objetivou-se com o Experimento 2: a) avaliar os efeitos da suplementação com 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO ou 50 μ M EPA + 50 μ M DHA na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas (PTGS2, PTGES e AKR1B1), no RMP (IFNT) e no nível de metilação do DNA (DNMT3A) em embriões bovinos produzidos *in vitro* e b) avaliar a taxa de produção embrionária com 7 e 9 dias de cultivo. No Experimento 1, CT-1 em placas de 6 poços contendo meio acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB), onde foram cultivadas a 38,5°C com 5% CO2 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 CLA, 100 μ M de AL, 100 μ M de AO ou 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA durante 5 minutos e 24, 48 e 72 horas. Ao término do cultivo o meio foi coletado e as CT-1 foram lisadas com 1mL/poço de Trizol para posterior extração do RNA. As concentrações de PGE2 e PGF2 α mensuradas por ELISA e os transcritos foram avaliados pela técnica de RT-PCR. Foram realizadas 5 repetições experimentais. A análise estatística foi realizada pelo PROC MIXED do SAS, considerando o poço a unidade experimental. No Experimento 2, folículos ovarianos de 2 a 10 mm provenientes de fêmeas Nelore abatidas, foram aspirados utilizando seringa de 10 mL e agulha 18G. Oócitos com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células do *cumulus* foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em gotas de 100 μ L contendo meio MIV com 5% de soro fetal bovino (SFB) sob óleo mineral, em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO2 por 24 horas. Após a MIV, os oócitos foram submetidos a fertilização *in vitro* (FIV), com sêmen de uma única partida de mesmo touro Nelore, durante 18 horas nas mesmas condições da MIV (D0 = dia da FIV). Após a FIV, os prováveis zigotos (n = 1117) foram alocados em placas de 4 poços com 700 μ L de meio de cultivo/poço com 1,25% de SFB, acrescidos dos seguintes tratamentos: 100 μ M de ácido linoleico conjugado (Grupo CLA; n = 223 oócitos); 100 μ M de ácido linoleico (Grupo AL; n = 227); 100 μ M de ácido oleico (Grupo AO; n = 225) ou 50 μ M de ácido eicosapentaenóico - EPA + 50 μ M ácido docosahexaenóico – DHA (Grupo EPA + DHA; n = 219); além de meio não acrescido de AG (Grupo Controle; n = 223). A produção embrionária foi avaliada no D7 e D9. Os embriões foram coletados no D9 e os transcritos foram avaliados pela técnica de RT-PCR. Foram realizadas 10 repetições experimentais. A análise estatística foi realizada utilizando o software PROC MIXED do SAS. No experimento 1, não houve diferença para a síntese de PGE2 e PGF2 α no tempo de 5 min entre os diferentes grupos. Os grupos tratados com AL quando comparado ao controle apresentou maior (P < 0,001) síntese de PGE2 com 24 horas (301,19 $\pm$ 61,83 vs. 45,59 $\pm$ 4,00 ng/mL; respectivamente), 48 horas (272,42 $\pm$ 56,82 vs. 48,15 $\pm$ 6,59 ng/mL; respectivamente) e 72 horas (310,58 $\pm$ 81,54 vs 97,40 $\pm$ 22,40 ng/mL; respectivamente). A síntese de PGF2 α foi maior (P < 0,001) nos grupo AL e AO quando comparados ao controle nos tempos de 24 horas (151,67 $\pm$ 17,01 e 105,71 $\pm$ 30,86 vs. 45,89 $\pm$ 9,86 ng/mL; respectivamente), 48 horas (112,94 $\pm$ 40,95 e 159,41 $\pm$ 43,67 vs 80,10 $\pm$ 19,10 ng/mL; respectivamente) e 72 horas (317,67 $\pm$ 55,52 e 200,81 $\pm$ 20,39 vs 98,77 $\pm$ 21,81 ng/mL; respectivamente). A síntese de PGF2 α foi menor (P < 0,001) no grupo

EPA + DHA quando comparado ao controle com 48 horas ($7,28 \pm 0,54$ vs $45,89 \pm 9,86$ ng/mL; respectivamente) e 72 horas ($11,07 \pm 0,71$ vs $98,77 \pm 21,81$ ng/mL; respectivamente). A razão PGE2/PGF2 α foram maiores ($P = 0,007$) nos grupos CLA, AL, EPA + DHA comparados ao grupo controle para 24 ($2,23 \pm 0,31$; $2,04 \pm 0,40$ e $2,32 \pm 0,31$ vs $1,11 \pm 0,15$; respectivamente), 48 ($3,16 \pm 0,68$; $2,42 \pm 0,29$ e $2,77 \pm 0,50$ vs $0,74 \pm 0,15$; respectivamente) e se manteve por 72 horas apenas no grupo EPA + DHA comparado ao controle ($4,19 \pm 1,44$ vs $1,09 \pm 0,18$; respectivamente). Não foi observada diferença entre os grupos para os transcritos PTGES ($P = 0,7799$), PTGES2 ($P = 0,8107$) e PTGS2 ($P = 0,4183$). Foi observada uma tendência na abundância de PTGR4 ser maior ($P = 0,1565$) no grupo AL quando comparado ao EPA + DHA ($0,0020 \pm 0,0002$ vs $0,0008 \pm 0,0002$; respectivamente). Também foi observada uma tendência na abundância de AKR1B1 ser maior ($P = 0,1618$) no grupo AO quando comparado ao CLA ($0,2625 \pm 0,0265$ vs $0,1512 \pm 0,0314$; respectivamente). Com 72 horas de cultivo observou-se uma maior ($P = 0,0044$) expressão relativa de PTGS2 no grupo AL comparado ao controle ($7,4253 \pm 0,5671$ vs $4,4689 \pm 0,4454$). Observou-se maior expressão relativa para o IFNT no grupo AL quando comparado ao controle nos tempos de 24 horas ($0,1374 \pm 0,0090$ vs $0,0990 \pm 0,0125$ respectivamente; $P = 0,0216$) e 72 horas ($0,2336 \pm 0,0126$ vs $0,1293 \pm 0,0103$, respectivamente, $P = 0,0031$). No tempo de 48 horas, a expressão de IFNT foi maior nos grupos AL, AO, EPA + DHA quando comparados ao controle ($0,1699 \pm 0,0294$; $0,2989 \pm 0,1391$ e $0,2332 \pm 0,0438$ vs $0,0899 \pm 0,0179$, respectivamente, $P = 0,0103$). No Experimento 2, a produção embrionária foi reduzida no grupo EPA + DHA no D7 e D9 ($3,98 \pm 1,43$ vs $14,94 \pm 3,13$ vs $2,34 \pm 1,29$ vs $12,86 \pm 3,10$). Não foi observada diferença entre os grupos para a expressão relativa do PTGES ($P = 0,5496$) e AKR1B1 ($P = 0,1794$). A expressão relativa de PTGS2 foi maior ($P = 0,0286$) no grupo AO comparado ao grupo controle e AL ($1,1090 \pm 0,0833$ vs $0,7109 \pm 0,0748$ e $0,7068 \pm 0,0577$; respectivamente) e o grupo CLA não diferiu dos demais grupos. A expressão de IFNT tendeu ($P = 0,1148$) a ser maior nos grupos CLA e AO comparado ao controle ($0,1544 \pm 0,0293$ e $0,1750 \pm 0,0465$ vs $0,0344 \pm 0,0073$ respectivamente). A expressão de DNMT3A tendeu a ser maior ($P = 0,0797$) nos grupos CLA e AO comparado ao controle ($0,0009 \pm 0,0001$ e $0,0012 \pm 0,0005$ vs $0,0001 \pm 0,00008$ respectivamente). No Experimento 1, conclui-se que a suplementação com AL no meio de cultivo das CT-1 aumenta síntese de PGE2 com 24, 48 e 72 horas de cultivo; aumenta síntese de PGF2 α com 24 e 72 horas de cultivo e aumenta razão PGE2/PGF2 α com 24 e 48 horas e aumenta a abundância relativa dos transcritos PTGS2 com 72 horas de cultivo e de IFNT com 24, 48 e 72 horas de cultivo, podendo ser um grande aliado no RMP. No Experimento 2, conclui-se que a suplementação no meio de cultivo de embriões com AO aumentou a abundância de transcrito para PTGS2 e o CLA e AO tenderam a aumentar os transcritos para IFNT e DNMT3A, enquanto a suplementação com EPA + DHA afetou negativamente as taxas de produção embrionária.

Palavras chaves: célula trofoblástica, embrião, prostaglandinas, ácidos graxos, prenhez, bovino.

ABSTRACT

Early embryonic mortality (EMP) caused by failures in maternal recognition of pregnancy (RMP), between days 15 and 17 after fertilization, is one of the biggest causes of reproductive failures in bovine females. Strategies to promote RMP during this critical period are based on reducing the synthesis of prostaglandin F2 α (PGF2 α) by the maternal endometrium and/or maximizing the anti-luteolytic stimulus induced by the conceptus, including increasing the synthesis of prostaglandin E2 (PGE2) and interferon-tau (IFNT). PGE2 synthesized by the maternal endometrium, embryo and trophoblastic cells has luteotrophic and anti-luteolytic effects; favoring the RMP. The addition of different fatty acids to cell cultures modifies the biosynthesis of eicosanoids, including PGE2 and PGF2 α . The hypothesis is that supplementation with conjugated linoleic acid (CLA), linoleic acid (LA), oleic acid (OA) and eicosapentaenoic acid (EPA) associated with docosahexaenoic acid (DHA) increases the synthesis of PGE2, decreases the synthesis of PGF2 α and increases the PGE2/PGF2 α ratio in bovine trophoblastic cells (CT-1); modifies the expression of transcripts involved in the biosynthesis of PGE2 and PGF2 α in CT-1 and bovine embryos produced in vitro; alters the expression of transcripts that favor RMP in CT-1 and embryos, in addition to favoring the level of DNA methylation in embryos. Thus, the objective of Experiment 1 was to: a) evaluate the effects of supplementation with 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO or 50 μ M EPA + 50 μ M DHA on the synthesis of PGE2, PGF2 α and the PGE2/PGF2 α ratio in CT-1; b) evaluate the expression of transcripts involved in the biosynthesis of prostaglandins (PTGER4, PTGS2, PTGES2, PTGES, AKR1B1) and RMP (IFNT) in CT-1. Thus, the objective of Experiment 2: a) evaluate the effects of supplementation with 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO or 50 μ M EPA + 50 μ M DHA on the expression of transcripts involved in the biosynthesis of prostaglandins (PTGS2, PTGES and AKR1B1), in RMP (IFNT) and in the level of DNA methylation (DNMT3A) in bovine embryos produced in vitro and b) evaluate the embryo production rate after 7 and 9 days of culture. In Experiment 1, CT-1 in 6-well plates containing medium added with 10% fetal bovine serum (FBS), where they were cultured at 38.5°C with 5% CO₂ for 5 days. CT-1 received SFB-free culture medium for 24 hours. Then, the wells received medium without SFB containing 100 μ M CLA, 100 μ M LA, 100 μ M OA or 50 μ M EPA + 50 μ M DHA for 5 minutes and 24, 48 and 72 hours. At the end of the cultivation, the medium was collected and CT-1 RNA was extracted with 1mL/well of Trizol. The concentrations of PGE2 and PGF2 α were measured by ELISA and the transcripts were evaluated by the RT-PCR technique. 5 experimental repetitions were performed. Statistical analysis was performed by SAS PROC MIXED, considering the well as the experimental unit. In Experiment 2, ovarian follicles measuring 2 to 10 mm from slaughtered Nelore females were aspirated using a 10 mL syringe and 18G needle. Oocytes with homogeneous cytoplasm and multiple layers of cumulus cells were subjected to in vitro maturation (IVM) in 100 μ L drops containing MIV medium with 5% fetal bovine serum (FBS) under mineral oil, in an incubator at 38.5 °C in an atmosphere humidified at 5% CO₂ for 24 hours. After IVM, the oocytes were subjected to in vitro fertilization (IVF), with semen from a single Nelore bull, for 18 hours under the same conditions as IVM (D0 = day of IVF). After IVF, probable zygotes (n = 1117) were allocated to 4-well plates with 700 μ L of culture medium/well with 1.25% FBS, plus the following treatments: 100 μ M conjugated linoleic acid (Group CLA; n = 223 oocytes); 100 μ M linoleic acid (Group LA; n= 227); 100 μ M oleic acid (Group OA; n = 225) or 50 μ M eicosapentaenoic acid - EPA + 50 μ M docosahexaenoic acid – DHA (Group EPA + DHA; n= 219); in addition to medium without AG (Control Group; n = 223). Embryo production was evaluated on D7 and D9. Embryos were collected on D9 and transcripts were evaluated using the RT-PCR technique. 10 experimental repetitions were performed. Statistical analysis was performed using the SAS PROC MIXED software. In experiment 1, there was no difference in the synthesis of PGE2 and PGF2 α within 5 min between the different groups. The groups treated with LA when compared to the control showed greater (P < 0.001) PGE2 synthesis at 24 hours (301.19 $\pm$ 61.83 vs 45.59 $\pm$ 4.00 ng/mL; respectively), 48 hours (272.42 $\pm$ 56.82 vs 48.15 $\pm$ 6.59 ng/mL; respectively) and 72 hours (310.58 $\pm$ 81.54 vs 97.40 $\pm$ 22.40 ng/mL; respectively). PGF2 α synthesis was greater (P < 0.001) in the LA and OA groups when compared to the control at 24 hours (151.67 $\pm$ 17.01 and 105.71 $\pm$ 30.86 vs 45.89 $\pm$ 9.86 ng/mL; respectively), 48 hours (112.94 $\pm$ 40.95 and 159.41 $\pm$ 43.67 vs 80.10 $\pm$ 19.10 ng/mL; respectively) and 72 hours (317.67 $\pm$ 55.52 and 200.81 $\pm$ 20.39 vs 98.77 $\pm$ 21.81 ng/mL respectively). PGF2 α synthesis was lower (P < 0.001) in the EPA + DHA group when compared to the control at 48 hours (7.28 $\pm$ 0.54 vs 45.89 $\pm$ 9.86 ng/mL; respectively) and

72 hours (11.07 ± 0.71 vs 98.77 ± 21.81 ng/mL respectively). The PGE2/PGF2 α ratio was higher ($P = 0.007$) in the CLA, LA, EPA + DHA groups compared to the control group for 24 (2.23 ± 0.31 ; 2.04 ± 0.40 and 2.32 ± 0.31 vs 1.11 ± 0.15 ; respectively), 48 (3.16 ± 0.68 ; 2.42 ± 0.29 and 2.77 ± 0.50 vs 0.74 ± 0.15 ; respectively) and was maintained for 72 hours only in the EPA + DHA group compared to the control (4.19 ± 1.44 vs 1.09 ± 0.18 ; respectively). No difference was observed between groups for PTGES ($P = 0.7799$), PTGES2 ($P = 0.8107$) and PTGS2 ($P = 0.4183$) transcripts. A tendency was observed for PTGR4 abundance to be greater ($P = 0.1565$) in the LA group when compared to EPA + DHA (0.0020 ± 0.0002 vs 0.0008 ± 0.0002 ; respectively). A tendency was also observed for the abundance of AKR1B1 to be higher ($P = 0.1618$) in the OA group when compared to the CLA (0.2625 ± 0.0265 vs 0.1512 ± 0.0314 ; respectively). After 72 hours of cultivation, a higher ($P = 0.0044$) relative expression of PTGS2 was observed in the LA group compared to the control (7.4253 ± 0.5671 vs 4.4689 ± 0.4454). A higher relative expression for IFNT was observed in the LA group when compared to the control at 24 hours (0.1374 ± 0.0090 vs 0.0990 ± 0.0125 respectively; $P = 0.0216$) and 72 hours (0.2336 ± 0.0126 vs 0.1293 ± 0.0103 , respectively, $P = 0.0031$). At 48 hours, IFNT expression was higher in the LA, OA, EPA + DHA groups when compared to the control (0.1699 ± 0.0294 ; 0.2989 ± 0.1391 and 0.2332 ± 0.0438 vs 0.0899 ± 0.0179 , respectively, $P = 0.0103$). In Experiment 2, embryo production was reduced in the EPA + DHA group on D7 and D9 (3.98 ± 1.43 vs 14.94 ± 3.13 vs 2.34 ± 1.29 vs 12.86 ± 3.10). No difference was observed between groups for the relative expression of PTGES ($P = 0.5496$) and AKR1B1 ($P = 0.1794$). The relative expression of PTGS2 was higher ($P = 0.0286$) in the OA group compared to the control and LA group (1.1090 ± 0.0833 vs 0.7109 ± 0.0748 and 0.7068 ± 0.0577 ; respectively) and the CLA group did not differ from the other groups. IFNT expression tended ($P = 0.1148$) to be higher in the CLA and OA groups compared to the control (0.1544 ± 0.0293 and 0.1750 ± 0.0465 vs 0.0344 ± 0.0073 respectively). DNMT3A expression tended to be higher ($P = 0.0797$) in the CLA and OA groups compared to the control (0.0009 ± 0.0001 and 0.0012 ± 0.0005 vs 0.0001 ± 0.00008 respectively). In Experiment 1, it was concluded that LA supplementation in the CT-1 culture medium increases PGE2 synthesis after 24, 48 and 72 hours of culture; increases PGF2 α synthesis at 24 and 72 hours of culture and increases PGE2/PGF2 α ratio at 24 and 48 hours and increases the relative abundance of PTGS2 transcripts at 72 hours of culture and of IFNT at 24, 48 and 72 hours of culture, and can be a great ally in the RMP. In Experiment 2, it was concluded that supplementation of the embryo culture medium with OA increased the transcript abundance for PTGS2 and CLA and OA tended to increase the transcripts for IFNT and DNMT3A, while supplementation with EPA + DHA negatively affected the embryonic production rates.

Key words: trophoblastic cell, embryo, prostaglandins, fatty acids, pregnancy, bovine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo esquemático da hipótese do experimento 1.....	29
Figura 2	Modelo esquemático da hipótese do experimento 2.....	30
Figura 3	Delineamento experimental do experimento 1.....	42
Figura 4	Panorama gráfico do efeito da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> de CT-1 com 100 μ M de diferentes ácidos graxos na síntese de PGE2.....	50
Figura 5	Panorama gráfico do efeito da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> de CT-1 com 100 μ M de diferentes ácidos graxos na síntese de PGF2 α	51
Figura 6	Panorama gráfico do efeito da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> de CT-1 com 100 μ M de diferentes ácidos graxos na razão PGE2/PGF2 α	52
Figura 7	Panorama gráfico da expressão relativa dos transcritos PTGES, PTGES2, PTGER4, PTGS2 e AKR1B1 no tempo de 48 horas em CT-1	54
Figura 8	Panorama gráfico da expressão relativa do transcrito PTGS2 no tempo de 72 horas em CT-1.....	54
Figura 9	Panorama gráfico da expressão relativa do transcrito IFNT nos tempos de 24, 48 e 72 horas em CT-1	55
Figura 10	Sumarização dos resultados do experimento 1	56
Figura 11	Delineamento experimental do experimento 2	67
Figura 12	Panorama gráfico do efeito da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> de embriões com 100 μ M de diferentes ácidos graxos sobre as taxas de clivagem	74
Figura 13	Panorama gráfico do efeito da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> de embriões com 100 μ M de diferentes ácidos graxos sobre as taxas de blastocistos no D7	75
Figura 14	Panorama gráfico do efeito da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> de embriões com 100 μ M de diferentes ácidos graxos sobre as taxas de blastocistos no D9	75
Figura 15	Panorama gráfico do efeito da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> de embriões com 100 μ M de diferentes ácidos graxos sobre as taxas de eclosão no D9	76
Figura 16	Panorama gráfico da expressão relativa dos transcritos PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT e DNMT3A em embriões bovinos no D9	78

Figura 17	Sumarização dos resultados do experimento	
	2.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Primers específicos para bovinos utilizados no experimento 1.....	45
Tabela 2	Símbolo dos genes alvos e genes de referências.....	71
Tabela 3	Dados de validação dos primers e da concentração das amostras dos genes alvos.....	72
Tabela 4	Dados de validação dos primers e da concentração das amostras dos genes de referência.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AGs	Ácidos graxos
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
AKR1B1	Enzima PGF sintase B1
AKR1C4	Enzima PGF sintase C4
AL	Ácido Linoleico
AO	Ácido Oleico
BEND	Células Endometriais Bovinas
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo Lúteo
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
CO ₂	Dióxido de Carbono
COCs	Complexo <i>Cumulus</i> -Oocitos
COX-1	Cicloxygenase 1
COX-2	Cicloxygenase 2
DHA	Ácido docosahexaenóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPA	Ácido eicosapentanóico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
ISGs	Genes Estimulados por Interferon-tau
IFNT	Interferon-tau
MEP	Mortalidade Embrionária Precoce
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MiRNAs	MicroRNAs
P4	Progesterona
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
PTGE1	Enzima PGE sintase 1
PTGE2	Enzima PGE sintase 2
PTGE3	Enzima PGE sintase 3
PTGER	Receptor de prostaglandina E
PTGES	Enzimas PGEs sintases
PTGS1	Prostaglandina-endoperóxido sintase 1
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintase 2
RMP	Reconhecimento Materno da Prenhez
SFB	Soro Fetal Bovino
TEC	Toneladas Equivalente de Carcaça
TETF	Transferência de Embriões em Tempo Fixo
μ g	Micrograma
°C	Graus celsius

μL	Microlitro
μM	Micromolar
nM	Nanomolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 Mortalidade embrionária precoce em fêmeas bovinas	25
2.2 Biossíntese e secreção de prostaglandinas no embrião	25
2.5 Efeitos dos ácidos graxos na síntese de prostaglandinas	26
2.3 Importância das células trofoblásticas no RMP	27
2.4 Uso de ácidos graxos específicos como moduladores da síntese de prostaglandinas.....	29
2 HIPÓTESE.....	32
3 OBJETIVOS	33
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Local do experimento.....	42
2.2 Obtenção das células trofoblásticas bovinas (Linhagem CT-1).....	43
2.3 Preparação da matriz de membrana basal matrigel para o início do cultivo celular	44
2.4 Cultivo das CT-1	44
2.5 Preparo da solução estoque de CLA, AL, AO e EPA + DHA para o preparo dos tratamentos	45
2.6 Delineamento experimental.....	41
2.7 Coleta do meio de cultivo.....	45
2.8 Coleta das CT-1	46
2.9 Quantificação de PGE2 e PGF2 α pelo ensaio imunoenzimático (ELISA).....	46
2.10 Extração de RNA e síntese de cDNA	46
2.11 Seleção e validação de pares de primers	47
2.12 Análises da expressão de transcrições	48

2.13 Análise estatística	49
3 RESULTADOS	49
3.1 Efeitos na síntese de PGE2, PGF2 α e na razão PGE2/ PGF2 α	49
3.2 Efeitos nos transcritos PTGES, PTGES2, PTGER4, PTGS2 e AKR1B1 com 48 horas de cultivo	53
3.3 Efeito no transcrito PTGS2 relacionados a síntese com 72 horas de cultivo	54
3.4 Efeitos na expressão de IFNT nos tempos de 24, 48 e 72 horas de cultivo	54
4. DISCUSSÃO	56
5 CONCLUSÃO.....	60
1 INTRODUÇÃO	64
2 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 Local do experimento.....	67
2.2 Aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouros	68
2.3 Delineamento experimental.....	66
2.4 Maturação <i>in vitro</i> dos complexos cumulus-oócito (COCs)	68
2.5 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	69
2.6 Preparo das soluções de ácidos graxos	69
2.7 Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões (CIV).....	70
2.8 Avaliação da produção embrionária	70
2.9 Armazenamento dos embriões para posterior análise por RT-qPCR	71
2.10 Extração de RNA e síntese de cDNA	71
2.11 Seleção e validação de pares de primers	72
2.12 Análises da expressão de transcrições	73
2.13 Análise estatística	73
3. RESULTADOS	73
3.1 Taxa de clivagem no D3.....	74
3.2 Taxa de blastocisto no D7	74
3.3 Taxa de blastocisto no D9	75

3.4 Taxa de eclosão no D9.....	76
3.5 Abundância de PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT e DNMT3A no D9	76
3 DISCUSSÃO	78
5 CONCLUSÃO.....	83

1 INTRODUÇÃO

A eficiência na produção de carne bovina precisa progredir significativamente, nas próximas décadas, para atender ao aumento da população e a crescente demanda mundial por proteína animal. Segundo as Nações Unidas (FAO, 2009), até 2050 a produção de carne bovina deverá ser incrementada em 120% para alimentar uma população de 2,3 bilhões de pessoas. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), em 2022 foram produzidos 10,79 milhões de toneladas de equivalente carcaça (TEC), destas 3,02 milhões de TEC foram destinadas às exportações, tornando o Brasil o maior exportador mundial de carne bovina.

No sistema de produção de carne bovina, a produção de bezerros é determinante no montante de carne produzida. A eficiência reprodutiva das fêmeas de corte, que devem apresentar um intervalo entre partos de 12 meses gerando a produção de um bezerro/matriz/ano, é o principal fator que limita a produtividade no sistema de cria. Diante deste cenário, a utilização de biotecnologias aplicadas a reprodução torna-se cada vez mais expressiva. A inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), produção *in vitro* de embriões (PIVE) e transferência de embriões em tempo fixo (TETF) constituem poderosas estratégias para aumentar a eficiência reprodutiva. Atualmente, tais biotecnologias são mundialmente utilizadas em larga escala.

Em fêmeas de corte, mortalidade embrionária precoce (MEP) ocasionada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP), no período entre 15 e 17 dias após a fecundação, tem sido reconhecida como um dos principais limitadores da eficiência reprodutiva (BINELLI et al., 2001). Para que a prenhez seja estabelecida com êxito o conceito (embrião e membranas anexas) deve sinalizar a sua presença ao endométrio, principalmente pela liberação de interferon tau (IFNT). O IFNT sintetizado e secretado pelas células trofoblásticas do conceito, foi caracterizado como a principal molécula envolvida no RMP (ROBINSON *et al.*, 2006; EALY e YANG, 2009).

A sinalização realizada pelo conceito durante o RMP contempla vias metabólicas complexas, onde inclui-se a biossíntese dos eicosanóides, especialmente as prostaglandinas (PGs). Considera-se que quanto maior o alongamento e comprimento do conceito, maior a expansão das células trofoblásticas e consequentemente maior a secreção de IFNT no lúmen uterino. O crescimento das células trofoblásticas amplia o aumento da área de superfície do conceito em contato com o epitélio endometrial, assim favorecendo o RMP. O IFNT secretado pelas células trofoblásticas do conceito, é lançado no lúmen uterino e interage por mecanismos parácrinos com as células endometriais, determinando o bloqueio na síntese de prostaglandina

F2 α (PGF2 α). Estratégias que possam favorecer a presença de conceptos mais alongados com maior capacidade de síntese de IFNT que sejam mais capazes de inibir as enzimas que participam síntese de PGF2 α endometrial durante o período crítico, podem aumentar as taxas de prenhez. O IFNT ainda estimula nas células endometriais, células trofoblásticas e embrião e/ou concepto; o aumento na síntese de prostaglandina E2 (PGE2). A PGF2 α exerce funções luteolíticas, promovendo a destruição funcional e estrutural do corpo lúteo (CL) e assim diminuindo as concentrações circulantes de progesterona (P4). Antagonicamente, a PGE2 exerce efeitos luteotróficos que determinam a manutenção do CL e ainda aumenta a síntese de P4 pelo CL, condição fundamental para o êxito do RMP.

Embriões bovinos, a partir do estágio de duas células, apresentam PGE2 sintases que conferem sua capacidade de sintetizar PGE2 (BORUSZEWSKA *et al.*, 2019). A PGE2 sintetizada pelo embrião e/ou concepto é adicionada ao histotrofo, definido como o meio nutritivo que envolve e nutre o embrião no lúmen uterino.

Alguns ácidos graxos (AGs) específicos reconhecidamente alteram a biossíntese das PGs, ganhando destaque as famílias ômega-3, ômega-6 e ômega-9. O ácido linoleico conjugado (CLA) e ácido linoleico (AL) representam a família ômega-6, ácido oleico (AO) a família ômega-9, o ácido docosahexanóico (DHA) e ácido eicosapentaenoico (EPA) a família ômega-3. A adição de tais AGs específicos, em uma variedade de tecidos, modificou a biossíntese de prostaglandinas (PGs). Embora alguns estudos tenham investigado o uso de AGs em modelos *in vivo* e *in vitro*, o mecanismo de ação pela qual tais AGs alteram a biossíntese das PGs, ainda é pouco esclarecida.

Os referidos AGs além de exercerem efeitos na comunicação materno-fetal, também podem beneficiar a metilação do DNA. A reprogramação epigenética é crucial durante desenvolvimento embrionário inicial. A manipulação de oócitos e embriões durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, podem afetar tal reprogramação. Por exemplo, embriões bovinos cultivados sob estresse oxidativo apresentaram um maior nível de metilação em comparação ao controle nos estágios de quatro células e blastocisto (LIANG *et al.*, 2011a).

Considerando a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no RMP, o presente estudo propõe investigar os efeitos da suplementação com AGs no meio de cultivo de células trofoblásticas e embriões bovinos produzidos *in vitro*. Tal investigação baseia-se na avaliação dos AGs na síntese de PGE2, PGF2 α e razão PGE2/PGF2 α em células trofoblásticas bovinas (CT-1), e na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas e no reconhecimento materno-fetal em CT-1 e embriões, e ainda os efeitos de

tais AGs no nível de expressão de transcritos envolvidos na metilação do DNA dos embriões após 9 dias de cultivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mortalidade embrionária precoce em fêmeas bovinas

A MEP é um dos principais fatores que afetam negativamente a performance reprodutiva de fêmeas de corte. Entre os dias 15 e 17 após a fecundação, período crítico em relação a RMP, o conceito (embrião e membranas anexas) precisa produzir competentemente moléculas que interagem com o endométrio inibindo a cascata de síntese de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) e consequentemente a luteólise (GOFF, 2002). A presença do conceito no útero não assegura o bloqueio efetivo da luteólise onde relatou-se, em fêmeas de corte durante o período crítico, perdas de 20 a 40% (VANROOSE *et al.*, 2000).

As células endometriais possuem programação predefinida para induzir a liberação pulsátil de $PGF2\alpha$ durante o período crítico. Desse modo, é necessário que o conceito remeta competentemente sinais anti-luteolíticos para bloquear a secreção pulsátil de $PGF2\alpha$ (BINELLI e THATCHER, 1999). A atuação do IFNT no RMP foi relacionada por Arosh *et al.* (2016) e Pate (2020). O IFNT secretado pelas células trofoblásticas do embrião e/ou conceito exerce através de mecanismos parácrinos, a função de prevenir a secreção pulsátil de $PGF2\alpha$ (SPENCER *et al.*, 2004b; SPENCER *et al.*, 2007). Essa prevenção inicia-se no momento da sinalização, o IFNT após ser secretado no lúmen uterino se liga aos seus receptores (IFNR1 e IFNR2) na membrana das células endometriais. A ligação do IFNT aos seus receptores ativa a cascata de sinalização JAK/STAT, dando origem a formação do fator de transcrição ISGF3, esse por sua vez é transportado ao núcleo da célula inibindo os transcritos dos receptores de estradiol (ER) e consequentemente a formação dos receptores de ocitocina (OXTRs). A síntese e a ocorrência dos pulsos de $PGF2\alpha$ endometrial é impedida pela ausência de OXTRs (não ocorre a ligação da OT aos seus receptores), desta forma, impedindo a luteólise. Falhas em inibir a síntese de $PGF2\alpha$ determinam a MEP.

2.2 Biossíntese e secreção de prostaglandinas pelo embrião

As PGs sintetizadas pelo embrião exercem um papel fundamental no desenvolvimento embrionário inicial (LEWIS, 1989), a $PGE2$ fornece aporte para a síntese de $P4$ no CL,

fundamental para manutenção e estabelecimento da prenhez (WEEMS *et al.* 2006; WEEMS *et al.*, 2007; WATHES *et al.*, 2007). O embrião pré-implantação produz algumas prostaglandinas incluindo PGF2 α , PGE2 e PGI2. Hwang *et al.* (1988) avaliaram a metabolização do ácido araquidônico pelo embrião em diferentes fases de desenvolvimento. Os autores, constataram que os embriões bovinos produzem uma quantidade mais relevante de PGE2 antes do dia 12, PGE2 e PGF2 α entre os dias 13 e 15, e PGI2 após o dia 15 de desenvolvimento. É possível que a PGE2 originada do embrião bovino exerça efeitos parácrinos e/ou endócrinos no oviduto e endométrio, modulando o ambiente para uma maior receptividade ao embrião, uma vez que vários subtipos do receptor para PGE2 (EP2, EP3 e EP4) acoplado à proteína G (EP) estão expressos nas células do oviduto bovino durante as diferentes fases do ciclo estral (GABLER *et al.*, 2008) e em tecidos uterinos durante os primeiros 50 dias de prenhez (EP2 e EP3; AROSH *et al.*, 2004). A PGE2 e PGI2 desempenham papéis importantes também na função do CL, considerando que a adição dessas PGs ao CL aumentou a secreção de P4 (TANIKAWA *et al.*, 2005).

De acordo com Boruszewska *et al.* (2019), as PGs são metabólitos do ácido araquidônico, esse por ação da prostaglandina-endoperóxido sintase 1 (PTGS1) ou 2 (PTGS2) (anteriormente conhecidas como COX-1 e COX-2) é convertido em PGH2. A isoenzima PTGS1 foi encontrada em muitos tecidos, enquanto PTGS2 é uma isoforma induzível, participando de eventos cruciais na reprodução, como ovulação e implantação. A PGH2 é então convertida em PGE2 por meio das PGE sintases (PTGES1; PTGES1; PTGES3). A PGH2 é convertida a PGF2 α através da ação de enzimas sintases (AKR1B1; AKR1C4 e AKR1C3) (FORTIER *et al.*, 2008).

2.5 Efeitos dos ácidos graxos na síntese de prostaglandinas

A expressão de RNA mensageiro (RNAm) de cicloxigenase 2 (COX-2) e PTGES1, enzimas envolvidas na síntese de PGE2 em embriões, foram maiores em blastocistos e blastocistos expandidos comparados a mórula e estágios iniciais de blastocisto produzidos *in vitro* em novilhas holandesas. Tal evidência permite sugerir que embriões bovinos produzidos *in vitro* nos estágios de mórula e blastocisto utilizam exclusivamente a via COX-2/PTGES1 para a biossíntese de PGE2 (SAINT-DIZIER *et al.*, 2011). Acredita-se que possa existir uma relação positiva entre a biossíntese de PGE2 e a expansão do blastocelo, podendo a PGE2 também estar envolvida no desenvolvimento e eclosão do blastocisto. Além disso, a expressão

de COX-2 e PTGES1 foi maior em embriões de grau 1 comparado a embriões de qualidade inferior. Os autores sugerem que embriões de maior qualidade, apresentam maior competência de desenvolvimento após transferência intrauterina, e consequentemente também possui maior capacidade de sintetizar PGE2, proporcionando maiores chances de um RMP bem sucedido e uma prenhez bem estabelecida.

A expressão de RNAm de prostaglandina F₂ α sintase (PGFS) e receptor da prostaglandina F₂ α (PTGFR) envolvidos na biossíntese de PGF₂ α foi investigada em embriões bovinos com base no tempo de sua primeira divisão, a expressão de PGFS e PTGFR variou substancialmente de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião pré-implantacional, bem como sua qualidade (GRYCMACHER *et al.*, 2019). Os mesmos autores sugerem que existe uma via regulatória autócrina para a PGF₂ α , que é mais evidente em embriões de clivagem tardia, ou seja, embriões que possuem seu desenvolvimento atrasado possui menores chances após transferência de estabelecerem com sucesso a prenhez, pois possuem uma maior expressão de PGFS e PTGFR.

A síntese de PGF₂ α e PGE2 no tecido endometrial e células endometriais foi muito bem esclarecida e compreendida. No entanto, a síntese de PGF₂ α e PGE2 em embriões, conceptos e células trofoblásticas foi pouco estudada e compreendida. O uso de diferentes ácidos graxos pode alterar a proporção de PGF₂ α e PGE2 produzidas nas células trofoblásticas, embriões e conceptos. Diante do exposto, um aumento na expressão de mRNA envolvidos na biossíntese de PGE2 e uma diminuição de mRNA envolvidos na biossíntese de PGF₂ α pode favorecer o RMP, uma vez que a cascata de síntese de PGE2 seria beneficiada.

2.3 Importância das células trofoblásticas no RMP

Nas fêmeas ruminantes, o conceito antes mesmo de sua adesão e implantação no útero possui um desenvolvimento expressivo. No período de pré-implantação o blastocisto perde sua conformidade esférica e torna-se alongado adquirindo uma forma filamentosa. Essa mudança é mediada exclusivamente pela secreção epitelial endometrial e pelo transporte seletivo de moléculas, especialmente fatores de crescimento, íons, glicose, aminoácidos (SPENCER *et al.*, 2004a; SPENCER *et al.*, 2007). A secreção proveniente das glândulas uterinas, denominada de histotrófo, é requerida para a proliferação e expansão das células trofoblásticas e alongação do conceito (THATCHER *et al.*, 2001; INSKEEP e DAILEY, 2005). Assume-se que quanto mais enriquecido o histotrofo, maiores são as possibilidades de alongamento e produção de IFNT pelo conceito.

Com a expansão e o aumento das células trofoblásticas a área de superfície de contato de tais células com o epitélio uterino é favorecida. O maior contato das células com o epitélio uterino determina um aumento na produção de IFNT, principal fator envolvido no reconhecimento materno-fetal na espécie bovina (ROBINSON *et al.*, 2006; EALY e YANG, 2009). O IFNT é secretado pelas células trofoblásticas e exerce papel crucial no estabelecimento e manutenção da prenhez em fêmeas ruminantes, sendo que sua ação previne a secreção pulsátil de PGF2 α e a luteólise (SPENCER *et al.*, 2004b; SPENCER *et al.*, 2007).

O IFNT também estimula a síntese endometrial de PGE2 que exerce funções luteotróficas (ASSELIN *et al.*, 1997; AROSH *et al.*, 2004). Ele também exerce efeitos promotores no desenvolvimento do conceito (KIM *et al.*, 2003; CHENG *et al.*, 2006; BAZER *et al.*, 2009), promove aumento na expressão de proteínas transportadoras de glicose e aminoácidos, importantes para a passagem de tais moléculas para o lúmen uterino (GAO *et al.*, 2009), atua na regulação da resposta imune sistêmica e uterina da prenhez (GIFFORD *et al.*, 2007; GIFFORD *et al.*, 2008). Durante a expansão e proliferação das células trofoblásticas ocorre a dinâmica de produção e liberação de IFNT, fator crucial para o desenvolvimento e alongação do conceito, antes que ocorra a adesão uterina. A maior produção de IFNT coincide com a rápida alongação do conceito que acontece de 14 a 15 dias de prenhez (EALY *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2006).

As células trofoblásticas bovinas (CT-1), responsáveis pela síntese de IFNT e PGE2 ambos envolvidos na dinâmica do reconhecimento materno da prenhez, constituem uma linhagem de células imortalizadas derivadas de blastocistos bovinos cultivados *in vitro*, caracterizando um interessante e exclusivo modelo biológico de estudo para o maior entendimento dos mecanismos envolvidos no reconhecimento materno da prenhez. Portanto, a utilização de células CT-1 em associação com embriões produzidos *in vitro* para descrever os mecanismos de ação ocasionados pela adição de ácidos graxos no meio de cultivo sobre a síntese de PGF2 α e PGE2, assim como na transcrição de alguns genes envolvidos na biossíntese de prostaglandinas e no reconhecimento materno da prenhez torna-se extremamente inédito. Considerando o impacto das perdas econômicas ocasionadas pela mortalidade embrionária precoce em fêmeas bovinas sobre a lucratividade dos empreendimentos na fase de cria em fêmeas bovinas de corte, caso venha a ser comprovado um efeito benéfico da suplementação com ácidos graxos em células CT-1 e/ou em embriões bovinos produzidos *in vitro*, tal conceito possibilitará a determinação de estratégias a campo que possam reduzir a mortalidade

embrionária precoce e, desta forma, melhorar as taxas de concepção em programas de IATF e TETF.

2.4 Uso de ácidos graxos específicos como moduladores da síntese de prostaglandinas

Os AGs possuem impactos benéficos sobre a fertilidade e a capacidade de modificar vias metabólicas específicas, regulam o metabolismo de alguns hormônios, como os esteroides e eicosanoides, modifica processos metabólicos e funcionais no ovário e útero, transcrição de genes codificadores de proteínas envolvidas na reprodução e controle celular (BURR, 1930).

Os Ácidos Graxos Poliinsaturados (AGPI), como DHA e EPA, ambos da família ômega 3, podem ser capazes de suprimir a biossíntese e a liberação de PGF2 α endometrial. Acredita-se que exista uma relação de proporção ideal entre ambos para estimular ou inibir a produção de PGF2 α , porém os dados sobre essa proporção são escassos (WATHES *et al.*, 2007). A síntese de PGF2 α endometrial em bovinos é inibida após exposição a ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) de cadeia longa (MATTOS *et al.*, 2003, CALDARI-TORRE *et al.*, 2006) e a liberação uterina de PGF2 α é reduzida em vacas alimentadas com farinha de peixe e linhaça ricas em AGPI das famílias ômega 3 e 6 (THATCHER *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 2001).

Os AGPI da família ômega 6, especialmente o ácido linoleico (AL) e ácido linoleico conjugado (CLA), reconhecidamente ocasionam modulações na biossíntese de eicosanóides incluindo as PGs. De acordo com Moussavi *et al.*, (2013), as concentrações de PGE2 e PGF2 α foram moduladas, tendo sua concentração diminuída significativamente em meio de cultura de células epiteliais endometriais bovinas quando expostas a quantidades > 50 μ M de CLAs por 24 horas. Entretanto, segundo Cheng *et al.*, (2003), em células endometriais de ovelhas, com ou sem ocitocina ou lipopolissacarídeo, o CLA dose-dependente também foi capaz de modular a síntese de PGs, onde houve uma diminuição da geração de PGF2 α , enquanto baixas doses de CLA 20 μ M aumentaram a geração de PGE2.

Em estudo realizado por Mattos *et al.* (2003), após a exposição de células BEND ao EPA por 24 horas houve uma inibição da síntese de PGF2 α de modo dose dependente, onde a dose de 10 a 20 μ M inibiu a liberação de PGF2 α . Estudos correlacionam principalmente o papel desses ácidos graxos na modulação da síntese de PGF2 α , a qual desencadeia luteólise e possui efeitos embriotóxicos diretos durante o início da gestação (INSKEEP, 2004). O ácido alfa linolênico (ALA) é um precursor do EPA e DHA, que inibem a atividade da ciclooxigenase e consequentemente síntese de PGF2 α (YAQOUB; CALDER, 2007). Assim, a suplementação

com AGs foi associada à redução das perdas de prenhez em vacas leiteiras (THATCHER *et al.*, 1997; MATTOS *et al.*, 2000).

Algumas estratégias utilizando os AGPI da família ômega 6, vem sendo investigadas por esse grupo (Processos FAPESP 2016/02805-4 e 2018/24168-1). Dentre os principais trabalhos com AL realizados por esse grupo, como principal fonte de AGPI adicionado à dieta, destacamos o estudo de Cordeiro *et al.* (2015). Tal estudo, utilizou vacas Nelore multíparas de 40 a 60 dias pós-parto suplementadas com 1,7 kg/vaca/dia de dieta contendo 60% de semente de girassol (principal fonte de ômega-6) e 40% de farelo de soja por 21 dias imediatamente após a IATF. Observou-se um aumento de 18,91% na taxa de prenhez, quando comparado ao grupo controle alimentado com 1,7 kg/vaca/dia de dieta contendo 47% de farelo de milho e 53% de farelo de soja (66,67% vs. 47,76% respectivamente). Em estudo complementar, Cordeiro *et al.* (2015) realizaram a mesma suplementação em novilhas mestiças zebuínas submetidas a TETF e observaram um aumento na taxa de concepção de 18,72% nas vacas suplementadas com semente de girassol comparado ao grupo controle (55,66% vs. 36,94% respectivamente).

O AL é convertido em AA pela ação das enzimas elongase e dessaturase. A série de PG a ser produzida depende da quantidade do substrato disponível. É possível aumentar a produção de PGF₂ α quando se aumenta a disponibilidade de AA (STAPLES *et al.*, 1998). Sugere-se que exista uma relação entre a proporção de ácidos graxos poliinsaturados e a ação dos mesmos, inibindo ou estimulando a produção de PGF₂ α , porém não foram encontrados estudos citando especificamente a melhor relação entre ambos na dieta (WATHES *et al.*, 2007). Uma maior compreensão dos mecanismos de ação dos AGPI na biossíntese das PGs embrionárias torna-se fundamental para que possam ser criadas estratégias para melhorar o crescimento e desenvolvimento embrionário favorecendo as taxas de prenhez.

2.5 Uso de ácidos graxos específicos como promotores de modificações epigenéticas

Modificações epigenéticas, como a modificação de histonas e a metilação do DNA, não alteram as sequências do DNA (CANOVAS *et al.*, 2017). Mudanças na metilação do DNA são altamente reguladas e ocorrem de maneira coordenada ao longo do desenvolvimento embrionário, por meio da desmetilação de genes específicos e da “nova” metilação para garantir a expressão adequada dos genes necessários para cada estágio de desenvolvimento e para a formação de tecidos e órgãos especializados. A metilação do DNA ocorre na posição 5 do CpG dinucleotídeo (5-mC) e está relacionada com a impressão genética e repressão da transcrição.

As DNA metiltransferase (DNMTs) são responsáveis por introduzir um grupo metil ao resíduo citosina (C5) no DNA. Em células de mamíferos, DNMT3A e DNMT3B estão comumente envolvidos na nova metilação que é fielmente mantida por DNMT1 (SEISENBERGER *et al.*, 2013).

A família das DNMT3s é composta por três genes principais: DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. Estudos utilizando modelos de inativação gênica em camundongos e células-tronco embrionárias demonstraram que tanto DNMT3A quanto DNMT3B são essenciais para a "de novo" metilação do genoma durante a embriogênese e são críticos para o desenvolvimento dos mamíferos (OKANO *et al.*, 1998; 1999; HERMANN *et al.*, 2004). Especificamente, a inativação de DNMT3A e DNMT3B resulta na desorganização da "nova" metilação durante o desenvolvimento embrionário inicial ocasionando morte embrionária nesse período, mas não provoca efeito perceptível na manutenção dos padrões de metilação preexistentes (OKANO *et al.*, 1999). Isso sugere que outras enzimas, como DNMT1, são responsáveis pela manutenção desses padrões após a metilação inicial. Portanto, DNMT3A e DNMT3B desempenham papéis essenciais no estabelecimento de padrões de metilação durante a embriogênese, garantindo a expressão gênica apropriada para o desenvolvimento normal dos mamíferos.

A dinâmica da metilação do DNA durante a pré-implantação embrionária tem sido identificada como espécie específica (DESHMUKH *et al.*, 2011). A reprogramação epigenética é altamente crucial durante o desenvolvimento embrionário inicial. Assim, qualquer falha em tal reprogramação, como uma alteração no padrão de metilação, resulta em prejuízos na ativação genômica embrionária e na diferenciação das células embrionárias (LIANG *et al.*, 2011; SALILEW-WONDIM *et al.*, 2018). Vários fatores ambientais, incluindo o estresse oxidativo, podem influenciar a metilação do DNA em embriões. Estudos mostraram que embriões bovinos cultivados sob condições de estresse oxidativo apresentam alterações significativas nos padrões de metilação quando comparados a embriões controle nos estágios de 4 células e blastocistos (LI *et al.*, 2016). Alguns estudos permitiram verificar que em oócitos expostos ao estresse térmico pelo calor ocorre um aumento intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) que induz a efeitos adversos na produção embrionária (LI *et al.*, 2015; NABENISHI *et al.*, 2021). O estresse oxidativo pode causar danos às células por meio da produção excessiva de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, que podem interferir nas vias bioquímicas e moleculares envolvidas na regulação da metilação do DNA. Isso pode resultar em alterações epigenéticas que têm impacto direto no desenvolvimento embrionário.

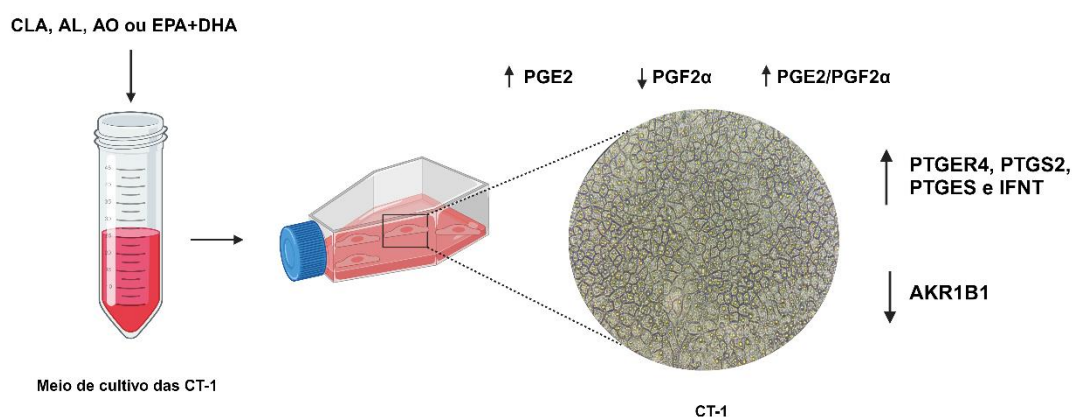
O CLA se comporta com um eliminador de radicais, aumentando o nível intracelular de glutatona reduzida (GSH) e diminuindo o ROS (BASIRICÒ *et al.*, 2015). Verificou-se que

a adição de CLA na MIV aumenta a competência de desenvolvimento do oócito bovino exercendo um efeito benéfico na taxa de blastocisto de oócitos bovinos submetidos ao estresse pelo calor (LAPA *et al.*, 2011; ABAZARIKIA *et al.*, 2020; ABAZARIKIA *et al.*, 2021). Em resumo, o CLA parece exercer efeitos benéficos aumentando a competência de desenvolvimento dos oócitos bovinos, possivelmente através de sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo e melhorar o ambiente celular durante o cultivo *in vitro*. Esses achados são promissores para aplicações futuras na reprodução assistida e na melhoria da eficiência dos programas de fertilização *in vitro* em bovinos e possivelmente em outras espécies.

Mais estudos na perspectiva da alteração do epigenoma tornam-se muito interessantes para elucidar os mecanismos subjacentes de tais efeitos. Assim propõe-se no presente estudo avaliar nos embriões suplementados com diferentes ácidos graxos o nível de metilação do DNA de blastocistos obtidos pelo nível de expressão do gene DNMT3a.

2 HIPÓTESE

Conforme ilustrado na **Figura 1**, a hipótese do **experimento 1** é que a suplementação com 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO ou 50 μ M EPA + 50 μ M DHA no meio de cultura de CT-1 aumenta a síntese de PGE2, diminui a síntese de PGF2 α , aumenta a razão PGE2/PGF2 α e aumenta a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de PGE2 (PTGER4, PTGS2, PTGES2, PTGES), diminui o transcrito envolvido na síntese de PGF2 α (AKR1B1) e aumenta o transcrito envolvido no reconhecimento materno da prenhez (IFNT).

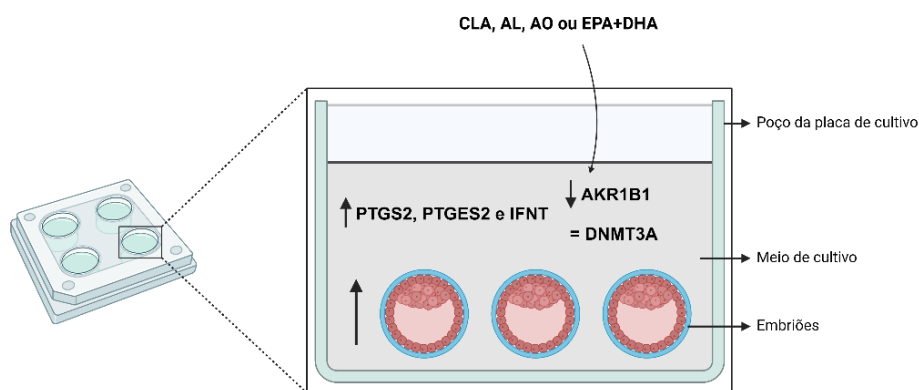


Fonte: elaborado pelo autor

Figura 1. Modelo da hipótese. A suplementação com 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO ou 50 μ M EPA + 50 μ M DHA no meio de cultura de CT-1 aumenta a síntese de PGE2, diminui a síntese de PGF2 α e aumenta a razão PGE2/ PGF2 α ; aumenta os transcritos envolvidos na cascata de síntese da PGE2 (PTGER4, PTGS2,

PTGES2, PTGES), diminui o transcrito envolvido na cascata de síntese da PGF2 α (AKR1B1) e aumenta o transcrito envolvido no RMP (IFNT) em células CT-1

Conforme ilustrado na **Figura 2**, a hipótese do **experimento 2** é que a suplementação com 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO ou 50 μ M EPA + 50 μ M DHA, no meio de cultura de embriões bovinos produzidos *in vitro* aumenta os transcritos envolvidos na cascata de síntese da PGE2 (PTGS2 e PTGES2), diminui o transcrito envolvido na cascata de síntese da PGF2 α (AKR1B1) e aumenta o transcrito envolvido no RMP (IFNT) e mantém o nível de expressão para o transcrito envolvido na metilação do DNA (DNMT3A) e aumenta a produção embrionária com 7 e 9 dias de cultivo.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 2. Modelo esquemático da hipótese do experimento 2. A suplementação com 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO ou 50 μ M EPA + 50 μ M DHA no meio de cultura de embriões bovinos, aumenta os transcritos envolvidos na síntese de PGE2 (PTGS2, PTGES), diminui os transcritos envolvidos na síntese de PGF2 α (AKR1B1), aumenta os transcritos envolvidos no reconhecimento materno fetal (IFNT), mantém os transcritos envolvidos na metilação do DNA (DNMT3A) e aumenta a produção embrionária com 7 e 9 dias de cultivo.

3 OBJETIVOS

No **Experimento 1** objetiva-se: a) avaliar os efeitos da suplementação com 100 μ M CLA, 100 μ M AL, 100 μ M AO ou 50 μ M EPA + 50 μ M DHA na síntese de PGE2, PGF2 α e na razão PGE2/PGF2 α em CT-1; b) avaliar a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas (PTGER4, PTGS2, PTGES2, PTGES, AKR1B1) e no RMP (IFNT) em CT-1.

No **Experimento 2** objetiva-se: a) avaliar os efeitos da suplementação com 100 µM CLA, 100 µM AL, 100 µM AO ou 50 µM EPA + 50 µM DHA na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas (PTGS2, PTGES e AKR1B1), no RMP (IFNT) e no nível de expressão de transcritos envolvidos na metilação do DNA (DNMT3A) em embriões bovinos produzidos *in vitro* e b) avaliar a taxa de produção embrionária com 7 e 9 dias de cultivo.

ÁCIDO LINOLEICO ADICIONADO AO MEIO DE CULTIVO DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS FAVORECE A SÍNTESE DE PGE2 E INTERFERON-TAU

Lucas de Oliveira Bezerra¹, Laura Chuba Machado Rolniche², Adriano Felipe Mendes¹, Amanda Guimarães da Silva³, Isabella Rio Feltrin¹, Catarina Lazarevicius Prestes², Gabriel Souza da Silva², Alan Ealy⁴, Vitor Mercadante⁴, Guilherme Pugliesi¹, Claudia Maria Bertan Membrive^{1,2}

¹São Paulo State University (UNESP), Institute of Bioscience, Botucatu, SP, Brazil

²São Paulo State University (UNESP), College of Agricultural and Technological Sciences, Dracena, SP, Brazil

³University of São Paulo (USP), College of Veterinary Medicine and Animal Science, Pirassununga, SP, Brazil

⁴Virginia Polytechnic Institute and State University, Animal and Poultry Sciences, Blacksburg, VA, EUA

RESUMO

A PGE2 e PGF2 α são sintetizadas pelo endométrio materno e células trofoblásticas do embrião (CT-1). A PGE2 exerce efeitos luteotróficos que favorecem o reconhecimento materno da prenhez (RMP) 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 RMP. Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com AG específicos no meio de cultivo das 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 e a abundância dos transcritos por RT-qPCR. A análise estatística foi realizada pelo PROC MIXED do SAS, considerando o poço a 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 ($P < 0,001$) síntese de PGE2 após 24 ($301,19 \pm 61,83$ vs $45,59 \pm 4,00$ ng/mL respectivamente), 48 ($272,42 \pm 56,82$ vs $48,15 \pm 6,59$ ng/mL respectivamente) e 72 horas ($310,58 \pm 81,54$ vs $97,40 \pm 22,40$ ng/mL respectivamente). A síntese PGF2 α foi maior ($P < 0,001$) no grupo AL e AO quando comparado ao controle nos tempos 24 ($151,67 \pm 17,01$ e $105,71 \pm 30,86$ vs $45,89 \pm 9,86$ ng/mL respectivamente), 48 ($112,94 \pm 40,95$ e $159,41 \pm 43,67$ vs $80,10 \pm 19,10$ ng/mL respectivamente) e 72 horas ($317,67 \pm 55,52$ e $200,81 \pm 20,39$ vs $98,77 \pm 21,81$ ng/mL respectivamente). A síntese de PGF2 α foi menor ($P < 0,001$) no grupo EPA+DHA comparado ao grupo controle em 48 ($7,28 \pm 0,54$ vs $45,89 \pm 9,86$ ng/mL respectivamente) e 72 horas ($11,07 \pm 0,71$ vs $98,77 \pm 21,81$ ng/mL respectivamente). A razão PGE2/PGF2 α foram maiores ($P = 0,007$) nos grupos CLA, AL, EPA+DHA comparados ao grupo controle para 24 ($2,23 \pm 0,31$; $2,04 \pm 0,40$ e $2,32 \pm 0,31$ vs $1,11 \pm 0,15$ respectivamente), 48 ($3,16 \pm 0,68$; $2,42 \pm 0,29$ e $2,77 \pm 0,50$ vs $0,74 \pm 0,15$ respectivamente) e se manteve por 72 horas apenas no grupo EPA + DHA comparado ao controle ($4,19 \pm 1,44$ vs $1,09 \pm 0,18$ respectivamente). Não foi observada diferença entre os grupos para os transcritos PTGES ($P = 0,7799$), PTGES2 ($P = 0,8107$) e PTGS2 ($P = 0,4183$). Foi observada uma tendência na abundância de PTGR4 ser maior ($P = 0,1565$) no grupo AL quando comparado ao EPA + DHA ($0,0020 \pm 0,0002$ vs $0,0008 \pm 0,0002$; respectivamente). Também foi observada uma tendência na abundância de AKR1B1 ser maior ($P = 0,1618$) no grupo AO quando comparado ao CLA ($0,2625 \pm 0,0265$ vs $0,1512 \pm 0,0314$; respectivamente). Com 72 horas de cultivo observou-se uma maior ($P = 0,0044$) expressão relativa de PTGS2 no grupo AL comparado ao controle ($7,4253 \pm 0,5671$ vs $4,4689 \pm 0,4454$). Observou-se maior expressão relativa para o IFNT no grupo AL quando comparado ao controle nos tempos de 24 horas ($0,1374 \pm 0,0090$ vs $0,0990 \pm 0,0125$ respectivamente; $P = 0,0216$) e 72 horas ($0,2336 \pm 0,0126$ vs $0,1293 \pm 0,0103$ respectivamente; $P = 0,0031$). No tempo de 48 horas, a expressão de IFNT foi maior nos grupos AL, AO, EPA + DHA quando comparados ao controle ($0,1699 \pm 0,0294$; $0,2989 \pm 0,1391$ e $0,2332 \pm 0,0438$ vs $0,0899 \pm 0,0179$ respectivamente; $P = 0,0103$). Conclui-se que a suplementação com AL no meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1) aumenta síntese de PGE2 com 24, 48 e 72 horas de cultivo; aumenta síntese de PGF2 α com 24 e 72 horas de cultivo e aumenta razão PGE2/PGF2 α com 24 e 48 horas e aumenta a abundância

relativa dos transcritos PTGS2 com 72 horas de cultivo e de IFNT com 24, 48 e 72 horas de cultivo, podendo ser um grande aliado no RMP.

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

ABSTRACT

PGE2 and PGF2 α are synthesized by the maternal endometrium and trophoblastic cells of the embryo (CT-1). PGE2 exerts luteotrophic effects that favor maternal recognition of pregnancy (RMP) 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; can benefit the embryo in RMP. The objective was to evaluate the effects of supplementation with specific FAs in the CT-1 culture medium on the synthesis of PGE2, PGF2 α and the PGE2/PGF2 α ratio. CT-1s were cultivated for 24 days in culture bottles at 38.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Afterwards, they were transferred to 6-well plates containing medium added with 10% fetal bovine serum (FBS), where they were cultured for 5 days. CT-1 received SFB-free culture medium for 24 hours. Then, the wells received SFB-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. The concentrations of PGE2 and PGF2 α were determined by ELISA and the abundance of transcripts by RT-qPCR. Statistical analysis was performed by SAS PROC MIXED, considering the well as the experimental unit. There was no statistical difference for 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 ($P < 0.001$) synthesis of PGE2 was observed after 24 (301.19 ± 61.83 vs 45.59 ± 4.00 ng/mL respectively), 48 (272.42 ± 56.82 vs 48.15 ± 6.59 ng/mL respectively) and 72 hours (310.58 ± 81.54 vs 97.40 ± 22.40 ng/mL respectively). PGF2 α synthesis was higher ($P < 0.001$) in the LA and OA groups when compared to the control at times 24 (151.67 ± 17.01 and 105.71 ± 30.86 vs 45.89 ± 9.86 ng/mL respectively), 48 (112.94 ± 40.95 and 159.41 ± 43.67 vs 80.10 ± 19.10 ng/mL respectively) and 72 hours (317.67 ± 55.52 and 200.81 ± 20.39 vs 98.77 ± 21.81 ng/mL respectively). PGF2 α synthesis was lower ($P < 0.001$) in the EPA+DHA group compared to the control group at 48 (7.28 ± 0.54 vs 45.89 ± 9.86 ng/mL respectively) and 72 hours (11.07 ± 0.71 vs 98.77 ± 21.81 ng/mL respectively). The PGE2/PGF2 α ratio was higher ($P = 0.007$) in the CLA, AL, EPA+DHA groups compared to the control group for 24 (2.23 ± 0.31 ; 2.04 ± 0.40 and 2.32 ± 0.31 vs 1.11 ± 0.15 respectively), 48 (3.16 ± 0.68 ; 2.42 ± 0.29 and 2.77 ± 0.50 vs 0.74 ± 0.15 respectively) and was maintained for 72 hours only in the EPA + DHA group compared to the control (4.19 ± 1.44 vs 1.09 ± 0.18 respectively). No difference was observed between the groups for PTGES ($P = 0.7799$), PTGES2 ($P = 0.8107$) and PTGS2 ($P = 0.4183$) transcripts. A tendency was observed for PTGR4 abundance to be greater ($P = 0.1565$) in the LA group when compared to EPA + DHA (0.0020 ± 0.0002 vs 0.0008 ± 0.0002 ; respectively). A tendency was also observed for the abundance of AKR1B1 to be higher ($P = 0.1618$) in the OA group when compared to the CLA (0.2625 ± 0.0265 vs 0.1512 ± 0.0314 ; respectively). After 72 hours of cultivation, a higher ($P = 0.0044$) relative expression of PTGS2 was observed in the AL group compared to the control (7.4253 ± 0.5671 vs 4.4689 ± 0.4454). A higher relative expression for IFNT was observed in the LA group when compared to the control at 24 hours (0.1374 ± 0.0090 vs 0.0990 ± 0.0125 respectively; $P = 0.0216$) and 72 hours (0.2336 ± 0.0126 vs 0.1293 ± 0.0103 respectively; At 48 hours, IFNT expression was higher in the LA, OA, EPA + DHA groups when compared to the control (0.1699 ± 0.0294 ; 0.2989 ± 0.1391 and 0.2332 ± 0.0438 vs 0.0899 ± 0.0179 respectively; It is concluded that LA supplementation in the culture medium for bovine trophoblastic cells (CT-1) increases PGE2 synthesis at 24, 48 and 72 hours of culture; increases PGF2 α synthesis at 24 and 72 hours of culture and increases PGE2/PGF2 α ratio at 24 and 48 hours and increases the relative abundance of PTGS2 transcripts at 72 hours of culture and of IFNT at 24, 48 and 72 hours of culture, and can be a great ally in the RMP.

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

1. INTRODUÇÃO

A mortalidade embrionária precoce (MEP), causada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP), leva ao insucesso no estabelecimento da prenhez entre os dias 15 e 17 após a fecundação, esse designado de “período crítico” (BINELLI *et al.*, 2001). Quando o RMP ocorre com êxito, a funcionalidade do corpo lúteo (CL) e as elevadas concentrações circulantes de progesterona (P4) são preservadas (GOFF, 2002; SPENCER *et al.*, 2007).

A MEP é estabelecida pela incompetência do conceito em inibir a síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α) endometrial e consequentemente a luteólise. Após a eclosão da zona pelúcida, por volta 8º dia de desenvolvimento do embrião, o blastocisto começa a adquirir uma forma tubular que mantém até o 11º dia. No 12º dia, ocorre um intenso processo de alongamento do conceito (embrião e membranas anexas), que atinge um comprimento de aproximadamente 100 mm no 14º dia e 250 mm 17º dia de desenvolvimento (SPENCER *et al.*, 2007). O intenso alongamento é observado até o 19º dia, processo caracterizado pelo desenvolvimento do trofoblasto decorrente da notória expansão das células trofoblásticas. Durante a expansão, ocorre um aumento na atividade metabólica das células trofoblásticas resultando em um aumento na secreção de interferon-tau (IFNT) (THATCHER *et al.*, 2001; MANN *et al.*, 2023). A síntese de RNAm para o IFNT tem início no dia 4 do estágio de desenvolvimento embrionário, quando o embrião apresenta 16 células, resultante da fertilização *in vitro* (YAO *et al.*, 2009). A expressão apresenta seu fim com a implantação, uma vez que o contato do trofoblasto com o endométrio cessa a produção de IFNT (DEMMERS; DERECKA; FLINT, 2001).

O IFNT foi caracterizado como a principal molécula envolvida no RMP em fêmeas ruminantes, e age inibindo o desencadeamento da luteólise (EALY; YANG, 2009; ROBINSON *et al.*, 2006). O IFNT inibe a síntese pulsátil de PGF2 α e simultaneamente aumenta a síntese de prostaglandina (PGE2) endometrial, protegendo o CL da luteólise (AROSH; BANU; MCCracken, 2016). A PGE2 juntamente com IFNT, determinam ações luteotróficas, garantindo altas concentrações circulantes de P4 durante o período crítico, uma vez que o CL é preservado, condição fundamental para o estabelecimento da prenhez (TANIKAWA *et al.*, 2005). Além das ações anti-luteolíticas, o IFNT aumenta no endométrio a expressão de genes específicos, denominados de ISGs. Tais genes regulam a receptividade uterina para a implantação e desenvolvimento do conceito (STAGGS *et al.*, 1998; SPENCER *et al.*, 2004). Falhas no RMP decorrem da incompetência do conceito em sinalizar sua presença ao endométrio materno, principalmente em relação a produção de IFNT.

As prostaglandinas (PGs) são reguladores importantes de diversas funções reprodutivas; incluindo luteólise, ovulação e RMP (POYSER, 1995). Em fêmeas bovinas as células endometriais, embrião e conceito são responsáveis pela secreção de PGF2 α e PGE2 (MIYAMOTO; JAN SKARZYNSKI; OKUDA, 2000; MURAKAMI et al., 2001). Estratégias para reduzir a MEP tornam-se de interesse e objetivam reduzir a capacidade de síntese de PGF2 α e aumentar a síntese de PGE2 pelo endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo conceito, incluindo o aumento da capacidade de síntese de PGE2 pelo conceito.

Reconhecidamente os ácidos graxos (AGs) podem modular a biossíntese de PGs endometrial e embrionária (HWANG *et al.*, 1988; CHENG *et al.*, 2003; MOUSSAVI *et al.* 2013), entretanto, os mecanismos pelos quais a biossíntese é modulada ainda é pouco esclarecido. O ácido linoleico conjugado (CLA), especialmente cis-9, trans-11 (c9, t11) e trans-10, cis-12 (t10, c12), determina modificações na via metabólica do ácido graxo poliinsaturado n-6 na biossíntese de eicosanóides, podendo alterar a proporção de PGF2 α e PGE2 produzidas em células endometriais (HWANG *et al.*, 1988; CHENG *et al.*, 2003; MOUSSAVI *et al.* 2013). Em meio de cultura de células epiteliais endometriais bovinas, expostas a quantidades maiores que 50 μ M de CLAs por 24 horas, as concentrações de PGE2 e PGF2 α diminuíram significativamente. O CLA t10, c12 promoveu diminuição na produção de PGs de forma mais acentuada do que o CLA c9, t11 (MOUSSAVI *et al.* 2013). Porém, em células endometriais de ovelhas, com ou sem ocitocina ou lipopolissacarídeo, o CLA de forma dose-dependente suprimiu a síntese de PGF2 α e a concentração de 20 μ M de CLA aumentou a síntese de PGE2 (CHENG *et al.*, 2003). Adicionalmente, o estudo revelou que o CLA aumentou a razão de PGE2/PGF2 α em células endometriais, destacando potencial do CLA na regulação das PGs. Assim a ação dos AGs na síntese de PGs foi bastante avaliada em células endometriais, porém tal ação em embriões e conceitos foi muito pouco estudada.

Lourenço *et al.*, (2022), constatou que a suplementação do meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μ M de CLA (uma mistura de ácido cis- e trans-9,11- e -10,12-octadecadienoico) promoveu redução da síntese de PGF2 α , e redução da síntese de PGF2 α síntese de PGE2 com 24 e 72 horas de cultivo, entretanto, observou-se um aumento da razão PGE2/PGF2 α em todas as concentrações testadas. Adicionalmente, Lourenço *et al.* (2022) constatou que o ácido oleico (AO) também proporcionou modificações na síntese de PGs, onde o AO na concentração de 1.000 μ M diminuiu a síntese de PGF2 α e aumentou a síntese de PGE2 após 72 horas de cultivo.

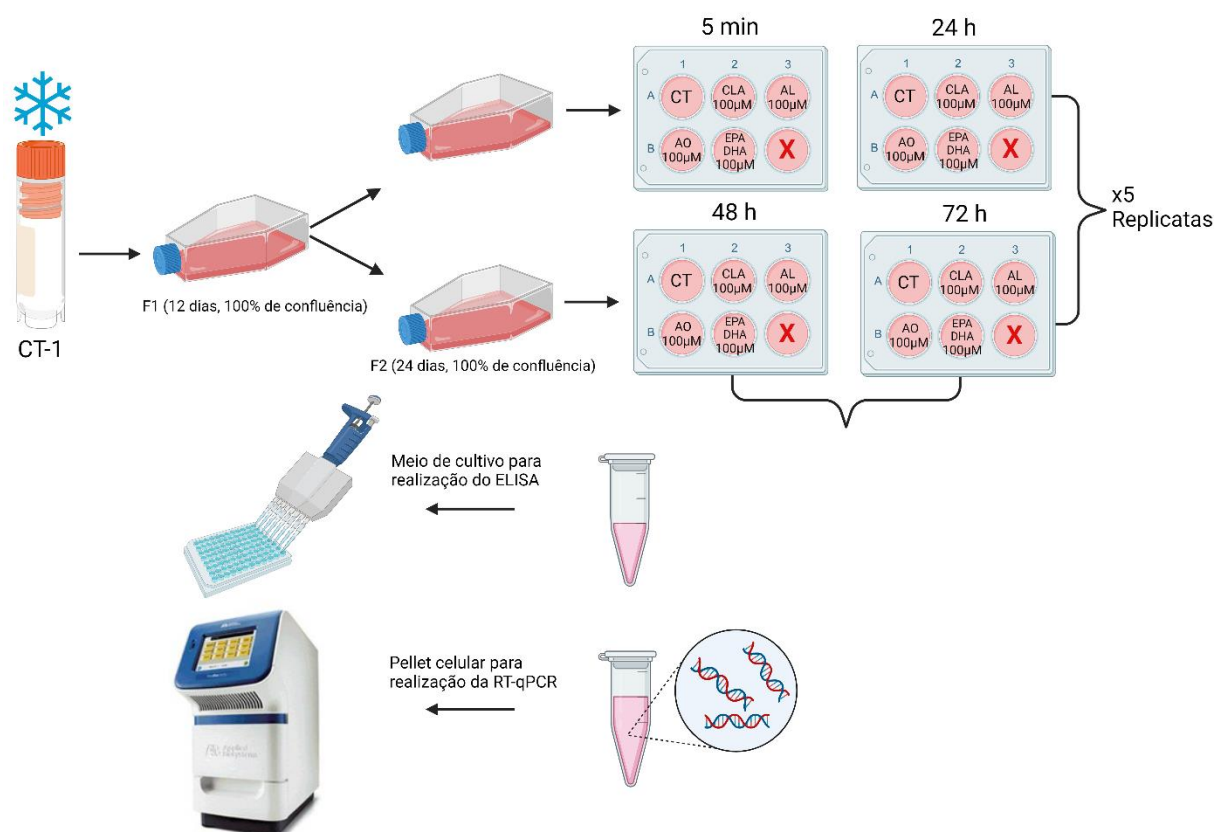
Meier et al. (2009) avaliaram os efeitos do ácido graxo eicosapentaenóico (EPA), ácido graxo docosahexaenóico (DHA) e ácido linoleico (AL) na síntese de PGF2 α e PGE2 endometrial e do tecido trofoblástico de ovelhas durante uma breve cultura. Os AGs não modificaram a síntese de PGF2 α e PGE2 no endométrio de fêmeas D16, estando as mesmas prenhes ou não. Também observaram que tais AGs não modificaram a síntese de PGF2 α e PGE2 no endométrio e células trofoblásticas no D17. Poucos estudos investigaram o efeito da suplementação de AGs específicos no meio de cultura de células do trofotoderma cultivadas *in vitro*.

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 ; por alterar a expressão de transcritos envolvidos na síntese de PGF2 α e PGE2. Assim, objetivou-se determinar os efeitos da suplementação de 100 μ M de CLA, 100 μ M de AL, 100 μ M de AO ou 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA em CT-1 na síntese de PGE2, PGF2 α e na razão PGE2/PGF2 α , assim como na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas (PTGER4, PTGS2, PTGES2, PTGES, AKR1B1) e no reconhecimento materno-fetal (IFNT).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Neste experimento, CT-1 foram cultivadas *in vitro* com 4mL de meio de cultivo contendo os seguintes tratamentos: 100 μ M de CLA (Grupo CLA); 100 μ M de AL (Grupo AL); 100 μ M de AO (Grupo AO); 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA (Grupo EPA + DHA) por 5 min, 24, 48 e 72 horas. Foram realizadas 5 repetições, sendo que em cada repetição foi utilizado 1 poço de cultivo para cada tratamento, conforme representado na **Figura 3**.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 3. Delineamento experimental. Foi utilizado um esquema fatorial 5 x 4 (5 tratamentos x 4 tempos). Foram realizadas 5 replicatas experimentais. CT-1 foram cultivadas *in vitro* com 4mL de meio de cultivo contendo os seguintes tratamentos: 100 µM de CLA (Grupo CLA); 100 µM de AL (Grupo AL); 100 µM de AO (Grupo AO); 50 µM de EPA + 50 µM de DHA (Grupo EPA + DHA) por 5 min, 24, 48 e 72 horas. O meio de cultivo foi coletado ao término do cultivo (5 min, 24, 48 e 72 horas) e a mensuração de PGF2α e PGE2 foi realizada por ELISA. Ao término do cultivo as células de cada poço foram armazenadas para as análises por RT-qPCR. Foram realizadas 5 repetições, sendo que em cada repetição foi utilizado 1 poço de cultivo para cada tratamento.

2.2 Local do experimento

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnologia Animal (FCAT), Departamento de Produção Animal (DPA), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Dracena, São Paulo, Brasil. As análises por ELISA e RT-qPCR foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), Pirassununga, São Paulo, Brasil. Todas as práticas foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de

Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP de Dracena (Protocolo nº 07/2021 – CEUA), estado de São Paulo, Brasil.

2.3 Obtenção das células trofoblásticas bovinas (Linhagem CT-1)

As CT-1 utilizadas como modelo biológico nesse estudo, foram doadas pelo Prof. Dr. Alan Ealy da Virginia Tech, Blacksburg, VA, Estados Unidos. As CT-1 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 ressuspenso 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 IFNT 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 Imunoblotting 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 trofotoderma bovino *in vivo* examinado a partir de blastocistos de pré-implantação expandidos.

2.4 Preparação da matriz de membrana basal matrigel para o início do cultivo celular

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 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.

2.5 Cultivo das CT-1

Previamente ao descongelamento das CT-1, preparou-se a garrafa (F1) de 75 cm² (Corning, Ref. 430641U) previamente preparadas com 15mL uma matriz de membrana basal diluída a 1:3 (Matrigel, Corning, Ref. 356237, Bedford, MA, EUA) cultivadas em meio DMEM com 4,5 g/L d -glicose [DMEM (1X) + GlutaMAX™ –I; Gibco, Ref. 10569-010; Grand Island, NY, EUA] contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado por calor (FBS; Gibco, Ref. 12657029, Grand Island, NY, EUA) e outros suplementos (100 µM de aminoácidos não essenciais, 55 mM de 2-mercaptoetanol, 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de Gibco Anfotericina B ; Gibco), incubada (Panasonic, COM-19AIC(UV)) a 38,5 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 2 horas. Posteriormente, as células contidas no interior de um criotubo, armazenado em nitrogênio líquido, foram descongeladas em água a 38°C por 3 minutos. Após descongelamento, as CT-1 foram ressuspensas em 15 mL de meio de cultivo completo suplementado com 10% de SFB (meio de manutenção), composto por 450 mL DEMEM (1X) + GlutaMAX™ –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-mercaptoetanol (1000X) (Gibco, Ref. 21985023, Grand Island, NY, USA). Após a ressuspensão das CT-1, as mesmas foram adicionadas à garrafa (F1), 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 o que ocorreu em aproximadamente 12 dias. Em cada troca de meio utilizaram-se 15 mL de meio suplementado. Após atingirem 100% de confluência, as CT-1 foram novamente ressuspensas e semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 1×10^6 células em poços de 9,6 cm² (Corning, Ref. 3516, NY, USA) em meio de cultivo completo suplementado com 10% de SFB. As culturas foram incubadas a 38,5°C com 5% de saturação de CO₂. Durante o cultivo, o meio foi trocado a cada 48 horas. Após cinco dias de cultivo das células nos poços, o meio foi substituído, porém sem SFB. Após 24 horas, no 6º dia de cultivo, o meio foi substituído pelo mesmo meio sem soro contendo os respectivos tratamentos.

2.6 Preparo da solução estoque de CLA, AL, AO e EPA + DHA para o preparo dos tratamentos

Foram utilizados o ácido linoléico conjugado (CLA; Sigma-Aldrich, EUA, Cat N°. O5507), ácido linoleico (AL: Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. L1376), ácido oleico (AO: Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. O1383), ácido graxo eicosapentaenóico (EPA; Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. PHR1790) e ácido graxo docosahexaenóico (DHA; Sigma-Aldrich, 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, no final todos os ácidos graxos ficaram na concentração de 100 µM, os únicos que foram utilizados em associação foram o EPA + DHA, porém a concentração desta associação também foi 100 µM. Todas as soluções de tratamentos e o controle tinham quantidades semelhantes de etanol. 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 BSA com os respectivos tratamentos.

2.7 Coleta do meio de cultivo

Após a adição dos tratamentos contendo os diferentes ácidos graxos nos poços das placas de cultivo que continham as CT-1, foi coletado o meio de cultivo para mensuração das concentrações de PGE₂ e PGF₂α por ELISA. Coletou-se 4 mL/poço do meio de cultivo, que

foi fracionado em 4 microtubos (1mL/microtubo) livres de DNase e RNase em todos 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 por ensaio imunoenzimático (ELISA).

2.8 Coleta das CT-1

As CT-1 que estavam aderidas ao fundo de cada poço da placa foram lavadas com Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS (1X), Gibco, Ref. 14190-144, Paisley, UK) para a posterior adição de 1 mL de Trizol (Life Technologies, Ref. 15596018), quando as células estavam lisadas o Pellet foi coletado e armazenado no freezer -80°C até o momento de sua utilização na RT-qPCR.

2.9 Quantificação de PGE2 e PGF2 α pelo ensaio imunoenzimático (ELISA)

Foram utilizados Kits comerciais para a mensuração das concentrações PGE2 (Kit Prostaglandin E2 ELISA – Monoclonal, n° 514010; Cayman Chemical) e PGF2 α (Kit Prostaglandin F2 α ELISA, n° 516011; Cayman Chemical), no meio de cultura. Os kits foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante. Os buffers e reagentes foram diluídos em água ultra pura (MiliQ), a curva padrão foi diluída em matriz (meio DMEM).

2.10 Extração de RNA e síntese de cDNA

As CT-1 que estavam aderidas à placa de cultivo, que foram tratadas com CLA, AL, AO, EPA + DHA além do controle, foram utilizadas para a extração de RNA. As células foram lavadas com solução de Dulbecco – Solução Salina Tamponada com Fosfato (DPBS 1X; Gibco, Ref. 14190-144, Paisley, Reino Unido) e o RNA foi extraído usando 1mL poço de reagente TRIzol® LS (Ambion®, Ref. 10296028, Paisley, Reino Unido) de acordo com as instruções e especificações do fabricante. O RNA extraído foi recuperado, alíquotado em microtubos livre de RNase e DNase e estocado a -80°C para posterior extração das frações RNA, DNA e proteína para a análise por RT-qPCR. A concentração e pureza dos extratos totais de RNA foram determinados por espectrometria (NanoVue; GE Healthcare) e os valores das razões de absorção (A260/280) variaram entre 1,6 a 1,9. Amostras de RNA (800 ng) de CT-1 foram tratadas com DNase I Amplification Grade (Invitrogen, Ref. 18068-015, CA, USA) por 10 minutos em temperatura ambiente em um volume de reação de 10 μ L de acordo com as diretrizes do fabricante. Após a incubação, 1 μ L de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 25 mM;

Invitrogen) foi adicionado e aquecido a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, a síntese de cDNA foi realizada utilizando um kit de transcrição reversa de cDNA (Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Ref. 4368814, Foster City, CA). Uma mistura (10µL) contendo primers aleatórios, enzimas transcriptase reversa e desoxinucleotídeos foi adicionada a 11µL de cada amostra. As amostras foram então incubadas a 25°C durante 10 minutos, seguida da incubação a 37°C durante 2 horas e inativação da transcriptase reversa a 85°C durante 5 minutos. O cDNA foi armazenado a - 20°C até a análise quantitativa da reação em cadeia pela polimerase (qPCR).

2.11 Seleção e validação de pares de primers

Os genes selecionados fazem parte de três vias específicas na dinâmica do reconhecimento materno da prenhez, onde avaliou-se a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de PGs (PTGS2, AKR1B1, PTGES1, PTGES2 e PTGER4) e no RME (IFNT) pela técnica de RT-qPCR. Foram utilizados como genes de referência ACTB e RPS9. Na **Tabela 1**, estão apresentados os primers específicos para bovinos, símbolo do gene, número no GenBank, sequência de oligonucleotídeo forward (F) e reverse (R), comprimento (bp) e artigo de referência.

Tabela 1. Primers específicos para bovinos: símbolo do gene, número no GenBank, sequência de oligonucleotídeo forward (F) e reverse (R), comprimento (bp) e artigo de referência.

Símbolo do gene	Número no GenBank	Sequência (5'-3')	Comprimento (bp)	Referência
Processo metabólico dos eicosanóides				
PTGER4	NM_174589	F: CGATGAGTATTGAGCGCTACC R: AGCCCGCATACATGTAGGAG	237	Ulbrich et al., 2009
PTGES	NM_174443.2	F: GCTGCGGAAGAAGGCTTTTGCC R: GGGCTCTGAGGCAGCGTTCC	101	Oliveira et al., 2017
PTGS2	NM_174445.2	F: CCAGAGCTCTTCTCCTGTG R: GGCAAAGAATGCAAACATCA	161	Oliveira et al., 2017
PTGES2	NM_001166554.1	F: GTGGGCGGACGACTGGTTGG R: CGGAGGTGGTGCCTGCGTTT	192	Oliveira et al., 2017
AKR1B1	NM_001012519	F: ATACAAGCCGGCGTTAAC R: TGTCTGCAATCGCTTTGATC	188	Ulbrich et al., 2009
Reconhecimento da prenhez				
IFN- τ	NM_001015511	F: GCCCGAATGAACAGACTCTC R: CCATCTCCTGAGGAAGACCA	1313	Hughes et al., 2017
Controle endógeno				
RPS9	NM_001101152.2	F: GAGCTGGGTTTGTGCAAA R: GGTGAGGCGGACTTCT	65	Hughes et al., 2017
ACTB	NM_173979.3	F: GGATGAGGCTCAGACAAAGAGA R: TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	78	Bettegowda et al., 2006

Fonte: adaptado de Cordeiro *et al.*, (2023)

Os primers foram desenhados utilizando o recurso Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) do Centro Nacional para Biotecnologia da Informação (NCBI; (NCBI; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/index.cgi?ORGANISM=9913&INPUT_SEQUENCE=NM_173950.2&LINK_LOC=nucore; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=XM_005211921.4) ou obtidos a partir de prévias publicações. Todos os primers foram testados para sensibilidade e especificidade na análise convencional de qPCR em tempo real para verificar as condições de amplificação. Resumidamente, as reações foram realizadas em placas de 96 poços seladas com uma cobertura adesiva óptica MicroAmp (Life Technologies) utilizando o termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems Real-Time PCR System; Life Technologies, Frederick, MA, EUA). As reações foram conduzidas em um volume final de 10 µL usando 8 µL Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies). O termociclador foi programado para iniciar com uma etapa de retenção (95°C por 10 minutos), seguida por 40 ciclos consistindo de uma etapa de desnaturação (95°C por 15 segundos) e uma etapa de recozimento (60°C por 1 minuto). As curvas de dissociação foram obtidas por aumentos graduais na temperatura de 60 a 95°C. Os primers foram validados atendendo aos seguintes critérios: i) ter eficiência de amplificação entre 85 e 110%; ii) ausência de amplificação do controle negativo e iii) pico único na curva de dissociação e menor limiar do ciclo. As curvas padrão para cada primer foram validadas usando cinco diluições e réplicas progressivas. Isto foi conseguido utilizando um conjunto de amostras de cDNA de CT-1 em diluições de 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:160 e 1:320 (cDNA:H₂O); sendo 1:20 a diluição final utilizada.

2.12 Análises da expressão de transcrições

As CT-1 utilizadas para a avaliação da expressão relativa dos genes alvos foram coletadas em todos os grupos e em todos os tempos. A escolha das amostras de CT-1 a serem avaliadas por RT-qPCR foi baseada nos resultados obtidos por ELISA no meio de cultivo. Assim, optou-se por avaliar todos os grupos por RT-qPCR no tempo de 48 horas, e no grupo controle e AL avaliou-se os tempos de 24 e 72 horas. A análise da abundância relativa dos transcritos foi realizada utilizando primers específicos para bovinos, todos pré-selecionados. As reações foram realizadas em triplicata. A eficiência do qPCR foi determinada e os valores do ciclo de quantificação (C_q) por amostra utilizando o software LingRegPCR. A expressão dos genes RPS9, ACTB, 18S, SSHA e YWHAZ foi testada em amostras CT-1, e os dois genes mais estáveis para normalização (RPS9 e ACTB), selecionados pelo software geNorm, foram utilizados como genes de referência. A expressão dos genes alvos foi avaliada por qPCR e normalizada em relação à média

geométrica dos genes de referência usando o método comparativo limiar do ciclo delta (Ct) (PFAFFL, 2001).

2.13 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, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) considerando o efeito principal do grupo de tratamento e o efeito aleatório das replicas de cultura. Cada poço foi considerado a unidade experimental. Os dados de abundância dos transcritos foram analisados por ANOVA usando o efeito fixo do tratamento. Os resultados estão apresentados com médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para todas as análises, a significância foi considerada quando $P \leq 0,05$. Considerou-se tendência quando o valor de $0,05 > P \leq 0,1618$.

3 RESULTADOS

3.1 Efeitos da suplementação com CLA, AL, AO e EPA + DHA na síntese de PGE2, PGF2 α e na razão PGE2/ PGF2 α em CT-1

Concentrações de PGE2. Conforme ilustrado na **Figura 4**, observou-se que no tempo de **5 min (Hora 0)** não houve diferença entre o grupo controle ($22,32 \pm 3,83$ ng/mL) e os grupos 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). Com **24 horas**, observou-se que o AL foi capaz de aumentar ($P < 0,001$) a síntese de PGE2 comparado a todos os demais grupos, efeito também observado com **48 horas**. No tempo de **72 horas** o AL não diferiu do AO ($310,58 \pm 81,54$ e $187,16 \pm 37,65$ ng/mL, respectivamente), porém o AL promoveu maiores ($P < 0,0001$) concentrações de PGE2 comparado aos grupos Controle, CLA, EPA + DHA ($310,58 \pm 81,54$; $97,40 \pm 22,40$; $71,62 \pm 14,82$ e $49,24 \pm 19,71$ ng/mL, respectivamente).

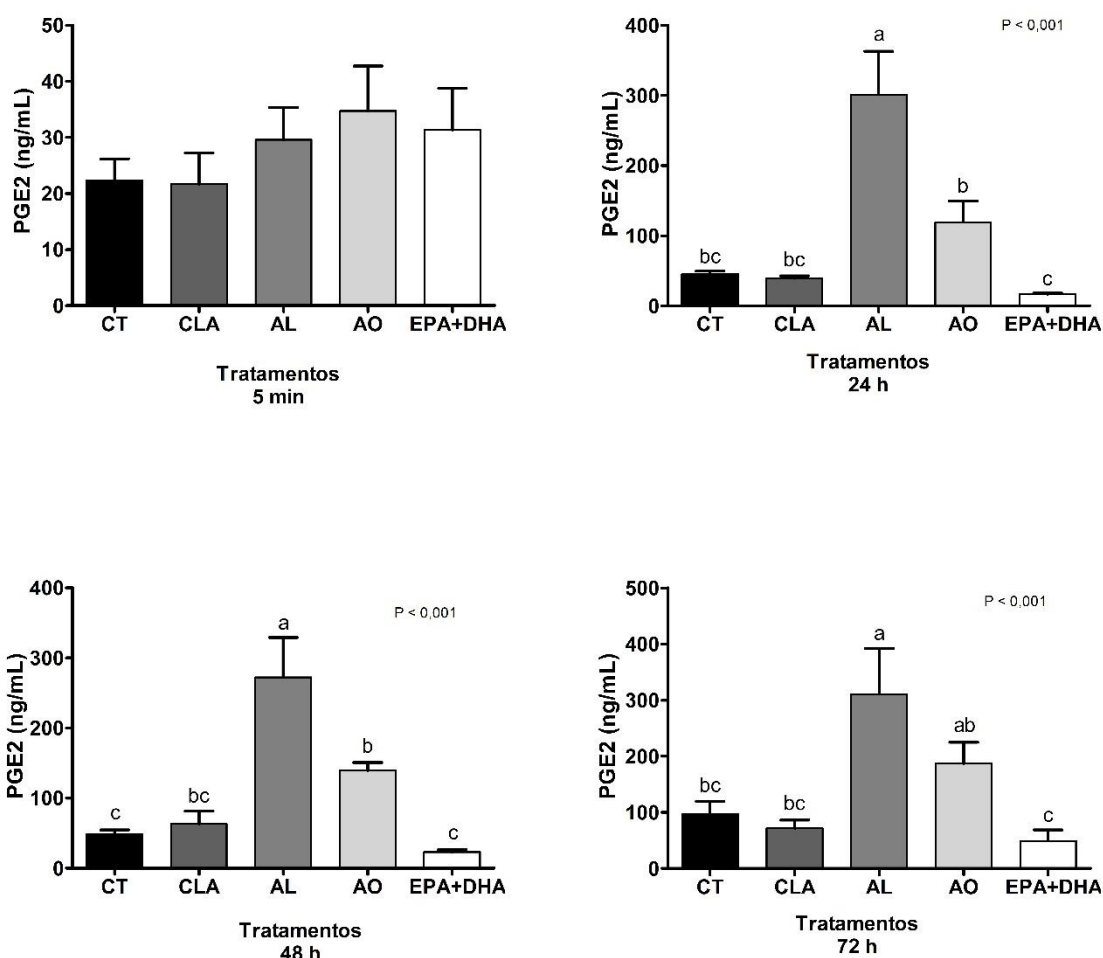


Figura 4. Efeito da suplementação com 100 μ M de CLA, 100 μ M de AL, 100 μ M de AO, 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA e um grupo controle (CT) no meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na síntese de PGE2 por 5 min, 24, 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

a,b,c Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Concentrações de PGF2 α . Conforme ilustrado na **Figura 5**, observou-se que no tempo de **5 min (0 hora)** não houve diferença entre o grupo controle ($6,27 \pm 0,97$ ng/mL) e os grupos que foram suplementados com 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** observou-se maior ($P < 0,0001$) síntese de PGF2 α para os grupos AL e AO ($151,67 \pm 17,01$ e $105,71 \pm 30,86$ ng/mL respectivamente) comparados aos grupos grupo controle, CLA e EPA + DHA ($45,89 \pm 9,86$; $18,89 \pm 3,29$ e $7,28 \pm 0,54$ ng/mL, respectivamente). Em relação ao tempo de **48 horas**, observou-se maior ($P < 0,0001$) síntese de PGF2 α no grupo AO ($159,41 \pm 43,67$ ng/mL) comparado ao controle, CLA e EPA + DHA ($80,10 \pm 19,10$; $19,18 \pm 3,55$ e $8,44 \pm 0,62$ ng/mL,

respectivamente). No tempo de **72 horas**, observou-se nos grupos AL e AO maior ($P < 0,0001$) síntese de $\text{PGF2}\alpha$ ($317,67 \pm 55,52$ e $200,81 \pm 20,39$ ng/mL, respectivamente) 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 ($P < 0,0001$) síntese de $\text{PGF2}\alpha$ quando comparado ao grupo controle ($11,07 \pm 0,71$ vs. $98,77 \pm 21,81$ ng/mL respectivamente).

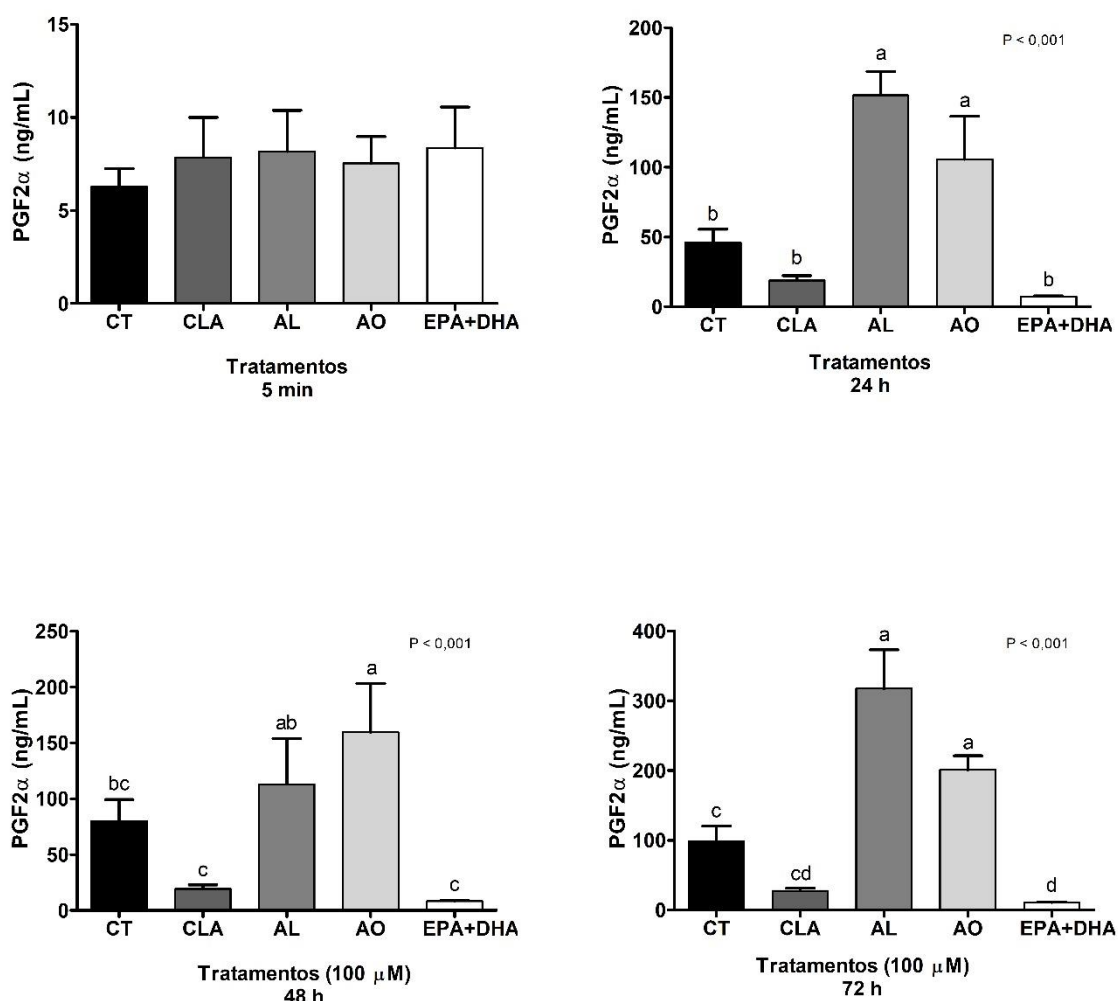


Figura 5. Efeito da suplementação com 100 μM de CLA, 100 μM de AL, 100 μM de AO, 50 μM de EPA + 50 μM de DHA e um grupo controle (CT) no meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ por 5 min, 24, 48 ou 72 horas, mensurada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

^{a,b,c} Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Razão $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$. Conforme ilustrado na **Figura 6**, no tempo de **5 minutos (0 hora)** a razão $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$ foi maior ($P = 0,0007$) no grupo AO comparado ao CLA ($5,22 \pm 1,57$ vs. $2,81 \pm 0,34$). No tempo de **24 horas**, os grupos CLA, AL e EPA + DHA apresentaram maior

($P = 0,0007$) razão comparados ao grupo controle ($2,23 \pm 0,31$; $2,04 \pm 0,40$ e $2,32 \pm 0,31$ vs. $1,11 \pm 0,15$ respectivamente). No tempo de **48 horas**, o grupo CLA e EPA + DHA apresentou maior ($P = 0,0007$) razão comparados quando comparados ao grupo controle e AO ($3,16 \pm 0,68$ e $2,77 \pm 0,50$ vs $0,74 \pm 0,15$ e $1,17 \pm 0,30$, respectivamente). No tempo de **72 horas**, a razão foi maior ($P = 0,0007$) no grupo EPA + DHA comparado ao controle, AL e AO ($4,19 \pm 1,44$ vs. $1,09 \pm 0,18$; $0,95 \pm 0,15$ e $0,90 \pm 0,09$, respectivamente).

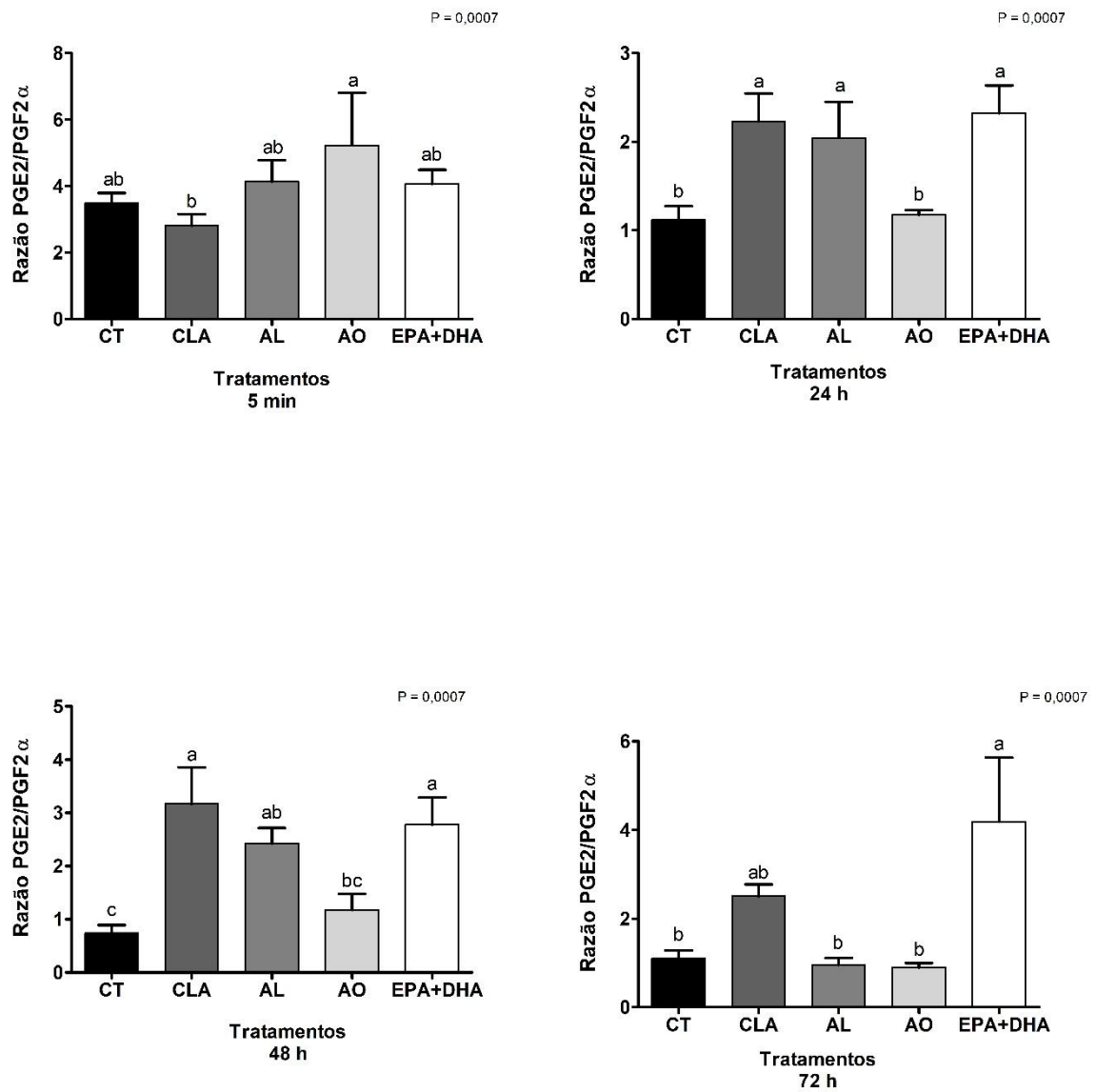


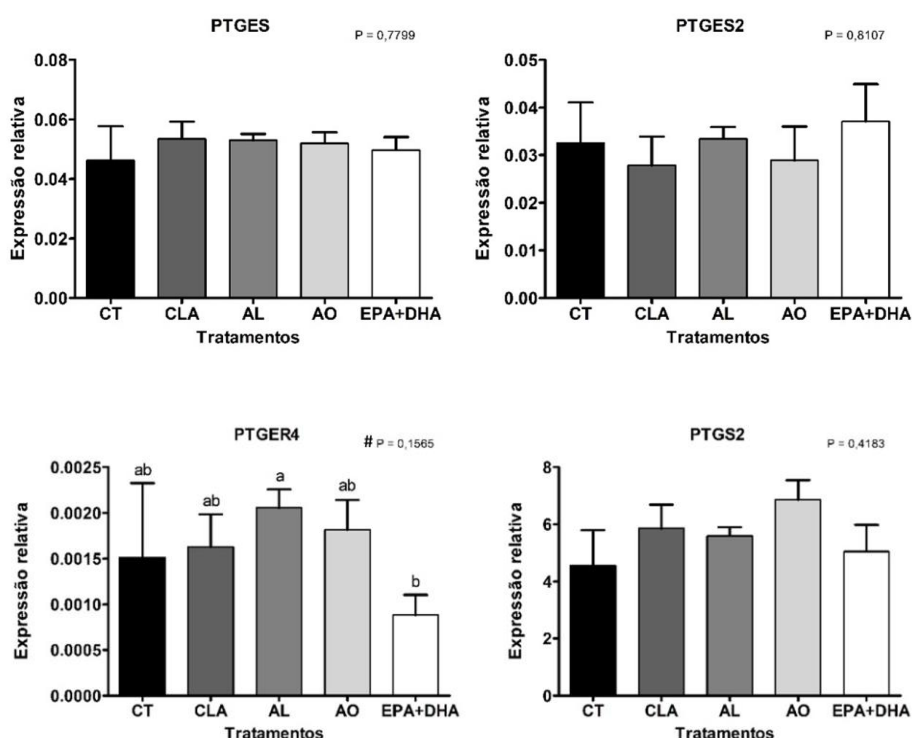
Figura 6. Efeito da suplementação com 100 μ M de CLA, 100 μ M de AL, 100 μ M de AO, 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA e um grupo controle (CT) no meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* na razão PGE2/PGF2 α por

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).

^{a,b,c} Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

3.2 Efeitos da suplementação com CLA, AL, AO e EPA + DHA nos transcritos PTGES, PTGES2, PTGER4, PTGS2 e AKR1B1 com 48 horas de cultivo em CT-1

A **Figura 7** ilustra a expressão relativa dos transcritos PTGES, PTGES2, PTGER4, PTGS2 e AKR1B1 no tempo de **48 horas**. Não foi observada diferenças entre os grupos para PTGES ($P = 0,7799$), PTGES2 ($P = 0,8107$) e PTGS2 ($P = 0,4183$). Foi observada uma tendência na abundância de PTGR4 ser maior ($P = 0,1565$) no grupo AL quando comparado ao EPA + DHA ($0,0020 \pm 0,0002$ vs $0,0008 \pm 0,0002$; respectivamente). Também foi observada uma tendência na abundância de AKR1B1 ser maior ($P = 0,1618$) no grupo AO quando comparado ao CLA ($0,2625 \pm 0,0265$ vs $0,1512 \pm 0,0314$; respectivamente).



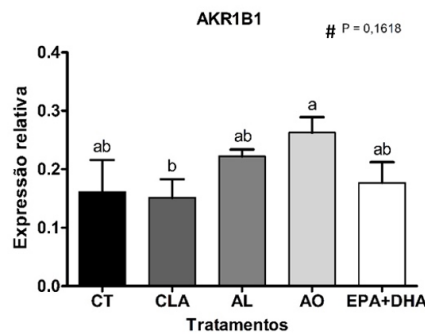


Figura 7. Expressão de transcrito para PTGES, PTGES2, PTGER4, PTGS2 e AKR1B1, calculada pela expressão relativa aos genes referência ACTB e RPS9, após suplementação do meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* com suplementação de 100 μ M de CLA, 100 μ M de AL, 100 μ M de AO, 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA e um grupo controle (CT) no tempo de 48 horas. Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) # ^{a,b} Letras diferentes indicam que houve uma tendência entre os tratamentos.

3.3 Efeito da suplementação com AL no transcrito PTGS2 relacionados a síntese de PGs com 72 horas de cultivo em CT-1

Conforme ilustrado na **Figura 8**, com 72 horas de cultivo observou-se uma maior ($P = 0,0044$) expressão relativa de PTGS2 no grupo AL comparado ao controle ($7,4253 \pm 0,5671$ vs. $4,4689 \pm 0,4454$).

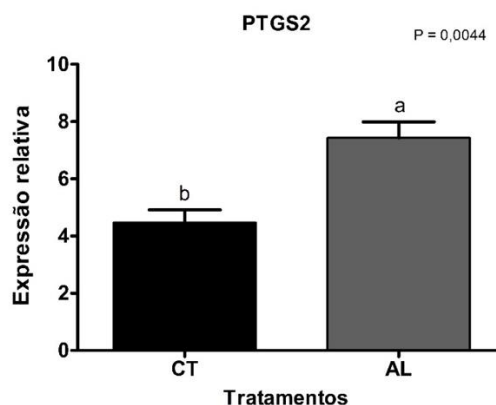


Figura 8. Expressão do transcrito PTGS2, calculado pela expressão relativa aos genes referência ACTB e RPS9, após suplementação do meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* com suplementação de 100 μ M de AL e um grupo controle (CT) no tempo de 72 horas. Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ^{a,b} Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

3.4 Efeitos da suplementação com AL na expressão de IFNT nos tempos de 24, 48 e 72 horas de cultivo e CLA, AL, AO e EPA + DHA no tempo de 48 horas de cultivo em CT-1

No tempo de **48 horas** o transcrito foi avaliado para todos os grupos, e com 24 e 72 horas apenas no grupo controle e AL. Conforme ilustrado na **Figura 9**, observou-se maior expressão relativa para o IFNT no grupo AL quando comparado ao controle nos tempos de 24 horas ($0,1374 \pm 0,0090$ vs. $0,0990 \pm 0,0125$ respectivamente; $P = 0,0216$) e 72 horas ($0,2336 \pm 0,0126$ vs. $0,1293 \pm 0,0103$ respectivamente; $P = 0,0031$). No tempo de **48 horas**, a expressão de IFNT foi maior nos grupos AL, AO, EPA + DHA quando comparados ao controle ($0,1699 \pm 0,0294$; $0,2989 \pm 0,1391$ e $0,2332 \pm 0,0438$ vs. $0,0899 \pm 0,0179$ respectivamente; $P = 0,0103$).

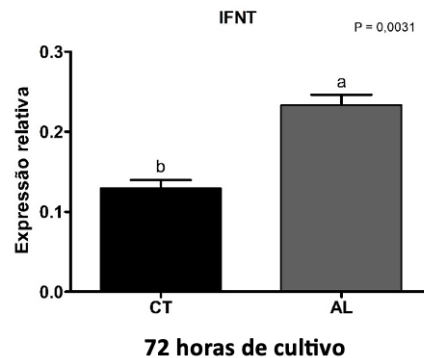
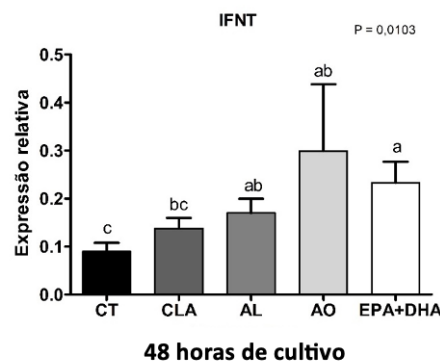
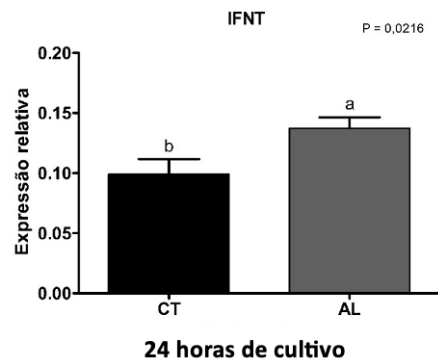
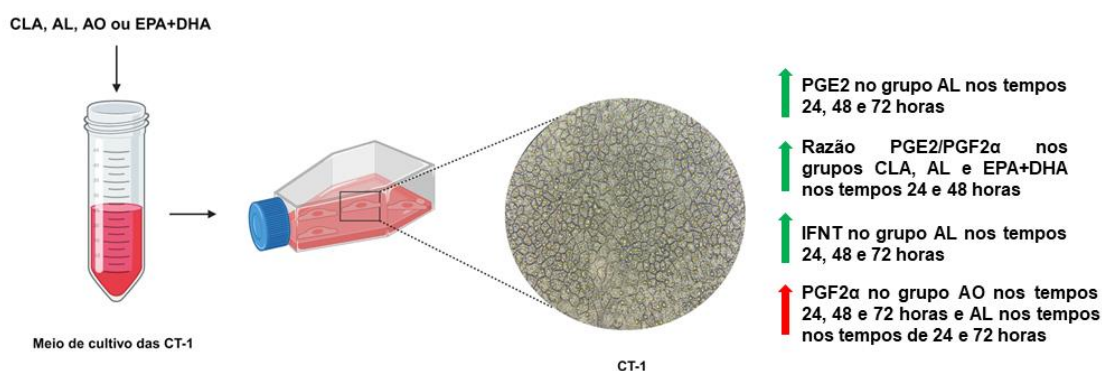


Figura 9. Expressão de transcrito para IFNT, calculada pela expressão relativa aos genes referência ACTB e RPS9, após suplementação do meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* com suplementação do meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* com suplementação de 100 μ M de CLA, 100 μ M de AL, 100 μ M de AO, 50 μ M de EPA + 50 μ M de DHA e um grupo controle (CT) no tempo de 48 horas no tempo de 24, 48 e 72 horas. Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM)

^{a,b,c} Letras diferentes indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Na **Figura 10**, encontra-se representada uma sumarização dos resultados



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 10. Sumarização dos resultados apresentados após suplementação do meio de cultivo de CT-1 cultivadas *in vitro* com CLA, AL, AO e EPA + DHA. O grupo AL proporcionou uma maior concentração de PGE2 nos tempos de 24, 48 e 72 horas de cultivo, os grupos CLA, AL e EPA + DHA tiveram suas razões aumentadas nos tempos de 24 e 48 horas, os transcritos IFNT foi maior no grupo AL nos tempos 24, 48 e 72 horas de cultivo, por fim as concentrações de PGF2 α foi maior no grupo AO nos tempos de 24, 48 e 72 horas e AL nos tempos de 24 e 72 horas de cultivo.

4. DISCUSSÃO

Nesse estudo, nossos dados sustentam que as CT-1 de fato sintetizam PGF2 α e PGE2 e que tal biossíntese é modulada de forma diferente a depender do tipo de ácido graxo adicionado ao meio de cultivo e o tempo de exposição a esses ácidos graxos. Observa-se que a produção de PGE2 é maior que a de PGF2 α . De fato, Hwang *et al.* (1998) demonstraram que antes do dia 12 do desenvolvimento embrionário a produção de PGE2 é predominante. As CT-1 que foram utilizadas no estudo são oriundas de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com 10 a 11 dias de desenvolvimento, dessa maneira era esperado uma maior concentração de PGE2 em relação a de PGF2 α , fato que também foi observado no referido estudo. No grupo controle as concentrações de PGE2 variaram de $22,32 \pm 3,83$ ng/mL (5 minutos) a $97,40 \pm 22,40$ ng/mL

(72 horas), enquanto as concentrações de PGF2 α variaram de $6,27 \pm 0,97$ ng/mL (5 minutos) $98,77 \pm 21,81$ ng/mL (72 horas). Conforme observado por Boruszewska *et al.* (2019), os embriões bovinos já no início de seu desenvolvimento, a partir de duas células apresentam quantidades diferentes de PGE2 sintases e são capazes de sintetizar PGE2 (BORUSZEWSKA *et al.*, 2019). Nossos dados sustentam que a produção de PGE2 pelo embrião é, ao menos em parte, de responsabilidade das células trofoblásticas, uma vez que tais células fazem parte da composição celular dos embriões. O AL, utilizado no presente estudo nos tempos de 24, 48 e 72 horas, foi capaz de aumentar a síntese de PGE2. Conforme descrito por Niringiyumukiza, Cai e Xiang (2018), a PGE2 atua no desenvolvimento embrionário aumentando a proliferação das células embrionárias e trofoblásticas permitindo a sobrevivência da implantação após a transferência de embriões.

Moussavi *et al.* (2013), utilizando a suplementação com CLA em células epiteliais endometriais bovinas em concentrações acima de 50 μ M, durante 24 horas de cultivo, verificaram redução nas concentrações de PGF2 α e PGE2. No presente estudo, o CLA na concentração de 100 μ M em todos os tempos testados não foi capaz de reduzir as concentrações de PGE2 e PGF2 α , entretanto, o CLA proporcionou um aumento da razão PGE2/PGF2 α nos tempos de 24 e 48 horas em CT-1.

Cheng *et al.* (2003) demonstraram que a suplementação de CLA em células endometriais ovinas reduziu a concentração de PGF2 α de forma dose dependente, além disso, doses baixas de CLA (20 μ M) aumentaram a geração de PGE2 proporcionando, portando, maior razão PGE2/PGF2 α . Em nosso estudo não verificamos um aumento na geração de PGE2 e PGF2 α quando utilizamos a suplementação com CLA, contudo, a diminuição da síntese de PGF2 α foi mais acentuada, proporcionando maior razão PGE2/PGF2 α , corroborando com os dados do referido autor. A maior razão de PGE2/PGF2 α é mais importante do que suas concentrações absolutas no contexto reprodutivo de bovinos (BAZER, OTT e SPENCER, 1998).

No presente estudo investigamos o impacto da suplementação com diferentes AGs em modular a expressão do transcrito para IFNT, principal molécula envolvida no RMP, nas CT-1. Um importante achado é que o AL foi capaz de aumentar a expressão do transcrito para IFNT nos tempos de 24, 48 e 72 horas, nossos dados sustentam que de fato o AL pode beneficiar o RMP, uma vez que ele proporcionou aumento da razão PGE2/PGF2 α e aumento dos transcritos para IFNT. A PGE2 aliada ao IFNT constitui moléculas chaves para o RMP. Além das ações anti-luteolíticas, o IFNT atua no endométrio aumentando a expressão de genes específicos, denominados de ISGs. Esses genes regulam a receptividade uterina para a implantação e

desenvolvimento do conceito (STAGGS et al., 1998; SPENCER et al., 2004). O grupo tratado com AL na concentração de 100 μM se destaca em relação ao aumento da síntese de PGE2 onde somente no tempo de 5 minutos de exposição não houve um aumento, todos os demais tempos testados tiveram a síntese de PGE2 maior em relação ao controle, após 48 horas de exposição ao tratamento a geração de PGE2 foi maior em relação ao controle, não tendo a síntese de PGF2 α modificada, entretanto o aumento na síntese de PGE2 foi o suficiente para proporcionar uma maior razão PGE2/ PGF2 α após 48 horas de exposição. O AL utilizado no presente estudo nos tempos de 24, 48 e 72 horas foi capaz de aumentar a síntese de PGE2. A PGE2 sintetizada pelo embrião integra-se ao histotrofo que envolve e nutre o embrião no ambiente uterino. A liberação de PGE2 pelo embrião é uma forma de comunicação materno-fetal. No ambiente uterino, a sinalização de PGE2 pode ocorrer através de receptores EP2, abundantes no útero e na placenta (SMOCK et al., 1999). Assim, um aumento na produção de PGE2 embrionária pode tornar a sinalização mais eficiente no momento do estabelecimento da prenhez.

Foi constatado que a adição do AL nas concentrações de 50 e 100 μM no meio de maturação de oócitos bovinos, não exerceu efeito sobre a síntese de PGF2 α , no entanto, na concentração de 100 μM aumentou de modo significativo a concentração de PGE2 e a razão de PGE2/PGF2 α , quando a taxa de embriões foi avaliada houve menor porcentagem de embriões clivados e de blastocistos (MAREI; WATHES; FOULADI-NASHTA, 2010). A expressão de transcritos para PTGS2 no grupo AL nos tempos de 24, 48 e 72 horas foi maior em relação ao controle. A enzima PTGS2 medeia a conversão do AA em PGH2. O aumento na expressão de PTGS2, resulta em uma maior quantidade de enzimas que fazem essa conversão, resultando em uma quantidade maior de PGH2 disponível para ser metabolizada em PGE2 ou PGF2 α .

No grupo CLA no tempo de 48 horas a expressão de transcritos para AKR1B1 tendeu a diminuir em relação ao grupo AO. Maldonado *et al.*, (2023), suplementando células trofoblásticas bovinas com diferentes concentrações de CLA por 24 horas, relatou redução da síntese de PGE2 e PGF2 α em toda as doses de CLA utilizadas quando comparado com o controle. A mesma autora verificou que a suplementação com CLA foi capaz reduzir os transcritos para PTGES2, PTGER4 e MMP9. Em nosso estudo, os AGs não reduziram as transcrições para PTGES2, entretanto houve tendência a redução dos transcritos para PTGER4 no grupo EPA + DHA em relação ao grupo AO, já o CLA que proporcionou uma redução nos transcritos para PTGER4 no trabalho da autora anterior na concentração de 100 μM , no presente trabalho utilizando a mesma concentração esse padrão não se repetiu. Possivelmente a

tendência de redução na expressão do transcrito para PTGER4 receptor da PGE2 no grupo EPA + DHA em relação ao grupo AO não seria prejudicial a ação da PGE2, uma que vez ainda existem outros três receptores para a PGE2 (PTGER1, PTGER2 e PTGER3).

Moussavi *et al.* (2013), utilizando a suplementação com CLA em células epiteliais endometriais bovinas em concentrações acima de 50 μ M, durante 24 horas de cultivo, verificaram redução nas concentrações de PGF2 α e PGE2. No presente estudo, o CLA na concentração de 100 μ M em todos os tempos testados não foi capaz de reduzir as concentrações PGF2 α em CT-1, assim como não reduziu as concentrações de PGE2, entretanto, o CLA proporcionou um aumento da razão PGE2/PGF2 α nos tempos de 24 e 48 horas. Em bovinos, um aumento da proporção PGE2/PGF2 α para o estabelecimento da prenhez é requerido, uma vez que fornece apoio a função lútea para o desenvolvimento e implantação adequados do embrião (AROSH *et al.*, 2004; PARENT *et al.*, 2002). E esse aumento da razão PGE2/PGF2 α foi observado nos grupos tratados com CLA, AL e EPA + DHA após 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos e no grupo tratados com EPA + DHA após 72 horas de exposição aos tratamentos, esse aumento da razão pode favorecer a comunicação bioquímica que existe entre o embrião e o útero materno. Segundo Sponchiado *et al.* (2019), embrião possui a capacidade de alterar a composição bioquímica do ambiente uterino no qual ele está inserido, e essas mudanças possivelmente atuam para direcionar o ambiente uterino a receptividade do embrião.

Gross e Williams (1988) relataram que as células placentárias bovinas foram capazes de converter PGF2 α em PGE2. No presente estudo, a razão de PGE2/PGF2 α foram aumentadas pela suplementação de AGs pelo grupo EPA + DHA nos tempos de 24, 48 e 72 horas de exposição. Para além do aumento líquido de PGE2, uma menor inibição de PGE2 do que de PGF2 α também contribuiu para o aumento das proporções, essa diminuição sutil das concentrações de PGF2 α pode estar associada a suplementação com AGs, e também talvez as CT-1 tenham a capacidade de converter PGF2 α em PGE2 a partir de estímulos ocasionados pelos AGs.

No estudo conduzido por Mattos *et al.* (2003), quando as células endometriais bovinas (BEND) foram tratadas com EPA ocorreu inibição da síntese de PGF2 α tendo um efeito dose dependente, a concentração de 10 a 20 μ M inibiu a liberação de PGF2 α quando tratadas por 24 horas. No presente estudo quando as CT-1 foram tratadas com AL houve um aumento das duas prostaglandinas, e quando foi utilizada a mistura de EPA + DHA a síntese de PGE2 não foi alterada e a PGF2 α foi diminuída somente após 72 horas de exposição ao tratamento.

Na via metabólica das prostaglandinas, as enzimas COX-1 e COX-2 são responsáveis por um papel crucial ao mediar a conversão do AA em prostaglandina intermediária H₂ (PGH₂) (CHENG *et al.*, 2003). Uma vez que, tanto a PGF₂ α quanto a PGE₂ são derivadas do PGH₂, a concentração específica de cada prostaglandina pode ser modulada pela disponibilidade de PGH₂ e também pela atividade específica das enzimas isomerase e sintase associadas à produção de PGF e PGE (MOUSSAVI *et al.*, 2013). Assim, a quantidade e a razão de PGF₂ α e PGE₂ produzidas dependem não apenas da atividade das COX, mas também da especificidade das enzimas isomerase e sintase de PGF e PGE. Os AGs possivelmente podem estar exercendo um importante papel na via metabólica das prostaglandinas, seja pela inibição das enzimas COX-1 e COX-2 ou por competição com os sítios de ligação. Nossos dados apontam que pelo menos em parte a modulação da síntese de PGs pode estar associada a modulação das enzimas envolvidas na cascata de síntese das PGs, uma vez que a expressão de transcritos para PTGS2 foi aumentada no grupo AL no tempo de 72 h, e a concentração de PGE₂ também foi maior no referido grupo.

A adição de lipídios no meio de cultura para produção de embriões *in vitro* alteram os perfis de ácidos graxos em oócitos e embriões bovinos, deste modo as CT-1 possuem essa capacidade de incorporar AGs exógenos, onde esses AGs atuam em diversas vias metabólicas, inclusive das PGs. Em conjunto, esses dados indicam que linhagens celulares de diferentes origens respondem de forma diferente aos ácidos graxos exógenos e ainda existem grandes discrepâncias entre os estudos que utilizaram a suplementação de tecidos reprodutivos *in vitro* ou *in vivo* com AGs, embora as razões desta inconsistência não tenham sido totalmente elucidadas, existem diversos fatores, como diferença nas condições de cultura, fatores técnicos, espécie, genótipo e dosagem dos AGs utilizados, tempo de exposição aos tratamentos podem estar envolvidos.

5 CONCLUSÃO

A suplementação com AL no meio de cultivo de CT-1 aumenta síntese de PGE₂ com 24, 48 e 72 horas de cultivo; aumenta síntese de PGF₂ α com 24 e 72 horas de cultivo e aumenta razão PGE₂/PGF₂ α com 24 e 48 horas e aumenta a abundância relativa dos transcritos PTGS2 com 72 horas de cultivo e de IFNT com 24, 48 e 72 horas de cultivo, podendo ser um grande aliado no RMP.

ÁCIDOS GRAXOS ADICIONADOS AO MEIO DE CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* ALTERA A ABUNDÂNCIA DE TRANSCRITOS ENVOLVIDOS NO RECONHECIMENTO MATERNO FETAL

Lucas de Oliveira Bezerra¹, Laura Chuba Machado Rolniche², Maria Eduarda Rocha Pinto², Emily Silva do Nascimento², Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado³, Adriano Felipe Mendes¹, Amanda Guimarães da Silva⁴, Isabela Rio Feltrin¹, Alan Dale Ealy⁵, Vitor Mercadante⁵, Guilherme Pugliesi⁴, Claudia Maria Bertan Membrive^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP-IBB), Botucatu, São Paulo, Brazil, 18618-68

²Universidade Estadual Paulista (UNESP-FCAT), Dracena, São Paulo, Brazil, 17900-000

³University of Florida, Gainesville, Florida, EUA, FL 32611

⁴Universidade de São Paulo (USP-FMVZ), Pirassununga, São Paulo, Brazil, 13635-900

⁵Department of Animal and Poultry Sciences, Virginia Tech, Blacksburg, EUA, VA 24061

Corresponding author:

Claudia Maria Bertan Membrive. Comandante João Ribeiro de Barros Road (SP 294), Km 651, São Paulo State University (UNESP), Dracena, SP, Brazil, 17900-000

Tel: + 55 18 38218150

e-mail: claudia.bertan@unesp.br

<https://orcid.org/0000-0003-4211-0649>

Researcher ID:C-2076-2016

RESUMO

Em fêmeas bovinas de corte a mortalidade embrionária precoce (MEP), ocasionada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP) entre os dias 15 e 17 após a fecundação, constitui uma das maiores causas de falhas reprodutivas. A $\text{PGF2}\alpha$ foi reconhecida como a principal molécula luteolítica em fêmeas ruminantes. A PGE2 , determina efeitos anti-luteolíticos e luteotróficos que favorecem o RMP. Ambas as prostaglandinas são produzidas pelo endométrio materno, embrião e conceito. O RMP pode ser beneficiado pelo aumento da síntese de PGE2 , diminuição na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e aumento da razão $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$. A hipótese é que a suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA), ácido linoleico (AL), ácido oleico (AO) ou ácido eicosapentaenóico (EPA) associado ao ácido docosahexaenóico (DHA) no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* altera a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de PGE2 e $\text{PGF2}\alpha$ favorecendo o RMP, além de favorecer o nível de metilação do DNA nos embriões. Para tanto, objetivou-se avaliar em embriões bovinos produzidos *in vitro* os efeitos da suplementação com 100 μM CLA, 100 μM AL, 100 μM AO ou 50 μM EPA + 50 μM DHA na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas (PTGS2, PTGES, AKR1B1), no RMP (IFNT), no nível de metilação do DNA (DNMT3A) e na taxa de produção embrionária com 7 e 9 dias de cultivo. Em fêmeas Nelore abatidas, folículos ovarianos com 2 a 10 mm de diâmetro foram aspirados utilizando uma seringa de 10 mL acoplada a agulha 18G. Oócitos com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células do *cumulus* foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em gotas de 100 μL contendo meio MIV com 5% de soro fetal bovino (SFB) sob óleo mineral, em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO_2 por 24 horas. Após a MIV, os oócitos foram submetidos a fertilização *in vitro* (FIV), com sêmen de único touro Nelore, durante 18 horas nas mesmas condições da MIV (D0 = dia da FIV). Após a FIV, os prováveis zigotos ($n = 1117$) foram alocados em placas de 4 poços com 700 μL de meio de cultivo/poço com 1,25% de SFB, acrescidos dos seguintes tratamentos: 100 μM de ácido linoleico conjugado (Grupo CLA; $n = 223$ oócitos); 100 μM de ácido linoleico (Grupo AL; $n = 227$); 100 μM de ácido oleico (Grupo AO; $n = 225$) ou 50 μM de ácido eicosapentaenóico - EPA + 50 μM ácido docosahexaenóico - DHA (Grupo EPA + DHA; $n = 219$); além de meio não acrescido de AG (Grupo Controle; $n = 223$). Foi realizado um total de 8 repetições. A expressão relativa dos genes alvos (PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT e DNMT3A) foram determinadas pela técnica de RT-qPCR. A produção embrionária foi avaliada no D7 e D9. A análise estatística foi realizada utilizando o software PROC MIXED do SAS. Não foi observada diferença entre os grupos para a expressão relativa do PTGES ($P = 0,5496$) e AKR1B1 ($P = 0,1794$). A expressão relativa de PTGS2 foi maior ($P = 0,0286$) no grupo AO comparado ao grupo controle e AL ($1,1090 \pm 0,0833$ vs $0,7109 \pm 0,0748$ e $0,7068 \pm 0,0577$; respectivamente) e o grupo CLA não diferiu dos demais grupos. A expressão de IFNT tendeu ($P = 0,1148$) a ser maior nos grupos CLA e AO comparado ao controle ($0,1544 \pm 0,0293$ e $0,1750 \pm 0,0465$ vs $0,0344 \pm 0,0073$ respectivamente). A expressão de DNMT3A tendeu a ser maior ($P = 0,0797$) nos grupos CLA e AO comparado ao controle ($0,0009 \pm 0,0001$ e $0,0012 \pm 0,0005$ vs $0,0001 \pm 0,00008$ respectivamente). Conclui-se que a suplementação com AO aumentou a abundância de transcrito para PTGS2 e o CLA e AO tenderam a aumentar os transcritos para IFNT e DNMT3A, enquanto a suplementação com EPA + DHA afetou negativamente as taxas de produção embrionária.

Palavras chaves: ômega-3, ômega-6, ômega-9, prostaglandinas, prenhez, bovino.

ABSTRACT

In beef cattle, early embryonic mortality (MEP), caused by failures in maternal recognition of pregnancy (RMP) between days 15 and 17 after fertilization, is one of the biggest causes of reproductive failure. PGF2 α has been recognized as the main luteolytic molecule in female ruminants. PGE2 determines anti-luteolytic and luteotrophic effects that favor RMP. Both prostaglandins are produced by the maternal endometrium, embryo and conceptus. RMP can benefit from an increase in PGE2 synthesis, a decrease in PGF2 α synthesis and an increase in the PGE2/PGF2 α ratio. The hypothesis is that supplementation with conjugated linoleic acid (CLA), linoleic acid (LA), oleic acid (OA) or eicosapentaenoic acid (EPA) associated with docosahexaenoic acid (DHA) in the culture medium of bovine embryos produced in vitro alters the expression of transcripts involved in the biosynthesis of PGE2 and PGF2 α favoring RMP, in addition to favoring the level of DNA methylation in embryos. To this end, the objective was to evaluate in bovine embryos produced in vitro the effects of supplementation with 100 μ M CLA, 100 μ M LA, 100 μ M OA or 50 μ M EPA + 50 μ M DHA on the expression of transcripts involved in the biosynthesis of prostaglandins (PTGS2, PTGES, AKR1B1), RMP (IFNT), DNA methylation level (DNMT3A) and embryonic production rate at 7 and 9 days of culture. In slaughtered Nelore females, ovarian follicles measuring 2 to 10 mm in diameter were aspirated using a 10 mL syringe attached to an 18G needle. Oocytes with homogeneous cytoplasm and multiple layers of cumulus cells were subjected to in vitro maturation (IVM) in 100 μ L drops containing MIV medium with 5% fetal bovine serum (FBS) under mineral oil, in an incubator at 38.5°C in an atmosphere humidified at 5% CO₂ for 24 hours. After IVM, the oocytes were subjected to in vitro fertilization (IVF), with semen from a single Nelore bull, for 18 hours under the same conditions as IVM (D0 = day of IVF). After IVF, probable zygotes (n = 1117) were allocated to 4-well plates with 700 μ L of culture medium/well with 1.25% FBS, plus the following treatments: 100 μ M conjugated linoleic acid (Group CLA; n = 223 oocytes); 100 μ M linoleic acid (Group LA; n = 227); 100 μ M oleic acid (Group OA; n = 225) or 50 μ M eicosapentaenoic acid - EPA + 50 μ M docosahexaenoic acid – DHA (Group EPA + DHA; n = 219); in addition to medium without AG (Control Group; n = 223). A total of 8 repetitions were performed. The relative expression of target genes (PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT and DNMT3A) were determined by the RT-qPCR technique. Embryo production was evaluated on D7 and D9. Statistical analysis was performed using the SAS PROC MIXED software. No difference was observed between groups for the relative expression of PTGES (P = 0.5496) and AKR1B1 (P = 0.1794). The relative expression of PTGS2 was higher (P = 0.0286) in the OA group compared to the control and LA groups (1.1090 ± 0.0833 vs 0.7109 ± 0.0748 and 0.7068 ± 0.0577 ; respectively) and the CLA group did not differ from the other groups. IFNT expression tended (P = 0.1148) to be higher in the CLA and OA groups compared to the control (0.1544 ± 0.0293 and 0.1750 ± 0.0465 vs 0.0344 ± 0.0073 respectively). DNMT3A expression tended to be higher (P = 0.0797) in the CLA and OA groups compared to the control (0.0009 ± 0.0001 and 0.0012 ± 0.0005 vs 0.0001 ± 0.00008 respectively). It is concluded that supplementation with OA increased the transcript abundance for PTGS2 and CLA and OA tended to increase transcripts for IFNT and DNMT3A, while supplementation with EPA + DHA negatively affected embryonic production rates.

Key words: omega-3, omega-6, omega-9, prostaglandins, pregnancy, bovine.

1 INTRODUÇÃO

A transferência de embriões em tempo fixo (TETF) aliada à produção *in vitro* de embriões (PIVE) constituem biotécnicas poderosas na rápida multiplicação de matrizes geneticamente expoentes. De acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) 68,7% dos embriões do mundo são produzidos por PIVE e destes 73,2% são transferidos a fresco, sem prévio congelamento, por TETF. No Brasil, a produção anual de embriões bovinos teve um aumento de 800% ao longo da última década (VIANA, 2019). Atualmente, o Brasil possui representatividade mundial na PIVE na espécie bovina, responsável por 70% do total de embriões gerados no mundo. Entretanto, a metodologia da PIVE ainda apresenta limitações, visto que somente 40 a 50% dos oócitos maturados e fertilizados *in vitro* atingem o estágio de blastocisto (RIZOS *et al.*, 2002).

Após a TETF nas receptoras, as taxas de concepção dificilmente superam 50%. Um dos principais fatores que comprometem o êxito da prenhez em fêmeas bovinas de corte é a mortalidade embrionária precoce (MEP), ocasionada por falhas no reconhecimento materno da prenhez (RMP), especificamente no período compreendido entre 15 e 17 dias após a fecundação (BINELLI *et al.*, 2001). Para o sucesso no RMP, o conceito (embrião e membranas anexas) deve produzir competentemente moléculas que interagem com o endométrio determinando a inibição da síntese de prostaglandina F2 α (PGF2 α) e a luteólise. Tal ação, preserva funcionalmente e estruturalmente o corpo lúteo (CL), mantendo altas concentrações de progesterona (P4) circulantes (GOFF, 2002).

O interferon-tau (IFNT), sintetizado e secretado pelas células trofoblásticas do conceito, foi caracterizado como o principal fator envolvido no RMP na espécie bovina (ROBINSON *et al.*, 2006; EALY; YANG, 2009). Quando o conceito produz de maneira competente o IFNT, o endométrio apresenta a síntese de PGF2 α suprimida enquanto registra-se um aumento na síntese de prostaglandina E2 (PGE2) no endométrio e nas células trofoblásticas do embrião e conceito. O IFNT e a PGE2, ambos de ação luteotrófica, garantem a permanência do CL e manutenção de altas concentrações circulantes de P4, condição fundamental para o RMP (TANIKAWA *et al.*, 2005). Na incapacidade do conceito em promover tais ações coordenadas, será determinada a luteólise e a mortalidade embrionária precoce (MEP). Assim, estratégias capazes de reduzir a capacidade da síntese de PGF2 α e aumentar a síntese de PGE2 pelo endométrio, embrião e/ou conceito se tornam de interesse.

Ácidos graxos específicos (AGE) podem modular a biossíntese de prostaglandinas endometrial e embrionária (HWANG *et al.*, 1988; CHENG *et al.*, 2003; MOUSSAVI *et al.* 2013) e também apresentam potencial para incrementar a qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

Embriões dispõem da capacidade de incorporar e metabolizar AGE quando adicionados no meio de cultivo e estabelecem modificações na biossíntese de eicosanóides envolvendo as prostaglandinas (WHATES *et al.*, 2007). Portanto, a suplementação estratégica com AGE no meio de cultivo de embriões durante a PIVE, pode favorecer no embrião e futuro concepto a diminuição da síntese de PGF2 α e o aumento da síntese de PGE2, assim como o aumento da razão PGE2/PGF2 α .

O ácido linoleico conjugado (CLA), ocasiona modificações na via metabólica do ácido graxo poliinsaturado n-6 na biossíntese de eicosanóides, podendo alterar a concentração de PGF2 α e PGE2 produzidas pelas células endometriais (HWANG *et al.*, 1988; CHENG *et al.*, 2003; MOUSSAVI *et al.* 2013). Lourenço *et al.*, (2022), suplementando meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1) nas concentrações de 10, 20, 50 e 100 μ M de CLA (uma mistura de ácido cis- e trans-9,11- e -10,12-octadecadienoico) constatou redução da síntese de PGF2 α , e redução da síntese de PGE2 com 24 e 72 horas de cultivo, entretanto, observou-se um aumento da razão PGE2/PGF2 α em todas as concentrações testadas. Adicionalmente, Lourenço *et al.* (2022) constatou que o ácido oleico (AO) também proporcionou modificações na síntese de PGs, onde o AO na concentração de 1.000 μ M diminuiu a síntese de PGF2 α e aumentou a síntese de PGE2 após 72 horas de exposição ao tratamento.

Meier *et al.*, (2009) avaliaram os efeitos do ácido graxo eicosapentaenóico (EPA), ácido graxo docosaheptaenóico (DHA) e ácido linoleico (AL) em células endometriais e tecido trofoblástico de ovelhas na síntese de PGF2 α e PGE2 durante uma breve cultura. Não houve uma modificação na síntese das PGs oriunda da suplementação com os AGs no endométrio de fêmeas np D16, estando as mesmas prenhes ou não. Também observaram que tais AGs não modificaram a síntese de PGF2 α e PGE2 no endométrio e células trofoblásticas no D17.

Os AGE além de alterar a biossíntese de prostaglandinas de forma a beneficiar o RMP, também podem beneficiar a metilação do DNA. A reprogramação epigenética é crucial durante desenvolvimento embrionário inicial. Desse modo, falha na remodelação epigenética, como um padrão de metilação alterado, implica em efeitos prejudiciais na ativação do genoma e na diferenciação de células embrionárias (LIANG *et al.*, 2011b; SALILEW-WONDIM *et al.*, 2018). Os efeitos adversos do ambiente no qual o embrião está inserido afeta sua sobrevivência e desenvolvimento, e são mais visíveis nos estágios iniciais de desenvolvimento, quando a condição de cultura leva a alterações na reprogramação do genoma (DEAN *et al.*, 2001; NAZRI *et al.*, 2023). Em bovinos, o meio de maturação no qual os oócitos estão inseridos provoca hipermetilação no fígado de fetos com 50 dias de desenvolvimento (HIENDLEDER *et al.*,

2006). Os sistemas de cultivo de embriões bovinos e embriões derivados de transferência nuclear podem ter a expressão de DNA metiltransferases (DNMTs) alterada em embriões no estágio de pré-implantação, e os dados disponíveis sugerem que a manutenção e a metilação de novo do DNA podem ser afetadas (WRENZYCKI; NIEMANN, 2003).

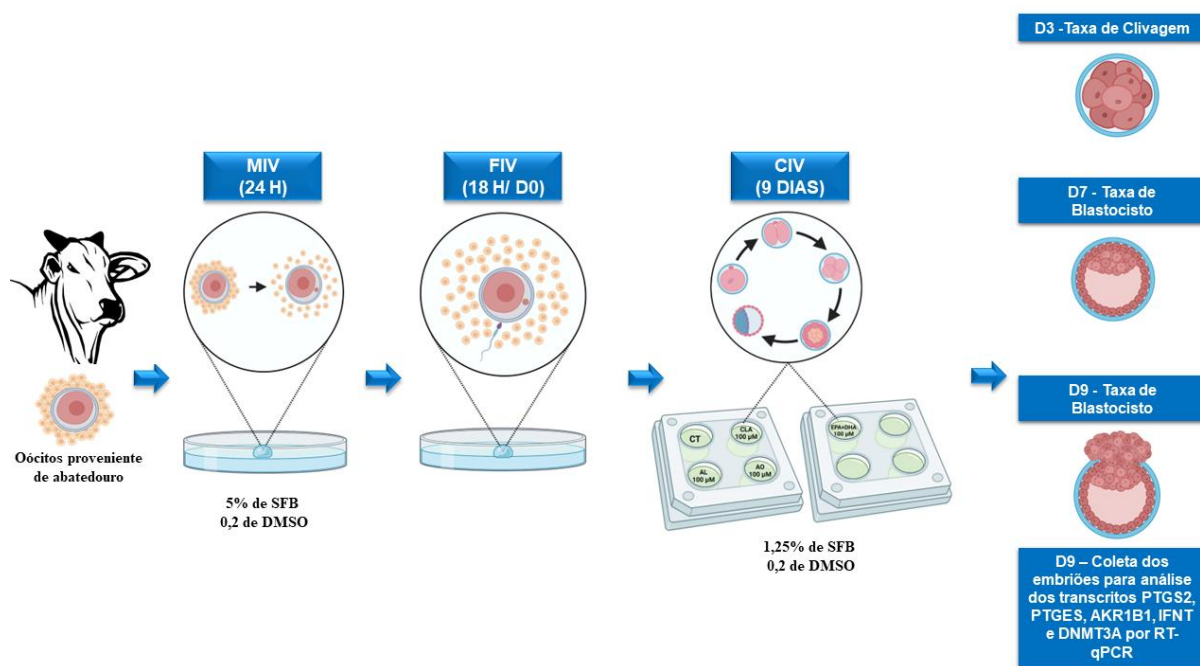
A hipótese é que a suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA), ácido linoleico (AL), ácido oleico (AO) ou ácido eicosapentanóico (EPA) associado ao ácido docosahexaenóico (DHA) no meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* modifica a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de eicosanóides e no RMP, além de favorecer o nível de metilação do DNA nos embriões bovinos. Para tanto, objetivou-se avaliar em embriões bovinos produzidos *in vitro* os efeitos da suplementação com 100 µM CLA, 100 µM AL, 100 µM AO ou 50 µM EPA + 50 µM DHA na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas (PTGS2, PTGES, AKR1B1), no RMP (IFNT), no nível de metilação do DNA (DNMT3A) e na taxa de produção embrionária com 7 e 9 dias de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Conforme ilustrado na **Figura 11**, os oócitos bovinos foram divididos equitativamente em cinco grupos experimentais, com aproximadamente 14 a 25 oócitos por tratamento, a cada repetição realizada. Os grupos experimentais testados foram controle (n = 223), CLA (n = 223), AL (n = 227), AO (n = 225) e EPA + DHA (n = 219). Foram realizadas 8 repetições experimentais. A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos foram realizadas em placas de Petri em sistema de gotas com a suplementação de 5% de SFB sob óleo mineral. A fertilização *in vitro* (FIV) também foi realizada em sistema de gotas, por 18 horas sob óleo mineral. A suplementação dos ácidos graxos foi realizada somente no cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões na concentração final de 100 µM de CLA, 100 µM de AL, 100 µM de AO e 50 µM EPA + 50 µM DHA. A solução estoque dos ácidos graxos foi preparada em DMSO, de forma que todos os meios foram balanceados para conterem idêntica concentração de DMSO (0,2%). O CIV foi realizado em placas de 4 poços contendo aproximadamente 700 µL (o meio foi balanceado conforme a quantidade de estruturas no poço) de meio suplementado de acordo com cada tratamento e 1,25% de SFB. A produção embrionária foi avaliada no D3 (taxa de clivagem), D7 (taxa de blastocisto) e D9 (taxa de blastocisto e taxa de eclosão) considerando como o D0

o dia da fertilização *in vitro*. No D9, os embriões foram armazenados a -80°C. Foram utilizados 3 *pools* para cada grupo experimental em cada *pool* continha três blastocistos expandidos coletados no D9. O *pool* de embriões foi analisado por RT-qPCR quanto à abundância dos transcritos PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT e DNMT3A.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 11. Delineamento Experimental. Oócitos bovinos foram divididos equitativamente em cinco grupos experimentais, com aproximadamente 14 a 25 oócitos por tratamento, a cada repetição realizada. Os grupos experimentais testados foram controle (n = 223), CLA (n = 223), AL (n = 227), AO (n = 225) e EPA + DHA (n = 219). Foram realizadas 8 repetições experimentais. A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos foram realizadas em placas de Petri em sistema de gotas com a suplementação de 5% de SFB sob óleo mineral. A fertilização *in vitro* (FIV) também foi realizada em sistema de gotas, por 18 horas sob óleo mineral. A suplementação dos ácidos graxos foi realizada somente no cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões na concentração final de 100 µM de CLA, 100 µM de AL, 100 µM de AO e 50 µM EPA + 50 µM DHA. A solução estoque dos ácidos graxos foi preparada em DMSO, de forma que todos os meios foram balanceados para conterem idêntica concentração de DMSO (0,2%). O CIV foi realizado em placas de 4 poços contendo aproximadamente 700 µL (o meio foi balanceado conforme a quantidade de estruturas no poço) de meio suplementado de acordo com cada tratamento e 1,25% de SFB. A produção embrionária foi avaliada no D3 (taxa de clivagem), D7 (taxa de blastocisto) e D9 (taxa de blastocisto e taxa de eclosão) considerando como o D0 o dia da fertilização *in vitro*. No D9, os embriões foram coletados e armazenados a -80°C. Foram utilizados 3 *pools* para cada grupo experimental contendo três blastocistos expandidos coletados no D9. O *pool* de embriões foi analisado por RT-qPCR quanto à abundância dos transcritos PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT e DNMT3A.

2.2 Local do experimento

O estudo foi executado no Laboratório de Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE), localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Dracena, São Paulo, Brasil. As análises por ELISA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA),

Pirassununga, São Paulo, Brasil. Todas as práticas foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP de Dracena (Protocolo nº 07/2021 – CEUA), estado de São Paulo, Brasil.

2.3 Aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouros

Ovários de fêmeas *Bos taurus indicus* foram obtidos em abatedouros e imediatamente após o abate, foram transportados ao laboratório imersos em solução salina (0,9% NaCl) a 36°C em caixa térmica, de forma que a temperatura fosse mantida durante todo o transporte. No laboratório, folículos com o diâmetro de 2 a 10 mm foram aspirados com o uso de uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 18-G. O fluido folicular obtido da aspiração dos folículos foi depositado em um tubo cônico estéril de 15 mL que foi mantido a 37,5°C até que a decantação dos oócitos no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi transferido para placas de poliestireno 100 x 20 mm de diâmetro (Corning Incorporated, NY, USA) e avaliado em microscópio estereoscópico. Os COCs foram avaliados e categorizados em graus I, II ou III; de acordo com as características morfológicas (SCENNA *et al.*, 2004). Foram utilizados somente COCs com citoplasma homogêneo e circundado por múltiplas camadas de células do cumulus (graus I e II).

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

Os COCs selecionados foram lavados três vezes em gotas de 50 µL de meio de lavagem H-199, constituído por TCM-199 (Gibco BRL) suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e 75 µg de gentamicina/mL. Posteriormente foram lavados uma vez em meio de maturação B-199, constituído de TCM-199, suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg de gentamicina/mL, 0,5 µg de FSH/mL (Pluset®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil), 100 UI de hCG/mL (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) acrescido de 5% de SFB (Gibco BRL) de acordo com o grupo de tratamento. Posteriormente, os COCs foram alocados aleatoriamente em gotas de 100 µL de meio de maturação, suplementados com 5% de SFB sob óleo mineral. A MIV foi realizada em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂, durante 24 horas. Todos os meios utilizados na MIV foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil). O total de oócitos utilizados no experimento foi

de 1117 distribuídos equitativamente nos diferentes grupos: controle (n = 223), CLA (n = 223), AL (n = 227), AO (n=225) e EPA + DHA (n = 219). A cada repetição, foram utilizadas de 14 a 25 oócitos, tendo sido realizadas 8 repetições experimentais.

2.5 Fertilização *in vitro* (FIV)

Grupos de aproximadamente 14 a 25 COCs foram alocados aleatoriamente em gotas contendo 100 µL de meio de fertilização sob óleo mineral para receberem o sêmen. Foi utilizado o sêmen criopreservado de um único touro Nelore e única partida (PRO PHELPS BAL, Central Bela Vista, partida NE 543114BAL), sendo sua fertilidade *in vitro* previamente comprovada. A palheta de sêmen foi descongelada a 36 °C por 30 segundos em um descongelador automático de sêmen (WTA, modelo INPI/D1710561-9, Cravinhos, São Paulo, Brasil) e em seguida foi avaliada a qualidade espermática. Ao sêmen foi adicionado o gradiente composto por meio *Select Sperm* acrescido de CAP. Logo após, esta mistura foi centrifugada a 5000 x g, durante 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a centrifugação, o sedimento contendo os espermatozoides foi avaliado quanto a motilidade e concentração espermática em câmara de Neubauer. Após a MIV, os COCs foram lavados três vezes em gotas de 50 µL de meio FIV comercial. Assim, os COCs foram colocados no meio FIV em gotas de 100 µL de meio de fertilização dispostas em placas de petri de 35 mm cobertas com óleo siliconado para receberem o sêmen diluído. O sêmen foi diluído na concentração final fosse ajustada para 2×10^6 espermatozóides/mL. O *pellet* de espermatozoides foi ressuspensionado em meio FIV de acordo com o resultado do cálculo. Foram utilizados 6 µL desse conteúdo para fertilizar cada gota de 100 µL de meio de fertilização. Os oócitos foram submetidos a FIV durante 18 horas em incubadora a 38,5 °C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Todos os meios utilizados na FIV foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil).

2.6 Preparo das soluções de ácidos graxos

Ácido linoléico conjugado (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 (Sigma-Aldrich, 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, AO e EPA, 200.000 µM/mL para o DHA, todas as soluções foram preparadas em dimetilsulfóxido

(DMSO, Sigma-Aldrich, USA, Cat N°. D2650) conforme descrito pela Ref. (CHENG et al., 2003) , sendo que todos os meios foram balanceados para conterem a mesma concentração de DMSO (0,2%) e armazenado a -20 °C até o uso. e armazenado a -20°C até o uso. Para o preparo da suplementação, o estoque de cada ácido graxo foi diluído em meio CIV (Botufiv) suplementado com 1,25% de SFB. A suplementação dos ácidos graxos foi realizada somente no cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões na concentração final de 100 µM de CLA, 100 µM de AL, 100 µM de AO e 50 µM EPA + 50 µM DHA. Todas as soluções de tratamentos e o controle tinham quantidades semelhantes de DMSO, balanceados com a mesma concentração de 0,2%. Foram realizadas 8 repetições experimentais.

2.7 Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV)

Após a FIV, os prováveis zigotos foram colocados em 50 µL do meio de lavagem, e foram submetidos ao desnudamento, pelo procedimento de turbilhonamento do meio por sucessivas pipetagens com o objetivo de remoção das células do cumulus excedentes. Posteriormente lavados três vezes sucessivamente em gotas de 50 µL de meio de cultivo suplementado com seus determinados ácidos graxos. Após este processo, as estruturas foram alocadas nas placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 700 µL de meio de cultivo CIV acrescido de 1,25% de SFB (Gibco BRL) com os respectivos tratamentos CLA, AL, AO e EPA + DHA e o grupo controle. Todos os meios utilizados no CIV foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil). Os prováveis zigotos com os respectivos tratamentos foram mantidos em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂ durante 9 dias. O “Feeding” foi realizado no dia 5 (D5), onde 50% do meio de cultivo foi substituído por um novo meio de cultivo glicosado e com os respectivos tratamentos.

2.8 Avaliação da produção embrionária

A produção embrionária foi avaliada no D3 (taxa de clivagem), D7 (taxa de blastocisto) e D9 (taxa de blastocisto e taxa de eclosão) considerando como o D0 o dia da fertilização *in vitro*. Determinou-se a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100) e taxa de eclosão (número de blastocisto eclodidos/ número de oócitos cultivados x 100).

2.9 Armazenamento dos embriões para posterior análise por RT-qPCR

Os embriões (blastocistos expandidos) foram lavados em três gotas de 50 µL de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS (1X), Gibco, Ref. 14190-144, Paisley, UK), e transferidos para microtubos e armazenado no freezer - 80°C até o momento de sua utilização na RT-qPCR.

2.10 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a RT-qPCR foram utilizados blastocistos expandidos no D9. No grupo EPA + DHA não houve produção suficiente de blastocistos expandidos que possibilitasse a formação de *pools*, para extração de RNA. O RNA total foi extraído de 3 *pools* de 3 blastocistos expandidos de 4 grupos experimentais (Controle 0 µM, CLA 100 µM, AL 100 µM e AO 100 µM), usando PicoPure RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific KIT0204/KIT0214), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração e pureza das amostras de RNA total extraídas foram determinadas usando espectrofotometria (NanoVue; GE Healthcare) e os valores das razões de absorvância (A260/280) variaram entre 1,2 e 1,4. Amostras de RNA (100 ng) de embriões foram tratadas com DNase I (Invitrogen, DNase I Amplification Grade, Ref. 18068-015, CA, USA) e reações de transcrição reversa de cDNA (Applied Biosystems, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Ref. 4368814, Foster City, CA). A RT-qPCR foi realizada usando corante SYBR Green (Applied Biosystems Inc.) para avaliar os transcritos PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT e DNMT3A. As reações de RT-qPCR e a detecção de fluorescência foram realizadas no termociclador StepOne Plus Real-Time PCR System programado para iniciar com estágio de espera (95°C por 10 minutos), seguido por 40 ciclos compostos por fase de desnaturação (95°C por 15 segundos) e anelamento e extensão (60°C por 1 minuto). A curva de dissociação (*melting*) foi obtida imediatamente após a amplificação permanecendo a 95°C por 15 minutos, passando a 60°C por 1 minuto e voltando a 95°C por 15 minutos. Para cada gene, a concentração de primers na reação (150 nM, 300 nM, 450 nM ou 600 nM) foi testada – usando um *pool* de amostras de cDNA diluído em 1:20 – e selecionada de acordo com a eficiência de amplificação, falta de amplificação no controle negativo e análise da curva de *melting*. Depois de escolhida a concentração do primer, foi feita uma curva padrão composta por cinco pontos de *pool* de cDNA diluído em série de 1:5 a 1:80. Cada ponto da curva foi testado em duplicata. A eficiência de amplificação foi calculada pela equação: $Eficiência = -1 + 10^{(-1/inclinação)}$. Foram consideradas validadas as curvas padrão com eficiência entre 70 e 138% e coeficiente de determinação da equação de regressão (R^2) $\geq 0,86$. Os genes ACTB e RPS9 foram validados

e utilizados como *housekeeping* após determinação da estabilidade de expressão por meio do software geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). A média geométrica da abundância destas duas referências foi usada para a normalização da abundância dos genes alvo.

2.11 Seleção e validação de pares de primers

Os primers dos 5 genes alvo e dos 2 genes referência, validados e analisados neste experimento, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 2. Símbolo dos genes alvos e genes de referências, sequência *forward* e *reverse* dos primers, número de *GenBank* e referência na literatura utilizada para gerar os primers

Genes alvos	Sequência do Primer	Número GenBank	Referência
PTGES	Forward: GCTGCGGAAGAAGGCTTTTGCC Reverse: GGGCTCTGAGGCAGCGTTCC	NM_174443.2	PrimerQuest
AKR1B1	Forward: ATACAAGCCGGCGGTTAAC Reverse: TGTCTGCAATCGCTTTGATC	NM_001012519	ULBRICH et al., 2009
IFNT	Forward: CATCTTCCCCATGGCCTTCG Reverse: TCATCTCAAAGTGAGTTCAG	AF238613	BAI et al., 2011
PTGS2	Forward: CCAGAGCTCTTCCTCCTGTG Reverse: GGCAAAGAATGCAAACATCA	NM_174445.2	PrimerQuest
DNMT3A	Forward: TTACACAGAAGCATATCCAGG Reverse: GAGGCGGTAGAACTCAAAG	NM_181813.2	ABAZARIKIA et al., 2021
Genes referências			
RPS9	Forward: GAGCTGGGTTTGTCGCAAA Reverse: GGTGAGGCGGGACTTCT	DT860044	HUGHES et al., 2017
ACTB	Forward: GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA Reverse: TCGTCCCAGTTGGTGACGAT	NM_173979.3	BETTEGOWDA et al., 2006

Os dados de validação dos primers e da concentração das amostras para os genes alvos estão apresentados na Tabela 2 e dos genes de referência na **Tabela 3**.

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

Genes Alvos	PTGES	AKR1B1	IFNT	PTGS2	DNMT3A
Concentração do primer (nM)	150	300	300	300	300
Diluição da amostra	1:20	1:20	1:20	1:20	1:20
Eficiência de amplificação (%)	110,00	109,05	111,00	96,50	138
Coeficiente de determinação (R ²)	0,84	0,95	0,99	0,92	0,86

Tabela 4. Dados de validação dos primers e da concentração das amostras dos genes de referência para RT-qPCR.

Gene	RPS9	ACTB
Concentração do primer (nM)	300	300
Diluição da amostra	1:20	1:20
Eficiência de amplificação (%)	103,70	99,42
Coefficiente de determinação (R^2)	0,94	0,99

2.12 Análises da expressão de transcrições

A análise da abundância relativa dos transcritos foi realizada utilizando primers específicos para bovinos, todos pré-selecionados. A expressão relativa dos genes alvos foi comparada entre o grupo controle e os tratados com CLA, AL e AO na concentração de 100 μ M em *pools* de 3 blastocistos expandidos coletados no D9. As reações foram realizadas em triplicata. A eficiência da RT-qPCR foi determinada e os valores do ciclo de quantificação (Cq) por amostra utilizando o software LingRegPCR. Os dois genes mais estáveis para normalização (RPS9 e ACTB), selecionados pelo software geNorm, foram utilizados como genes de referência. A expressão dos genes alvos foi avaliada por RT-qPCR e normalizada em relação à média geométrica dos genes de referência usando o método comparativo limiar do ciclo delta (Ct) (PFAFFL, 2001).

2.13 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados de abundância dos transcritos foram analisados por ANOVA usando o efeito fixo do tratamento. Os resultados estão apresentados com médias $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para todas as análises, significância foi considerada quando $P \leq 0,05$. Considerou-se tendência quando o valor de $0,05 > P \geq 0,1618$.

3. RESULTADOS

3.1 Taxa de clivagem no D3

Conforme ilustrado na **Figura 12**, observou-se que a taxa de clivagem no D3 não foi diferente ($P = 0,9685$) quando se comparou os diferentes grupos de tratamento.

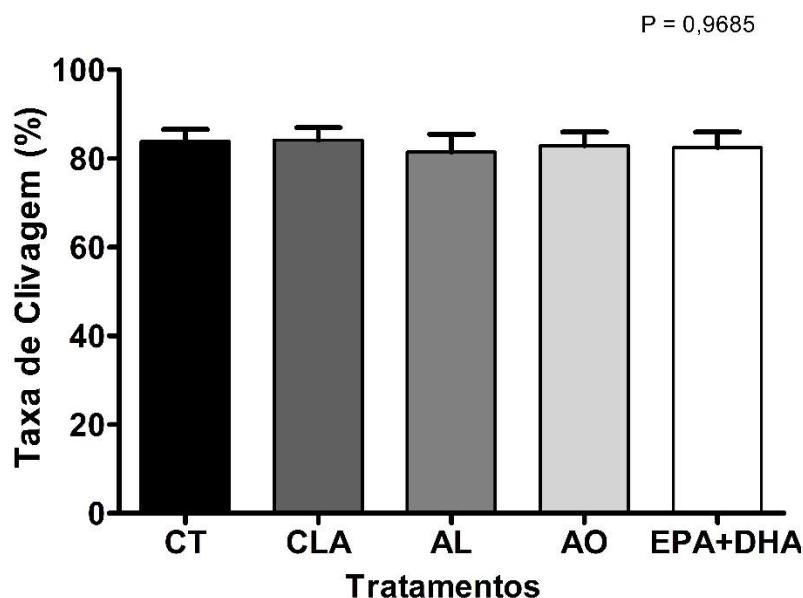


Figura 12. Efeitos da suplementação com 100 μ M de ácido linoleico conjugado (CLA), 100 μ M de ácido linoleico (AL), 100 μ M de ácido oleico (AO) e 50 μ M de ácido eicosapentanoico (EPA) + 50 μ M de ácido docosahexanoico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro* na taxa de clivagem (número de estruturas clivadas / número de oócitos cultivados $\times$ 100) no D3 (D0 = dia da fertilização *in vitro*). Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

3.2 Taxa de blastocisto no D7

Conforme ilustrado na **Figura 13**, foi evidenciado que nenhum dos ácidos graxos utilizados aumentou a taxa de blastocistos no D7 quando comparados ao grupo controle, entretanto, no grupo EPA + DHA a taxa de blastocisto tendeu a ser menor ($P = 0,1023$) comparado aos grupos Controle e AO ($4,97 \pm 1,60$ vs. $15,63 \pm 3,22$ e $15,09 \pm 0,92$, respectivamente).

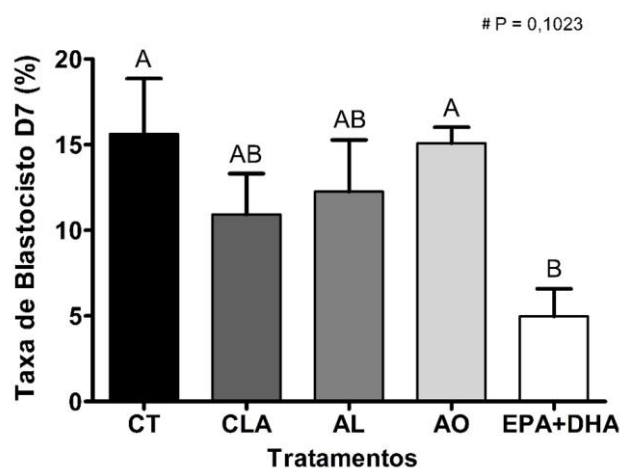


Figura 13. Efeitos da suplementação com 100 μ M de ácido linoleico conjugado (CLA), 100 μ M de ácido linoleico (AL), 100 μ M de ácido oleico (AO) e 50 μ M de ácido eicosapentanoico (EPA) + 50 μ M de ácido docosahexanoico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro* na taxa de blastocisto (número de blastocistos / número de oócitos cultivados x 100) no D7 (D0 = dia da fertilização *in vitro*). Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

#^{a,b} Letras maiúsculas diferentes indicam que houve uma tendência entre tratamentos (P = 0,1023)

3.3 Taxa de blastocisto no D9

Conforme ilustrado na **Figura 14**, foi evidenciado que nenhum dos ácidos graxos utilizados aumentou a taxa de blastocistos no D9 quando comparados ao grupo controle, entretanto, no grupo EPA + DHA a taxa de blastocisto foi menor (P = 0,0271) comparado aos grupos Controle, AL e AO ($2,93 \pm 1,56$ vs. $12,85 \pm 3,58$; $14,43 \pm 2,51$ e $14,44 \pm 2,78$ respectivamente).

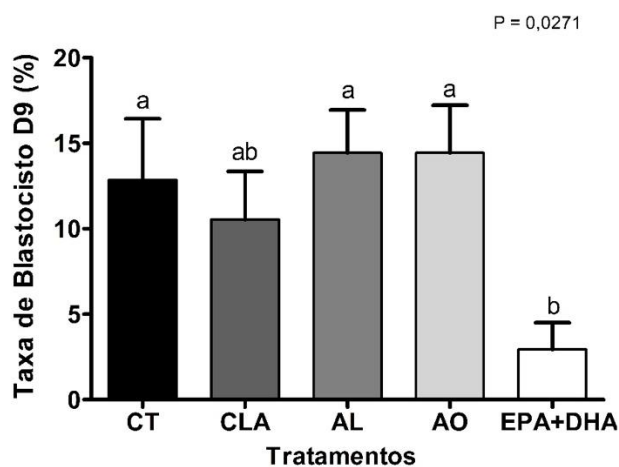


Figura 14. Efeitos da suplementação com 100 μ M de ácido linoleico conjugado (CLA), 100 μ M de ácido linoleico (AL), 100 μ M de ácido oleico (AO) e 50 μ M de ácido eicosapentanoico (EPA) + 50 μ M de ácido docosahexanoico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro* na taxa de blastocisto (número de

blastocistos / número de oócitos cultivados x 100) no D9 (D0 = dia da fertilização *in vitro*). Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença entre tratamentos ($P < 0,05$)

3.4 Taxa de eclosão no D9

Conforme ilustrado na **Figura 15**, a taxa de eclosão diferiu ($P = 0,0316$) entre os diferentes grupos experimentais. No grupo suplementado com EPA + DHA não houve a produção de blastocistos eclodidos em todas as repetições realizadas ao longo do experimento.

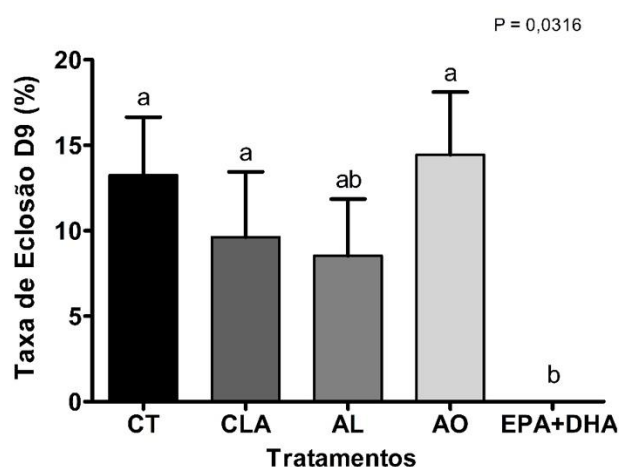


Figura 15. Efeitos da suplementação com 100 μ M de ácido linoleico conjugado (CLA), 100 μ M de ácido linoleico (AL), 100 μ M de ácido oleico (AO) e 50 μ M de ácido eicosapentanoico (EPA) + 50 μ M de ácido docosahexanoico (DHA) em meio de cultivo (CIV) de embriões bovinos produzidos *in vitro* na taxa de eclosão número de blastocistos eclodidos / número de oócitos cultivados x 100) no D9 (D0 = dia da fertilização *in vitro*). Os dados estão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

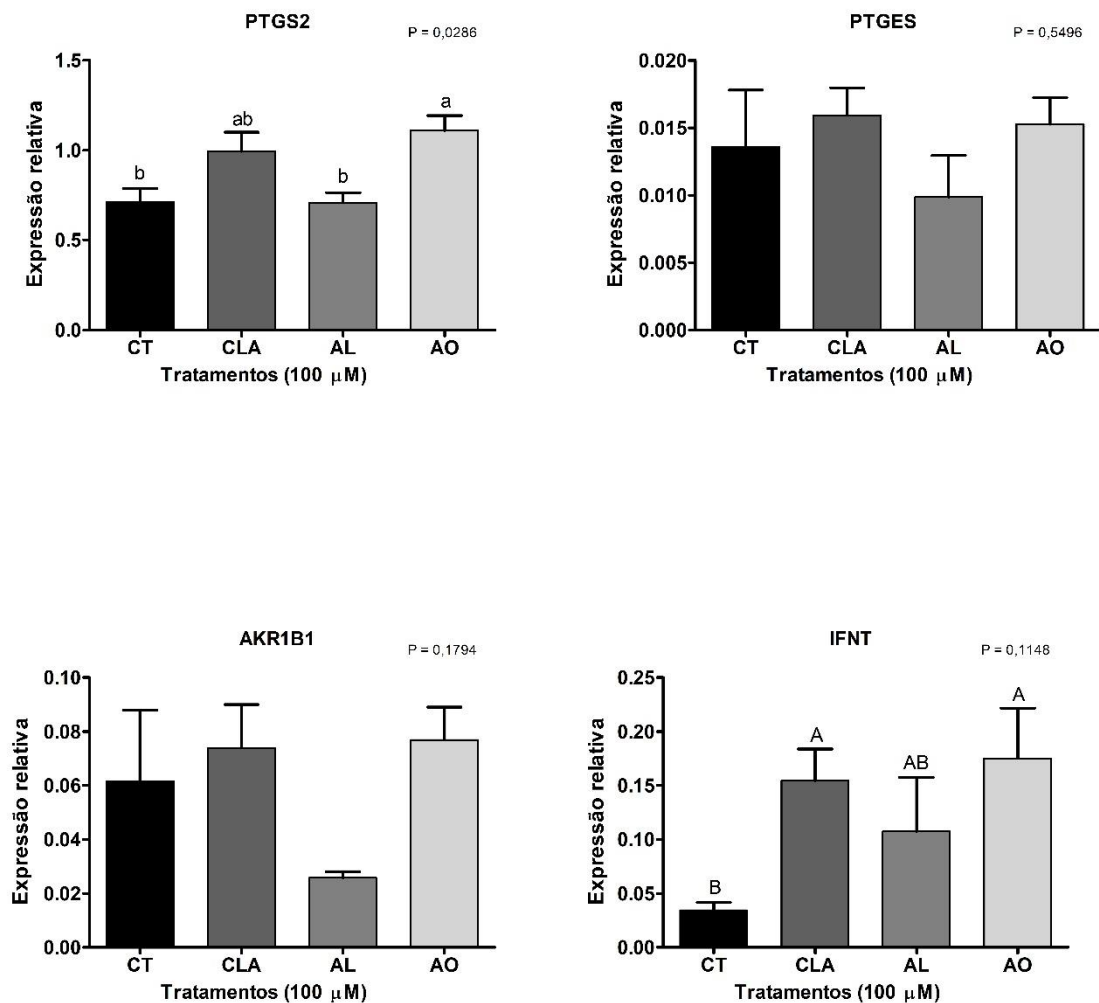
^{a,b} Letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença entre tratamentos ($P < 0,05$)

3.5 Abundância de PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT e DNMT3A no D9

PTGS2, PTGES, AKR1B1. Na **Figura 16**, estão ilustrados os níveis de expressão relativa dos transcritos avaliados. O grupo AO teve a expressão de PTGS2 maior ($P = 0,0286$) em relação ao grupo controle e AL ($1,1090 \pm 0,0833$ vs. $0,7109 \pm 0,0748$ e $0,7068 \pm 0,0577$; respectivamente). O grupo CLA não diferiu dos demais grupos. Os níveis de expressão relativa de PTGES não diferiu ($P = 0,5496$) entre os grupos controle, CLA, AL e AO ($0,0135 \pm 0,0041$; $0,0159 \pm 0,0020$; $0,0098 \pm 0,0030$ e $0,0152 \pm 0,0019$; respectivamente). Os níveis de expressão relativa de AKR1B1 não diferiu entre os grupos ($P = 0,1794$) controle, CLA, AL e AO ($0,0615 \pm 0,0264$; $0,0769 \pm 0,0160$; $0,0257 \pm 0,0022$ e $0,0769 \pm 0,0120$ respectivamente).

IFNT. Conforme ilustrado na **Figura 16**, os níveis de expressão relativa de IFNT tenderam a diferir entre os grupos ($P = 0,1148$) os grupos CLA e AO tiveram a expressão de IFNT maior em relação ao grupo Controle (0.1544 ± 0.0293 vs 0.1750 ± 0.0465 vs 0.0344 ± 0.0073 , respectivamente), o grupo AL não diferiu dos demais grupos, após suplementação do meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* com ácidos graxos na concentração de $100 \mu\text{M}$.

DNMT3A. Conforme ilustrado na **Figura 16**, houve uma tendência dos grupos CLA e AO terem uma maior ($P = 0,0797$) expressão de DNMT3A quando comparado ao grupo Controle ($0,0009 \pm 0,0001$ vs. $0,0012 \pm 0,0005$ e $0,0001 \pm 0,00008$; respectivamente).



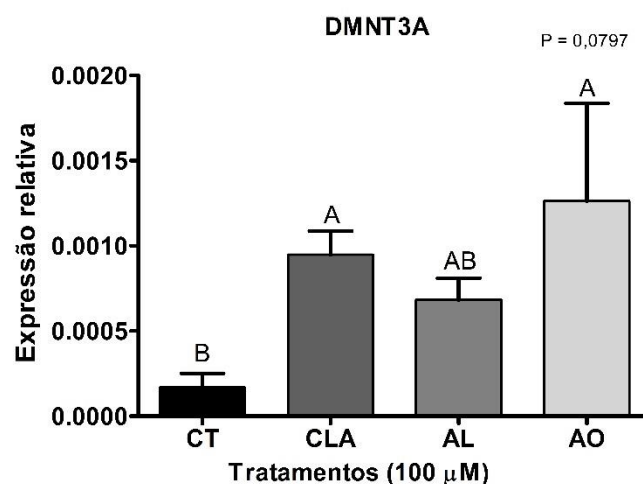
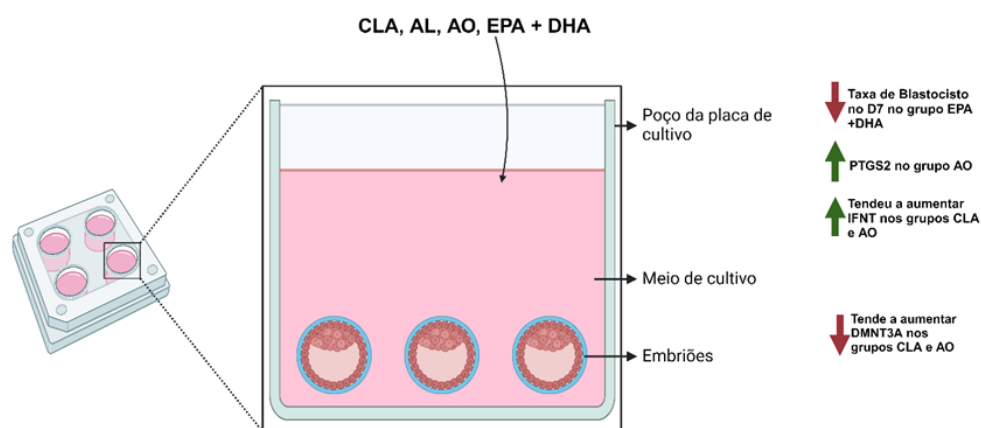


Figura 16. Abundância de transcritos para PTGS2, PTGES, AKR1B1, IFNT e DNMT3A; calculada pela expressão relativa aos genes referência ACTB e RPS9, após suplementação com 100 μM de ácido linoleico conjugado (CLA), 100 μM de ácido linoleico (AL), 100 μM de ácido oleico (AO) e 50 μM de ácido eicosapentanoico (EPA) + 50 μM de ácido docosahexanoico (DHA) em meio de cultivo de embriões bovinos produzidos no D9 (D0 = dia da fertilização *in vitro*). Os dados estão apresentados em média ± erro padrão da média (EPM).

^{a,b} Letras diferentes minúsculas indicam que houve diferença entre tratamentos ($P < 0,05$)

^{A,B} Letras diferentes maiúsculas indicam que houve tendência entre tratamentos ($P > 0,05$ e $< 0,12$)

Na **Figura 17**, encontra-se representada uma sumarização dos resultados.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 17. Sumarização dos resultados apresentados após suplementação com 100 μM de ácido linoleico conjugado (CLA), 100 μM de ácido linoleico (AL), 100 μM de ácido oleico (AO) e 50 μM de ácido eicosapentanoico (EPA) + 50 μM de ácido docosahexanoico (DHA) em meio de cultivo de embriões bovinos produzidos no D9 (D0 = dia da fertilização *in vitro*).

3 DISCUSSÃO

Os embriões bovinos produzidos *in vitro* foram suplementados com diferentes ácidos graxos (CLA, AL, AO e EPA + DHA), onde avaliou-se a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de PGE2 e PGF2 α (PTGS2, PTGES e AKR1B1), reconhecimento materno da prenhez (IFNT) e metilação do DNA (DNMT3A) em embriões bovinos no D9 do cultivo *in vitro*. Nossos dados sustentam que os embriões bovinos constituem uma potencial fonte de PGE2 e PGF2 α , e que essa síntese de PGs pode ser modulada por ácidos graxos específicos, uma vez que a expressão do transcrito para PTGS2 foi alterada. Prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGES2), também conhecida como COX 2, responsável pela conversão do AA em PGH2 teve sua expressão aumentada em embriões bovinos quando tratados com 100 μ M de AO. Tal aumento de expressão, pode resultar em uma maior conversão de AA em PGH2, resultando em maiores quantidades de substrato disponível para a geração de prostaglandinas, que dependendo da modulação pode ser convertida em de PGH2 em PGE2 e PGF2 α .

O presente experimento compreende parte de um estudo maior, onde no trabalho de Rolniche *et al.* (2024) (dados ainda não publicados), o meio de cultivo do estudo aqui realizado foi mensurado pela técnica de ELISA quanto à concentração de PGE2 e PGF2 α no D9 do cultivo *in vitro* dos embriões. A autora constatou que os grupos CLA e EPA+DHA apresentaram as menores ($P < 0,0001$) concentrações de PGE2 diferindo dos grupos controle, AL e AO ($0,2676 \pm 0,0552$ e $0,0920 \pm 0,0082$ vs. $1,1376 \pm 0,2528$; $3,6362 \pm 1,1514$ e $1,19 \pm 0,2029$ respectivamente), os grupos AL e AO não diferiram do controle. Os grupos AL e AO apresentaram maior ($P < 0,0001$) síntese de PGF2 α comparado a que? ($0,7026 \pm 0,1644$ e $0,4110 \pm 0,0391$ vs. $0,2658 \pm 0,0378$ respectivamente). Os grupos CLA e EPA + DHA apresentaram menor ($P < 0,0001$) concentração de PGF2 α comparado ao grupo controle ($0,0778 \pm 0,0077$ e $0,0570 \pm 0,0046$ vs. $0,2658 \pm 0,0378$). O grupo EPA + DHA foi o unico grupo a ter a razão PGE2/PGF2 α diminuída ($P = 0,0336$) em relação ao Controle ($1,6340 \pm 0,1360$ vs. $4,1100 \pm 0,7667$; respectivamente).

O intuito do estudo era incremenar a síntese de PGE2 e diminuir PGF2 α , contudo, pode se observar que a expressão de algumas das enzimas responsáveis pela conversão do PGH2 em PGE2 e PGF2 α não foram moduladas, dessa maneira entende-se que nem a via de síntese de PGE2 e PGF2 α foram beneficiadas por essas enzimas, entretanto existem outras enzimas que também são resposáveis por essa conversão e que não foram avaliadas. Ressalta-se que algumas das anzimas não avaliadas podem estar exercendo efeitos na rota de síntese de PGE2 ou PGF2 α . Em células do *cumulus* bovino, foi demonstrado que a PGE2 é a principal prostaglandina relacionada a enzima PTGS2 (converte o AA em PGH2) encontrada no microambiente de oócitos bovinos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (NUTTINCK *et al.*, 2002,

2008). A enzima PTGS2 está relacionada com a clivagem e o número de blastômeros, e a inibição de sua atividade ocasiona desaceleração da cinética da clivagem embrionária inicial e reduz o número total de blastômeros em COCs bovinos (NUTTINCK et al., 2011). No presente estudo tivemos um aumento da expressão da enzima PTGS2, entretanto esse fato não refletiu em maiores taxas de blastocistos no D7 e D9, mas esse aumento de expressão pode ter proporcionado um aumento na cinética de clivagem e aumentado o número de blastômeros no grupo tratado com AO.

Boruszewska et al., (2019) sugerem que a produção de PGE2 oriunda dos embriões bovinos em estádios anteriores, desde a mórula até ao estágio de blastocisto, poderia influenciar o seu avanço no desenvolvimento bem como sua competência. A PGE2 sintetizada pelo embrião bovino pode exercer efeitos parácrinos no oviduto e no endométrio, uma vez que vários subtipos do receptor PGE2 acoplado à proteína G (EP2, EP3 e EP4) são expressos nas células do oviduto bovino durante todas as fases do ciclo estral (GABLER *et al.*, 2008) e em tecidos uterinos (EP2 e EP3) até próximo da fase fetal da prenhez (AROSH *et al.*, 2004).

Quando analisamos as taxas de produção embrionária é possível observar que o grupo EPA + DHA apresentou as piores taxas de produção, não apresentando nenhum blastocisto eclodido no D9, tal fato sugere que realmente a concentração de PGE2 pode ter sido diminuída, influenciando no desenvolvimento embrionário, bem como sua eclosão. Em contrapartida, segundo Scenna *et al.* (2004), a presença de determinadas concentrações de PGF2 α na cultura de embriões em 0,1, 1 ou 10 ng/mL por 24 horas diminui as taxas de eclosão quando comparada ao controle (24, 29,1, 24,5 e 44,5%, respectivamente; $P = 0,05$).

A taxa de clivagem dos embriões foi avaliada no dia 3 do cultivo (D0 = fertilização), bem como as taxas de blastocistos que foram avaliadas no D7 e D9, a suplementação do meio de cultivo com os determinados ácidos graxos não apresentou diferença significativa na produção embrionária quando comparado ao grupo controle. Stinshoff et al., (2014), observaram que a suplementação do meio de cultivo com 50 e 100 μ M utilizando CLA não alterou a taxa de clivagem, porém reduziu a taxa de embriões produzidos quando comparado ao grupo controle. A clivagem no presente estudo seguiu o mesmo padrão do autor anterior, os grupos que foram tratados com EPA + DHA quando comparados ao grupo controle houve uma diminuição da taxa de blastocisto no D7 e no D9 não houve nenhum blastocisto eclodido. A suplementação com DHA (1,10 ou 100 μ M) fornecido ao longo do cultivo embrionário *in vitro*, não exerceu efeito positivo na taxa de clivagem, além de reduzir a taxa de blastocistos no dia 7 quando foi utilizado na concentração de 10 μ M (AL DARWICH et al., 2010). Os mesmos

autores verificaram que quando foi utilizada a maior concentração de 100 μ M houve uma diminuição na sobrevivência embrionária. No presente estudo o grupo suplementado com EPA + DHA não produziu nenhum blastocisto eclodido, a associação dos dois ácidos graxos não foi benéfica ao desenvolvimento embrionário, um efeito antagônico entre eles pode ter afetado a dinâmica do desenvolvimento embrionário.

Em um estudo utilizando o EPA 100 nM houve uma redução da taxa de maturação dos oócitos ($P < 0,05$), sem afetar a expansão das células do *cumulus*. Nas concentrações utilizadas, o EPA não modificou o desenvolvimento embrionário (NIKOLOFF et al., 2020). No presentendo estudo esperávamos um efeito sinérgico da combinação de EPA + DHA, entretanto esse efeito não foi observado, uma vez que a produção embrionária foi afetada negativamente pela combinação dos ácidos graxos.

Encontramos uma resposta diferente para as concentrações de PGE2 e PGF2 α no meio de cultura *in vitro* de embriões bovinos suplementados com diferentes ácidos graxos. Embora a suplementação com AL e OA não tenha proporcionado aumento na concentração de PGE2, a produção de PGF2 α por esses mesmos ácidos graxos apresentou um pico, isso sugere que esses ácidos graxos podem ter uma interação maior com a via de biossíntese das prostaglandinas. A síntese de PGs foi pouco estimulada pela suplementação com CLA e EPA + DHA.

Durante o reconhecimento RMP, a sinalização entre o embrião e o útero é crucial para a manutenção do corpo lúteo e para o sucesso da prenhez, o impacto deletério da PGF2 α oriunda das células uterina no corpo lúteo bovino é reconhecido. Entretanto, é difícil mensurar com clareza o impacto da PGF2 α oriunda do embrião no corpo lúteo, tendo em vista que durante o momento crítico do reconhecimento materno-fetal, o embrião apresenta um número muito menor de células que sintetizam PGF2 α em comparação com o número substancialmente maior de células uterinas capazes de sintetizar PGF2 α . Essa diferença na produção de PGF2 α entre as células uterinas e embrionárias levanta questões sobre a importância relativa da PGF2 α embrionária na regulação do corpo lúteo. Estudos adicionais são necessários para entender melhor os mecanismos pelos quais o embrião pode influenciar a função luteal, possivelmente através de outros fatores de sinalização ou interações complexas entre os tecidos embrionários e uterinos.

Células epiteliais endometriais bovinas tiveram a concentração PGE2 e PGF2 α diminuídas significativamente no meio de cultura quando expostas a concentrações maiores que 50 μ M de isômeros de CLA por 24 horas (MOUSSAVI et al., 2013). De outro modo, Cheng et al. (2003), constaram que células endometriais de ovelhas expostas ao CLA, tiveram a síntese

de PGF2 α diminuída, e a utilização de concentrações menores que 20 μ M, aumentou a síntese de PGE2. Segundo Meier *et al.* (2009), realizando uma incubação do tecido trofoblástico expostos a EPA, DHA ou AL em uma concentração final de 10 μ M por 5 horas, não foi possível constatar alteração na síntese de PGF2 α e PGE2 no endométrio de fêmeas prenhes e não prenhes no D16 e D17 e em células trofoblásticas, houve apenas uma tendência de que EPA e DHA reduzissem a liberação de PGE2.

Cheng *et al.*, (2003), relataram que a suplementação com CLA em células endometriais ovíneas, aumentou a razão PGE2/PGF2 α nas células endometriais. Os resultados do referido autor nos mostram que ácidos graxos podem exercer diferentes efeitos a depender do tipo de célula e concentração a ser utilizada.

Maldonado *et al.* (2023) relataram que a suplementação de células trofoblásticas bovinas com diferentes concentrações de ácido linoleico conjugado (CLA) por 24 horas resultou na redução da síntese de PGE2 em todas as doses de CLA utilizadas, quando comparadas com o controle. Além disso, o estudo mostrou que a suplementação com CLA foi capaz de reduzir a síntese de PGF2 α em todas as doses e tempos testados. Houve também uma redução nos níveis de transcritos de PTGES, PTGER4 e MMP9.

Em outro estudo, a expressão de mRNA de enzimas envolvidas na síntese de PGE2 em embriões produzidos *in vitro* de novilhas holandesas, todos os embriões bovinos nos estágios de mórula e blastocisto apresentaram transcrições para PTGS2 e PTGES1 na síntese de PGE2, sendo esta a via predominante. Os autores sugerem que os embriões utilizam exclusivamente a via PTGS2 e PTGES1 na síntese de PGE2 e que a PGE2 está potencialmente envolvida na expansão do blastocisto e na competência do seu desenvolvimento (SAINT-DIZIER *et al.*, 2011). Em embriões humanos, a PTGS2 também foi predominantemente expressa em embriões de 8 células, mórula e blastocisto (WANG *et al.*, 2002). Em nosso estudo com embriões bovinos, verificamos um aumento na expressão de PTGS2 no grupo AO, entretanto não foi possível a avaliação dos transcritos para PTGES1.

O aumento de transcritos para a enzima PTGS2 pode ter beneficiado a via de síntese da PGF2 α , uma vez que a síntese de PGF2 α foi maior do que a síntese de PGE2, e consequentemente a razão PGE2/PGF2 α foi menor, tal fato não era esperado essa situação não se torna benéfica ao RMP.

Embora a expressão de IFNT, tenho dado apenas tendência (P = 0,1148), a expressão foi maior nos embriões tratados com 100 μ M de CLA e AO. Uma das ações do IFNT, em células endometriais bovinas durante o RMP, refere-se a sua ação em aumentar a síntese de

PGE2 e diminuir a de PGF2 α favorecendo o RMP, este achado de fato pode proporcionar maiores chances desses embriões em estabelecerem com sucesso uma prenhez. O CLA e AO utilizados no presente estudo podem funcionar como uma molécula sinalizadora que pode se ligar a receptores mediando diretamente a expressão gênica e modulando a síntese de proteínas e/ou mRNAs.

De acordo com os resultados, a expressão relativa de DNMT3a teve uma tendência a ser aumentada nos grupos tratados com CLA e AO, portanto, as enzimas necessárias para catalisar a remodelação epigenética são mais abundantes em embriões bovinos cultivados com os referidos ácidos graxo. O DNMT3a e DNMT3b são responsáveis por *de novo* processo de metilação.

Em conjunto com os dados de outros autores, os ácidos graxos poliinsaturados exercem efeitos diferentes sobre as células a depender da característica do tecido, da concentração utilizada e do tipo de ácido graxo e é possível a visualização de resultados discrepantes quanto aos seus potenciais efeitos na síntese de PGs. A diferença na modulação da síntese de PGE2 pode estar associada diretamente com os tipos de ácidos graxos utilizados e qual via eles vão atuar. Estes resultados sugerem que o AO pode afetar a síntese de PG através da disponibilidade aumentada de enzimas envolvidas nos processos metabólicos dos eicosanóides. Esses dados sugerem que os ácidos graxos podem exercer seus efeitos em uma etapa comum à síntese de ambas as prostaglandinas avaliadas, uma vez que as mesmas compartilham dos mesmos sistemas enzimáticos compreendidos entre a liberação do ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica e a síntese de PGH2 ou, simultaneamente, nas vias de síntese de PGE2 e PGF2 α de forma independente.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com AO aumentou a abundância de transcrito para PTGS2 e o CLA e AO tenderam a aumentar os transcritos para IFNT e DNMT3A, enquanto a suplementação com EPA + DHA afetou negativamente as taxas de produção embrionária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAZARIKIA, A; ZHANDI, M; TOWHIDI, A; SHAKERI, M; YOUSEFI, AR; ALIYAN, A. Conjugated linoleic acid improves meiotic spindle morphology and developmental competence of heat-stressed bovine oocyte. **Theriogenology**, v. 172, p. 67-72, 2021. ANUALPEC 2021. São Paulo: Informa Economics FNP, 2021.

ABAZARIKIA, AH; ZHANDI, M; SHAKERI, M; TOWHIDI, A; YOUSEFI, AR. In vitro supplementation of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid ameliorated deleterious effect of heat stress on bovine oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 142, p. 296-302, 2020.

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 Mediators**, [s. l.], v. 93, n. 1–2, p. 30–36, 2010.

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; KIMMINS, S.; CHAPDELAINE, P.; MACLAREN, L. A.; FORTIER, M. A. Effect of Interferon- τ on Prostaglandin Biosynthesis, Transport, and Signaling at the Time of Maternal Recognition of Pregnancy in Cattle: Evidence of Polycrine Actions of Prostaglandin E2. **Endocrinology**, [s. l.], v. 145, n. 11, 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. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 99, n. 7, p. 5926–5940, 2016.

ASSELIN, E; BAZER, FW; FORTIER, MA. Recombinant ovine and bovine interferons tau regulate prostaglandin production and oxytocin response in cultured bovine endometrial cells. **Biology Reproduction**, v. 56, p. 402-408, 1997.

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

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

BAZER, FW; SPENCER, TE; JOHNSON, GA. Interferons and uterine receptivity. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, p. 90-102, 2009.

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

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

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, [s. l.], v. 56, n. 9, p. 1451–1463, 2001.

BORUSZEWSKA, D.; GRYCMACHER, K.; KOWALCZYK-ZIEBA, I.; SINDEREWICZ, E.; STASZKIEWICZ-CHODOR, J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I. 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. l.], v. 133, p. 45–55, 2019.

BURR, G. O.; BURR, M. M. On the nature and rôle of the fatty acids essential in nutrition. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 86, n. 2, 1930.

CALDARI-TORRE, C., RODRIGUEZ-SALLABERRY, C., GREENE, E.S., BADINGA, L. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F2 production by bovine endometrial cells. **Journal of Dairy Science**, 89: 971–977, 2006.

CANOVAS, S; ROSS PJ; KELSEY, G; COY, P. DNA methylation in embryo development: epigenetic impact of ART (assisted reproductive technologies). **Bioessays**, v. 39, 1700106, 2017.

CHENG, Y; GREEN, JA; ANTONIOU, E; EALY, AD; MATHIALAGAN, N.; WALKER, AM; AVALLE, MP; ROSENFELD, CS; HEARNE, LB; ROBERTS, RM. Effect of interferon-tau administration on endometrium of non-pregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. **Endocrinology**, 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. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1633, n. 3, p. 170–178, 2003.

CHENG, Z.; ROBINSON, R.S.; PUSHPAKUMARA, P.G.A. et al. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on uterine prostaglandin synthesis in the cow. **Journal of Endocrinology**, v.171, p.463-473, 2001.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 98, n. 24, p. 13734–13738, 2001.

DESHMUKH, RS; OSTRUP, O; OSTRUP, E; VEJLSTED, M; NIEMANN, H; LUCAS-HAHN, A. DNA methylation in porcine preimplantation embryos developed in vivo and produced by in vitro fertilization, parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transfer. **Epigenetics**, v. 6, p. 177-87, 2011.

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.

FORTIER, M. A.; KRISHNASWAMY, K.; DANYOD, G.; BOUCHER-KOVALIK, S.; J.A CHAPDELAINE, P. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. **Prostaglandins**, [s.l.], 65–89, 2008.

GABLER, C.; ODAU, S.; MULLER, K.; SCHON, J.; BONDZIO, A.; EINSPANIER, R. Exploring cumulus–oocyte- complex–oviductal cell interactions: gene profiling in the bovine oviduct. **J. Physiol. Pharmacol.**, [s.l.], v. 59, p. 29–42, 2008.

GAO, H; WU, G; SPENCER, TE; JOHNSON, GA, BAZER, FW. Select nutrients in the ovine uterine lumen. II. Glucose transporters in the uterus and peri-implantation conceptuses. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 94-104, 2009.

GIFFORD, CA; ASSIRI, AM; SATTERFIELD, MC; SPENCER, TE; OTT, TL. Receptor transporter protein 4 (RTP4) in endometrium, ovary, and peripheral blood leukocytes of pregnant and cyclic ewes. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 518-524, 2008.

GIFFORD, CA; RACICOT, K; CLARK, DS; AUSTIN, KJ; HANSEN, TR; LUCY, MC, DAVIES, CJ; OTT, TL. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, non-pregnant dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 274-280. 2007.

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

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. Bovine Placental Prostaglandin Synthesis: Principal Cell Synthesis as Modulated by the Binucleate Cell. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1027–1034, 1988.

GRYCMACHER, K.; BORUSZEWSKA, D.; SINDEREWICZ, E.; KOWALCZYK-ZIĘBA, I.; STASZKIEWICZ-CHODOR, J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I. Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) production possibility and its receptors expression in the early- and late-cleaved preimplantation bovine embryos. **BMC Vet. Res.**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 203, jun. 2019.

HERMANN, A.; GOWHER, H.; JELTSCH, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v.61, p.2571- 2587, 2004.

HIENDLEDER, S.; WIRTZ, M.; MUND, C.; KLEMPT, M.; REICHENBACH, H. D.; STOJKOVIC, M.; WEPPERT, M.; WENIGERKIND, H.; ELMLINGER, M.; LYKO, F.; SCHMITZ, O. J.; WOLF, E. Tissue-Specific Effects of In Vitro Fertilization Procedures on Genomic Cytosine Methylation Levels in Overgrown and Normal Sized Bovine Fetuses. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 17–23, 2006.

HUGHES, C. K.; XIE, M. M.; MCCOSKI, S. R.; EALY, A. D. Activities for leptin in bovine trophoblast cells. **Domest. Anim. Endocrinol.**, [s.l.], v. 58, p. 84-89, 2017.

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

INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **J. Anim. Sci.**, [s.l.], v. 82, E-Suppl, E24–E39, 2004.

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

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

KIMURA, K.; SPATE, L. D.; GREEN, M. P.; MURPHY, C. N.; SEIDEL, G. E.; ROBERTS, R. M. Sexual Dimorphism in Interferon- τ Production by In Vivo-Derived Bovine Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 193–199, 2004.

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.**, v. 46, p. 904-910, 2011.

LEWIS, G. S. Prostaglandin secretion by the blastocyst. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, [s.l.], v. 37, p. 261-267, 1989.

LI, W; GOOSSENS, K; VAN POUCKE, M; FORIER, K; BRAECKMANS, K; VAN SOOM, A. High oxygen tension increases global methylation in bovine 4-cell embryos and blastocysts but does not affect general retrotransposon expression. **Reprod Fertil Dev**, v. 28, p. 948-59, 2016.

LI, Y; ZHANG, Z; HE, C; ZHU, K; XU, Z; MA, T. Melatonin protects porcine oocyte in vitro maturation from heat stress. **J Pineal Res**, v. 59, p. 365-75, 2015.

LIANG, X. W.; GE, Z. J.; WEI, L.; GUO, L.; HAN, Z. M.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. The effects of postovulatory aging of mouse oocytes on methylation and expression of imprinted genes at mid-term gestation. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 562–567, 2011. a.

LIANG, X. W.; GE, Z. J.; WEI, L.; GUO, L.; HAN, Z. M.; SCHATTEN, H.; SUN, Q. Y. The effects of postovulatory aging of mouse oocytes on methylation and expression of imprinted genes at mid-term gestation. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 562–567, 2011. b.

LIANG, X-W; GE, Z-J; GUO L; HAN, Z-M; SCHATTEN, H. The effects of postovulatory aging of mouse oocytes on methylation and expression of imprinted genes at mid-term gestation. **MHR: Basic Sci Reprod Med**, v. 17, p. 562-567, 2011.

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.

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

MAREI, W. F.; WATHES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, [s. l.], v. 139, n. 6, p. 979–988, 2010.

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

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; STAPLES, CR; THATCHER WW. Polynsaturated 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. **Bioogy of Reproduction**, v. 69, p. 780-787, 2003.

MEIER, S.; LEDGARD, A. M.; SATO, T. A.; PETERSON, A. J.; MITCHELL, M. D. Polyunsaturated fatty acids differentially alter PGF₂ α and PGE₂ release from bovine trophoblast and endometrial tissues during short-term culture. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 111, n. 2–4, p. 353–360, 2009.

MIYAMOTO, Y.; JAN SKARZYNSKI, D.; OKUDA, K. Is Tumor Necrosis Factor a Trigger for the Initiation of Endometrial Prostaglandin F₂ Release at Luteolysis in Cattle. **Biology of Reproduction**. [s.l: s.n.].

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

MURAKAMI, S.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Effects of tumor necrosis factor- α on secretion of prostaglandins E₂ and F₂ α in bovine endometrium throughout the estrous cycle. **Theriogenology**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 1667–1678, 2001.

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

NAZRI, H. M.; GREAVES, E.; QUENBY, S.; DRAGOVIC, R.; TAPMEIER, T. T.; BECKER, C. M. The role of small extracellular vesicle-miRNAs in endometriosis. **Human Reproduction**, [s. l.], 2023.

NIKOLOFF, N.; CAMPAGNA, A.; LUCHETTI, C.; CARRANZA-MARTÍN, A. C.; PASCUA, A. M.; ANCHORDOQUY, J. M.; ANCHORDOQUY, J. P.; LOMBARDO, D. M.;

SEOANE, A.; FURNUS, C. C. Effects of EPA on bovine oocytes matured in vitro with antioxidants: Impact on the lipid content of oocytes and early embryo development. **Theriogenology**, [s. l.], v. 146, p. 152–161, 2020.

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.

NUTTINCK, F.; GALL, L.; RUFFINI, S.; LAFFONT, L.; CLEMENT, L.; REINAUD, P.; ADENOT, P.; GRIMARD, B.; CHARPIGNY, G.; GUIENNE, B. M. Le. PTGS2-Related PGE2 Affects Oocyte MAPK Phosphorylation and Meiosis Progression in Cattle: Late Effects on Early Embryonic Development. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 1248–1257, 2011.

NUTTINCK, F.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; CLÉMENT, L.; REINAUD, P.; CHARPIGNY, G.; GRIMARD, B. Expression of genes involved in prostaglandin E2 and progesterone production in bovine cumulus–oocyte complexes during in vitro maturation and fertilization. **Reproduction**, [s. l.], v. 135, n. 5, p. 593–603, 2008.

NUTTINCK, F.; REINAUD, P.; TRICOIRE, H.; VIGNERON, C.; PEYNOT, N.; MIALOT, J. P.; MERMILLOD, P.; CHARPIGNY, G. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 93–101, 2002.

OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a e Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, Cambridge, v.99, p.247-257, 1999.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family o novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nat. Genet.**, New York, v.19, p.219-220, 1998.

OLIVEIRA, M. L.; D'ALEXANDRI, F. L.; PUGLIESI, G.; VAN HOECK, 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. **Reprod. Fertil. Dev.**, [s.l.], v. 29, p. 544-556, 2017.

Organização para Alimentação e Agricultura (FAO). 2009. Como alimentar o mundo em 2050. Procedimentos da Reunião de Especialistas sobre Como Alimentar o Mundo em 2050. Roma: Sede da FAO.

PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; SIROIS, J.; FORTIER, M. A. Expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase in Bovine Endometrium: Coexpression with Cyclooxygenase Type 2 and Regulation by Interferon- τ . **Endocrinology**, [s. l.], v. 143, n. 8, p. 2936–2943, 2002.

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

POYSER, N. L. The Control of Prostaglandin Production by the Endometrium in Relation to Luteolysis and Menstruation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**. [s.l.: s.n.].

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 of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 470–474, 2006.

ROLNICHE, L., C., M. **Efeitos de diferentes ácidos graxos na síntese de PGF2 α e PGE2 em embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2024.110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Tecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Dracena, 2024.

SAINT-DIZIER, M.; GUYADER-JOLY, C.; CHARPIGNY, G.; GRIMARD, B.; HUMBLLOT, P.; PONTER, A. A. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in bovine *in vitro*-produced embryos. **Zygote**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 277–283, ago. 2011.

SALILEW-WONDIM, D.; SAEED-ZIDANE, M.; HOELKER, M.; GEBREMEDHN, S.; POIRIER, M.; PANDEY, H. O.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; HELD, E.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; RINGS, F.; FOURNIER, E.; GAGNÉ, D.; SIRARD, M. A.; ROBERT, C.; GAD, A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture before, during or after embryonic genome activation. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–19, 2018.

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

SEISENBERGER, S.; PEAT, JR; HORE, TA; SANTOS, F; DEAN, W; REIK W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. **Phil Trans Biol Sci**, v. 368, p. 20110330, 2013.

SMOCK, S. L.; PAN, L. C.; CASTLEBERRY, T. A.; LU, B.; MATHER, R. J.; OWEN, T. A. Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the gene encoding the human prostaglandin E2 receptor EP2 subtype. **Gene**, [s. l.], v. 237, n. 2, p. 393–402, 1999.

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

- SPONCHIADO, M.; GONELLA-DIAZA, A. M.; ROCHA, C. C.; TURCO, E. G. L.; PUGLIESI, G.; LEROY, J. L. M. R.; BINELLI, M. The pre-hatching bovine embryo transforms the uterine luminal metabolite composition *in vivo*. **Scientific Reports** **2019** **9:1**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.
- STAGGS, K. L.; AUSTIN, K. J.; JOHNSON, G. A.; GLAUCIA TEIXEIRA, M.; TALBOTT, C. T.; DOOLEY, V. A.; HANSEN, T. R. Complex Induction of Bovine Uterine Proteins by Interferon-Tau. **Biology of Reproduction**. [s.l.: s.n.].
- STAPLES, CR; BURKE, JM; THATCHER, WW. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 856-871, 1998.
- STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BOLLWEIN, H.; WRENZYCKI, C. Dimethylsulfoxide and conjugated linoleic acids affect bovine embryo development *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 502–510, 2014.
- 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 α in bovine endometrium during the estrous cycle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [s. l.], v. 78, n. 1–4, p. 279–290, 2005.
- THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C. R.; AMBROSE, J. D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 131-140, 1997.
- THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435-1450, 2001.
- ULBRICH, S. E.; SCHULKE, K.; GROEBNER, A. E.; REICHENBACH, H. D.; ANGIONI, C.; GEISSLINGER, G.; MEYER, H. H. D. Quantitative characterization of prostaglandins in the uterus of early pregnant cattle. **Reproduction**, [s.l.], v. 138, p. 371-382, 2009.
- VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, Champaign, v. 38, n. 4, p. 1-15, 2019.
- WANG, H. B.; WEN, Y.; MOONEY, S.; BEHR, B.; POLAN, M. L. Phospholipase A2 and cyclooxygenase gene expression in human preimplantation embryos. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, [s.l.], v. 87, p. 2629–2634, 2002.
- WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, [s.l.], v. 77, p. 190-201, 2007.

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.

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.

WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. **Reproductive BioMedicine Online**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 649–656, 2003.

YAQOOB, P.; CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. **Br. J. Nutr.**, [s.l.], v. 98, Suppl. 1, S41–S45, 2007.

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.