

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

**Letícia de Oliveira**

Médica Veterinária

**ÁCIDO OLEICO ALTERA A EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS  
ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS EM  
CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS BOVINAS  
CULTIVADAS *IN VITRO***

Dracena

2023

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

**Letícia de Oliveira**

Médica Veterinária

**ÁCIDO OLEICO ALTERA A EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS  
ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS EM  
CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS BOVINAS  
CULTIVADAS *IN VITRO***

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Dracena

2023

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

O482a

Oliveira, Letícia de.

Ácido oleico altera a expressão de transcritos envolvidos na síntese de prostaglandinas em células trofoblásticas bovinas cultivadas *in vitro* / Letícia de Oliveira. -- Dracena: [s.n.], 2023.

83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2023.

Orientadora: Claudia Maria Bertan Membrive

1. Trofoblasto. 2. Embriões. 3. Lipídios. 4. Prostaglandinas. 5. Bovinos. I. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas  
CRB 8/6665

## **IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE**

A adição de 1000  $\mu\text{M}$  de ácido oleico no meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas, aumenta a síntese de PGE2 e diminui PGF2 $\alpha$ ; eventos que colaboram com o maior êxito do estabelecimento da prenhez. Verificamos que o favorecimento de tal síntese decorre de alterações na abundância de transcritos envolvidos na síntese de PGE2 e PGF2 $\alpha$ .

## **EXPECTED IMPACT ON SOCIETY**

The addition of 1000  $\mu\text{M}$  of oleic acid to the culture medium of bovine trophoblastic cells increases the synthesis of PGE2 and decreases PGF2 $\alpha$ ; events that contributes to the greatest success in establishing pregnancy. We found that favoring such synthesis results from changes in the abundance of transcripts involved in the synthesis of PGE2 and PGF2 $\alpha$ .

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ácido oleico altera a expressão de transcritos envolvidos na síntese de prostaglandinas em células trofoblásticas bovinas *in vitro*

AUTORA: LETÍCIA DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

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



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



Documento assinado digitalmente  
JAQUELINE DALBELLO BILLER  
Data: 19/12/2023 15:39:52-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER (Participação Virtual)  
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT - Unesp - Câmpus de Dracena

Profa. Dra. MARIÂNGELA BUENO CORDEIRO MALDONADO (Participação Virtual)  
University of Florida



Dracena, 15 de dezembro de 2023

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Letícia de Oliveira**, nascida em 10 de abril de 1999, na cidade de Marília, no estado de São Paulo. Em 2017, ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade de Marília (Unimar), em Marília no estado de São Paulo, tendo concluído o mesmo em dezembro de 2021. Durante a Graduação, realizou estágio curricular no Laboratório de Fertilização *In Vitro* Central Senepol, na área de reprodução animal na cidade de Marília, estado de São Paulo; onde ingressou como auxiliar de laboratório em dezembro de 2021. Em janeiro de 2022, ingressou no curso de Mestrado acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal (PPGCTA) pela Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), na Unesp de Dracena no estado de São Paulo, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive.

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, que me sustentou para chegar até aqui. À minha mãe, **Célia Oliveira**, pelo apoio e incentivo ao longo de toda a trajetória. Ao meu pai, **Rinaldo Barbosa**, por todo carinho e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

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

Agradeço a minha família, **Rinaldo Barbosa de Oliveira**, **Célia de Fátima de Oliveira** e **Leonardo Gava Coluci**, pelo apoio incondicional e suporte em todos os momentos da minha trajetória acadêmica.

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

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

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

A minha orientadora **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**, que aceitou orientar a minha dissertação de mestrado revelando uma especial delicadeza e atenção no trato. Agradeço aos seus conselhos e sugestões bem como a permanente valorização do trabalho desenvolvido nesta dissertação.

A **Ms. Isabella Rio Feltrin**, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia, do Instituto de Biociências, da UNESP Câmpus de Botucatu, pela enorme colaboração na execução do RT-PCR e nas análises estatísticas dos dados.

Aos meus amigos, **Saara Scolari Scaramuzza**, **Josiane Caobianco Dias Zucoloto** e **Wanderley Teixeira Zucoloto**. Graças a vocês a minha trajetória foi mais gratificante.

Ao **Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE)** e a todos os seus integrantes. Agradeço o apoio de todos os membros.

“O único lugar onde sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

**Albert Einsten**

## RESUMO

Em rebanhos bovinos de corte, falhas no reconhecimento materno fetal (RMF) ocasionadas especialmente pela inabilidade do conceito em bloquear a síntese de prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) endometrial, entre os dias 15 e 17 após a fecundação, determinam a mortalidade embrionária precoce (MEP). A MEP constitui uma das maiores causas de falhas reprodutivas. Para que o RMF seja bem sucedido torna-se fundamental a manutenção funcional e estrutural do corpo lúteo (CL) e de altas concentrações circulantes de progesterona (P4). O interferon-tau (IFNT) constitui a principal molécula envolvida no sucesso do RMF. Reconhecidamente a  $PGF2\alpha$  possui ações luteolíticas que promovem a falência funcional e estrutural do CL. A prostaglandina E2 (PGE2) e o IFNT associados, agem por um conjunto de ações luteotróficas no CL, que determinam a manutenção do CL e a síntese de P4. Estratégias para favorecer RMF objetivam reduzir a capacidade de síntese de  $PGF2\alpha$  e/ou aumentar a síntese de PGE2 e/ou aumentar a razão PGE2/ $PGF2\alpha$ . Tais prostaglandinas (PG) são sintetizadas pelo endométrio materno, embrião e conceito (embrião e membranas anexas). O ácido oleico (AO; C18:1 cis-9) reconhecidamente determina modificações na via metabólica de biossíntese de eicosanóides, incluindo as PG. Em um estudo recente realizado pelo grupo (LOURENÇO, 2022), células trofoblásticas bovinas (CT-1) foram cultivadas com AO nas concentrações de 0, 50, 100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  durante 72 horas, onde na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  observou-se uma redução na síntese de  $PGF2\alpha$ , aumento na síntese de PGE2, embora não tenha sido verificado um aumento na razão PGE2/ $PGF2\alpha$ . A hipótese é que a suplementação com AO aumenta a abundância dos transcritos PTGES1, PTGES2, PTGER4, PTGS2, IFNT, MMP2 e diminui a abundância dos transcritos MMP9 e AKR1B1. Para tanto, objetiva-se determinar os efeitos do AO (C18:1 cis-9; Sigma-Aldrich O1383) nas concentrações de 0, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  durante 72 horas de cultivo, na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de PG (PTGS2, AKR1B1, PTGES1, PTGES2 e PTGER4), no RMF (IFNT) e na implantação placentária e remodelação da matriz extracelular (MMP2 e MMP9) pela técnica de RT-qPCR. As CT-1 foram cultivadas em placas de 6 poços com meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), incubadas a 38,5°C com 5%  $\text{CO}_2$ . Depois de cinco dias de cultivo, as CT-1 receberam meio de cultivo sem SFB. Então, no 6º dia de cultivo, os poços receberam 4 mL de meio de cultivo sem SFB contendo AO nas concentrações 0, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  durante 72 horas. Ao término do cultivo, as células foram lavadas com DPBS e o RNA foi extraído com 1mL/poço de Trizol. Amostras foram armazenadas a -80°C e posteriormente analisadas por RT-qPCR. Foram realizadas cinco repetições experimentais. A análise estatística foi conduzida usando o PROC MIXED do SAS, por ANOVA usando o efeito fixo de tratamento, assumindo significância quando  $P \leq 0,05$ . A expressão relativa de PTGER4 foi menor nos grupos 500 e 1000  $\mu\text{M}$  comparado ao controle ( $0,0320 \pm 0,0097$  e  $0,0292 \pm 0,0106$  vs.  $0,0695 \pm 0,0097$  respectivamente;  $P = 0,0154$ ) não tendo tais grupos diferido do grupo 100  $\mu\text{M}$  ( $0,0546 \pm 0,0106$ ); a de PTGES1 foi maior nos grupos 500 e 1000  $\mu\text{M}$  comparado ao controle ( $4,6370 \pm 0,3782$  e  $5,1669 \pm 0,3782$  vs.  $3,5120 \pm 0,3782$  respectivamente;  $P = 0,0272$ ) não tendo tais grupos diferido do grupo 100  $\mu\text{M}$  ( $4,2088 \pm 0,4177$ ). Os níveis de expressão relativa de AKR1B1 foi menor ( $P = 0,0013$ ) nos grupos 500 e 1000  $\mu\text{M}$  ( $0,2725 \pm 0,0413$  vs.  $0,2084 \pm 0,0413$  respectivamente) comparado aos grupos controle e 100  $\mu\text{M}$  ( $0,4433 \pm 0,0413$  e  $0,4039 \pm 0,0451$  respectivamente); e os de IFNT foram menores ( $P = 0,0013$ ) nos grupos 500 e 1000  $\mu\text{M}$  ( $0,2986 \pm 0,0450$  e  $0,2300 \pm 0,0450$  respectivamente) quando comparados aos

grupos controle e 100  $\mu\text{M}$  ( $0,4852 \pm 0,0450$  e  $0,4422 \pm 0,0491$  respectivamente). Conclui-se que o cultivo de CT-1 com AO nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{M}$  durante 72 horas, aumenta abundância do transcrito PTGES1 e diminui a abundância para PTGER4, AKR1B1 e IFNT comparado ao grupo controle.

**Palavras-chave:** Trofoblasto. Embriões. Lipídios. Prostaglandinas. Bovinos.

## ABSTRACT

In beef cattle herds, failures in maternal fetal recognition (MFR), caused especially by the inability of the conceptus to block the synthesis of endometrial prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), between days 15 and 17 after fertilization, determine early embryonic mortality (EEM). EEM is one of biggest causes of reproductive failure. For RMF to be successful, the functional and structural maintenance of the corpus luteum (CL) is essential, as well as the maintenance of high circulating concentrations of progesterone (P4). Interferon-tau (IFNT) is the main molecule involved in the success of RMF. PGF2 $\alpha$  is known to have luteolytic actions, promoting functional and structural failure of the CL. Prostaglandin E2 (PGE2) and the associated IFNT determine a set of luteotrophic actions in the CL, determining the maintenance of the CL and the synthesis of P4. Strategies to favor MFR aim to reduce the capacity for PGF2 $\alpha$  synthesis and/or increase PGE2 synthesis and/or increase the PGE2/PGF2 $\alpha$  ratio. Such prostaglandins (PG) are synthesized by the maternal endometrium, embryo and conceptus (embryo and attached membranes). Oleic acid (OA; C18:1 cis-9) is known to determine changes in the metabolic pathway of eicosanoid biosynthesis, including PG. In a recent study carried out by the group (LOURENÇO, 2022), bovine trophoblastic cells (CT-1) were cultured with OA at concentrations of 0, 50, 100, 200, 500 and 1000  $\mu$ M for 72 hours, where at a concentration of 1000  $\mu$ M a reduction in the synthesis of PGF2 $\alpha$  was observed, an increase in the synthesis of PGE2, although an increase in the PGE2/PGF2 $\alpha$  ratio was not observed. The hypothesis is that OA supplementation increases transcript abundance of PTGES1, PTGES2, PTGER4, PTGS2, IFNT, MMP2 and decreases transcript abundance of MMP9 and AKR1B1. To this end, the objective is to determine the effects of OA (C18:1 cis-9; Sigma-Aldrich O1383) at concentrations of 0, 100, 500 and 1000  $\mu$ M during 72 hours of cultivation, on the expression of transcripts involved in PG biosynthesis (PTGS2, AKR1B1, PTGES1, PTGES2 and PTGER4) in MFR (IFNT) and in placental implantation and remodeling of the extracellular matrix (MMP2 and MMP9) using RT-qPCR technique. CT-1 were cultured in plates with six well with cultured medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), incubated 38,5°C with 5% CO<sub>2</sub>. After five days of cultivation, CT-1 received culture medium without FBS. Then, on the sixth day of culture, the wells received 4 mL of culture medium without FBS containing OA at concentrations of 0, 100, 500 and 1000  $\mu$ M for 72 hours. At the end of cultivation, cells were washed with DPBS and RNA was extracted with 1 mL/well of Trizol. Samples were stored at - 80°C and later analyzed by RT-qPCR. Five experimental repetitions were performed. Statistical analysis was conducted using PROC MIXED from SAS, by ANOVA using the fixed effect of treatment, assuming significance when  $P \leq 0.05$ . The relative expression of PTGER4 was lower in the 500 and 1000  $\mu$ M groups compared to the control ( $0.0320 \pm 0.0097$  and  $0.0292 \pm 0.0106$  vs.  $0.0695 \pm 0.0097$  respectively;  $P = 0.0154$ ) with these groups not differing from the 100  $\mu$ M group ( $0.0546 \pm 0.0106$ ). The relative expression of PTGES1 was higher in the 500 and 1000  $\mu$ M groups compared to the control ( $4.6370 \pm 0.3782$  and  $5.1669 \pm 0.3782$  vs.  $3.5120 \pm 0.3782$  respectively;  $P = 0.0272$ ) with these groups not differing from the 100  $\mu$ M group ( $4.2088 \pm 0.4177$ ). The levels of AKR1B1 relative expression were lower ( $P = 0.0013$ ) in the 500 and 1000  $\mu$ M groups ( $0.2725 \pm 0.0413$  vs.  $0.2084 \pm 0.0413$  respectively) compared to the control and 100  $\mu$ M groups ( $0.4433 \pm 0.0413$  and  $0.4039 \pm 0.0451$  respectively); and the levels of IFTN were lower ( $P = 0.0013$ ) in the 500 and 1000  $\mu$ M groups ( $0.2986 \pm 0.0450$  and  $0.2300 \pm 0.0450$  respectively) when compared to the control and 100  $\mu$ M groups ( $0.4852 \pm 0.0450$  and  $0.4422 \pm 0.0491$  respectively). It is concluded that CT-1 culture

with OA at concentrations of 500 and 1000  $\mu$ M for 72 hours increases the PTGES1 transcript abundance and decreases the quantity of PTGER4, AKR1B1, and IFNT compared to the control group.

**Keywords:** Trophoblast. Embryos. Lipids. Prostaglandins. Bovines.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Mecanismos envolvidos na regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (Painel A) e na manutenção estrutural e funcional do corpo lúteo, durante o reconhecimento materno fetal (Painel B)..... | 31 |
| Figura 2 - Desenho esquemático representando a síntese de prostaglandinas na célula endometrial.....                                                                                                         | 33 |
| Figura 3 – Modelo da síntese de prostaglandina F2 $\alpha$ e E2 pelo embrião.....                                                                                                                            | 38 |
| Figura 4 – Células CT-1.....                                                                                                                                                                                 | 51 |
| Figura 5 - Placas de cultivo.....                                                                                                                                                                            | 52 |
| Figura 6 - Preparo das soluções de trabalho em diferentes concentrações de AO (Sigma-Aldrich, USA, Cat n° O1383).....                                                                                        | 53 |
| Figura 7 - Representação esquemática dos tratamentos de AO realizados nas CT-1.....                                                                                                                          | 54 |
| Figura 8 - Expressão relativa do receptor 4 da prostaglandina E (PTGER4) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000 $\mu$ M de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR.....                    | 58 |
| Figura 9 - Expressão relativa da Prostaglandina E sintase 1 (PTGES1) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000 $\mu$ M de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR.....                        | 59 |
| Figura 10 - Expressão relativa da família aldo-ceto redutase membro B1 (AKR1B1) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000 $\mu$ M de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR.....             | 60 |
| Figura 11 - Expressão relativa do interferon-tau (IFNT) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000 $\mu$ M de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR.....                                     | 61 |
| Figura 12 - Expressão relativa da Prostaglandina E sintase 2 (PTGES2) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000 $\mu$ M de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR.....                       | 62 |
| Figura 13 - Expressão relativa da Prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGS2) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000 $\mu$ M de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR.....             | 63 |

Figura 14 - Expressão relativa da matriz metalopeptidase 2 (MMP2) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu$ M de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR..... 64

Figura 15 - Expressão relativa da matriz metalopeptidase 9 (MMP9) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu$ M de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR..... 65

Figura 16 - Sumarização dos principais resultados. O cultivo de CT-1 com ácido oleico nas concentrações de 500 e 1000  $\mu$ M durante 72 horas, aumenta abundância do transcrito PTGES1 e diminui a abundância para PTGER4, AKR1B1 e IFNT e não altera a abundância de PTGS2, PTGES2, MMP2 e MMP9..... 66

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 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..... | 56 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |                                           |
|--------|-------------------------------------------|
| AA     | Ácido araquidônico                        |
| AER    | Abortos espontâneos recorrentes           |
| AGL    | Ácidos graxos livres                      |
| AGPI   | Ácidos graxos poliinsaturados             |
| AKRs   | Aldo-ceto redutases                       |
| AKR1B1 | Família aldo-ceto redutase membro B1      |
| AKR1C3 | Família aldo-ceto redutase membro C3      |
| AKR1C4 | Família aldo-ceto redutase membro C4      |
| AL     | Ácido linoleico                           |
| ALA    | Ácido linolênico                          |
| AO     | Ácido oleico                              |
| BSA    | Albumina sérica bovina                    |
| CL     | Corpo lúteo                               |
| CLA    | Ácido linoleico conjugado                 |
| COX 1  | Cicloxygenase 1                           |
| COX 2  | Cicloxygenase 2                           |
| CT-1   | Células trofoblásticas                    |
| DNA    | Ácido desoxirribonucleico                 |
| DHA    | Ácido docosaheptaenóico                   |
| ELISA  | Ensaio de imunoabsorção enzimática        |
| EPA    | Ácido eicosapentaenóico                   |
| IA     | Inseminação artificial                    |
| IATF   | Inseminação artificial em tempo fixo      |
| IFNT   | Interferon- $\tau$                        |
| ISGs   | Genes estimulados pelo Interferon- $\tau$ |
| MEC    | Matriz extracelular                       |
| MEP    | Mortalidade embrionária precoce           |
| MMPs   | Matriz metalopeptidases                   |
| MMP2   | Matriz metalopeptidase 2                  |
| MMP9   | Matriz metalopeptidase 9                  |
| MUFA   | Ácidos graxos monoinsaturados             |

|                  |                                                |
|------------------|------------------------------------------------|
| OT               | Ocitocina                                      |
| OXTR             | Receptor de ocitocina                          |
| P4               | Progesterona                                   |
| PGF2 $\alpha$    | Prostaglandina F2 $\alpha$                     |
| PGD2             | Prostaglandina D2                              |
| PGE2             | Prostaglandina E2                              |
| PGG2             | Hidroperóxido prostaglandina G2                |
| PGH2             | Prostaglandina H2                              |
| PGI2             | Prostaglandina I2                              |
| PGs              | Prostaglandinas                                |
| PIVE             | Produção <i>in vitro</i> de embriões           |
| PKA              | Proteína quinase A                             |
| PKC              | Proteína quinase C                             |
| PLA2G10          | Fosfolipase A2 grupo 10                        |
| PTGER2           | Receptor de prostaglandina E tipo 2            |
| PTGER4           | Receptor de prostaglandina E tipo 4            |
| PTGES1           | Prostaglandina E sintase 1                     |
| PTGES2           | Prostaglandina E sintase 2                     |
| PTGES3           | Prostaglandina E sintase 3                     |
| PTGFR            | Receptor de prostaglandina F                   |
| PTGS1            | Prostaglandina-endoperóxido sintase 1          |
| PTGS2            | Prostaglandina-endoperóxido sintase 2          |
| qPCR             | Reação em cadeia pela polimerase em tempo real |
| RMF              | Reconhecimento materno fetal                   |
| RMP              | Reconhecimento materno da prenhez              |
| RNA              | Ácido ribonucleico                             |
| RNA <sub>m</sub> | RNA mensageiro                                 |
| RT               | Transcrição reversa                            |
| SFB              | Soro fetal bovino                              |
| TETF             | Transferência de embrião em tempo fixo         |
| TIMPs            | Inibidores teciduais das MMPs                  |
| TXA2             | Tromboxano A2                                  |
| VEGF             | Fator de crescimento endotelial vascular       |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|    |               |
|----|---------------|
| °C | Graus Celsius |
| μM | Micromolar    |
| μg | Microgramas   |
| ml | Microlitros   |
| ng | Nanograma     |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                   | 23 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                        | 26 |
| 2.1 Mortalidade Embrionária Precoce em Fêmeas Bovinas .....                                                          | 26 |
| 2.2 Mecanismos Fisiológicos Envolvidos no Reconhecimento Materno-fetal .....                                         | 27 |
| 2.3 Biossíntese e Secreção de Prostaglandinas no Endométrio .....                                                    | 32 |
| 2.4 Biossíntese e Secreção de Prostaglandinas no Embrião .....                                                       | 35 |
| 2.5 Efeitos dos Ácidos Graxos na Síntese de Prostaglandinas .....                                                    | 39 |
| 2.6 Efeitos dos Ácidos Oleico e Linoleico em Oócitos e Embriões .....                                                | 42 |
| 2.7 Ação da Matriz Metalopeptidase .....                                                                             | 44 |
| 3 HIPÓTESE .....                                                                                                     | 47 |
| 4 OBJETIVOS .....                                                                                                    | 48 |
| 4.1 Objetivo Geral .....                                                                                             | 48 |
| 4.2 Objetivos Específicos .....                                                                                      | 48 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                           | 48 |
| 5.1 Local do Experimento .....                                                                                       | 48 |
| 5.2 Origem das Células Trofoblásticas Bovinas (Linhagem CT-1) .....                                                  | 48 |
| 5.3 Preparação da Matriz de Membrana Basal Matrigel para o Início do Cultivo Celular .....                           | 49 |
| 5.4 Propagação das CT-1 .....                                                                                        | 50 |
| 5.5 Preparo da Solução Estoque de AO e das Soluções com as Diferentes Concentrações Utilizadas nos Tratamentos ..... | 52 |
| 5.6 Aplicação dos Tratamentos com AO .....                                                                           | 53 |
| 5.7 Delineamento Experimental .....                                                                                  | 53 |
| 5.8 Extração de RNA .....                                                                                            | 54 |
| 5.9 Síntese de cDNA .....                                                                                            | 55 |
| 5.10 Seleção e Validação dos Primers .....                                                                           | 55 |
| 5.11 Análise da Abundância dos Transcritos .....                                                                     | 57 |
| 5.12 Análise Estatística .....                                                                                       | 57 |
| 6 RESULTADOS .....                                                                                                   | 58 |
| 6.1 Expressão Relativa de PTGER4 .....                                                                               | 58 |
| 6.2 Expressão Relativa de PTGES1 .....                                                                               | 59 |
| 6.3 Expressão Relativa de AKR1B1 .....                                                                               | 60 |
| 6.4 Expressão Relativa de IFNT .....                                                                                 | 61 |
| 6.5 Expressão Relativa de PTGES2 .....                                                                               | 62 |
| 6.6 Expressão Relativa de PTGS2 .....                                                                                | 63 |
| 6.7 Expressão Relativa de MMP2 .....                                                                                 | 64 |
| 6.8 Expressão Relativa de MMP9 .....                                                                                 | 65 |

|                    |    |
|--------------------|----|
| 7 DISCUSSÃO .....  | 67 |
| 8 CONCLUSÃO.....   | 70 |
| 9 REFERÊNCIAS..... | 71 |

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce de forma proporcional ao aumento da população. O Brasil possui alta representatividade quando se trata da atual e futura produção de alimentos. Em busca de alcançar o máximo de êxito no que se refere aos 17 objetivos preconizados pela Organização das Nações Unidas (ONU) até 2030 especialmente "Fome Zero, Consumo e Produção Responsável, Ação Climática e Vida na Terra"; o Brasil busca ferramentas para a produção mais eficiente de alimentos, incluindo a produção de proteína vegetal e animal. A produção mundial de carne bovina atingiu 73,9 milhões de toneladas em 2022, um aumento de 1,4% em relação a 2021. Durante dois anos consecutivos, o Brasil registrou um aumento de 5,3% na produção de carne bovina devido à maior disponibilidade de animais para abate, aumento global das importações e aumento nos preços internacionais da carne bovina (FAO, 2022). Em 2022, o rebanho bovino brasileiro foi estimado em 234,4 milhões de animais, contabilizando uma alta de 4,3% em relação a 2021. Os dados constam da Pesquisa Produção da Pecuária Municipal 2022 divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Durante o primeiro semestre de 2023, as exportações de carne bovina no Brasil atingiram a 1.076.780 toneladas, totalizando uma receita de US\$ 4,937 bilhões (ABRAFRIGO, 2023). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2022) reconheceu o rebanho bovino brasileiro como o maior do mundo.

Na bovinocultura de corte, a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, que devem apresentar um intervalo entre partos de 12 meses, gerando a produção de um bezerro/matriz/ano. A eficiência da fase de cria é mensurada pelos quilos de bezerros desmamados por vaca ou por hectare. Assim, além da produção de um bezerro/vaca/ano almeja-se melhorar a base genética dos produtos nascidos, contribuindo assim para um maior peso dos bezerros ao desmame. Dessa forma, para que a bovinocultura brasileira supere os índices atuais de produtividade, além da eficiência reprodutiva, o melhoramento genético precisa ser priorizado. Tais requisitos têm alavancado o emprego de biotecnologias aplicadas à reprodução animal, como por exemplo, a inseminação artificial (IA). A IA possibilita a maximização do emprego de touros geneticamente superiores, sendo empregada em 23,5% das matrizes de corte no Brasil. Para otimizar o emprego da IA, foram desenvolvidos tratamentos que permitem a inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

de 100% das fêmeas tratadas em um momento pré-determinado, procedimento que exclui a necessidade da detecção de estros. Durante o primeiro trimestre de 2023, 3.604 municípios, equivalente a 64,7% dos municípios brasileiros empregaram a IA, em ambos rebanhos de corte e leite, demonstrando um emprego crescente de tal biotecnologia (ASBIA, 2023). Em 2022 foram comercializados 25.075.120 protocolos de IATF, em 2021 cerca de 93% das fêmeas inseminadas foram por IATF e em 2022 foi de 97,7%. Esses dados reforçam a consolidação do emprego da IATF no mercado de IA (BARUSELLI, 2023). A taxa de concepção em rebanhos de corte comerciais no Brasil com o emprego da IATF é de 49,1% (BARUSELLI *et al.*, 2008; SÁ FILHO *et al.*, 2009).

Considerando a importância no aumento da eficiência reprodutiva aliado ao melhoramento genético, o Brasil também se tornou líder mundial no emprego da técnica de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). A TETF aliada à produção *in vitro* de embriões (PIVE) constituem biotecnologias poderosas na rápida multiplicação de matrizes expoentes geneticamente superiores. Em 2019, o Brasil consagrou-se como o 2º maior produtor de embriões bovinos do mundo, sendo que 93,8% dos embriões foram gerados pela PIVE (SBTE, 2021). Após a TETF nas receptoras, as taxas de concepção dificilmente superam 50%.

As técnicas envolvidas na PIVE têm avançado fortemente nos últimos anos, no entanto, as perdas embrionárias precoces ainda compõe uma significativa proporção a transferência destes embriões. Estudos apontam taxas de 46 a 63% para perdas gestacionais de embriões produzidos *in vitro* durante os primeiros 30 dias após a transferência de embrião (TAVERNE *et al.*, 2002). Além disso, embriões produzidos por PIVE são mais suscetíveis à mortalidade embrionária e fetal em comparação com embriões produzidos *in vivo* (EALY *et al.*, 2019).

Um dos principais fatores que comprometem o êxito da prenhez em fêmeas bovinas de corte é a mortalidade embrionária precoce, ocasionada por falhas no reconhecimento materno fetal (RMF), especificamente no período compreendido entre 15 e 17 dias após a fecundação (BINELLI *et al.*, 2001). Para o sucesso no estabelecimento da prenhez, o concepto (embrião e membranas anexas) deve produzir competentemente moléculas que ao interagirem com o endométrio irão inibir a síntese de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) e consequentemente 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 RMF na espécie bovina (ROBINSON *et al.*, 2006; EALY; YANG, 2009). Quando o conceito produz de maneira competente o IFNT, o endométrio suprime a síntese de  $\text{PGF2}\alpha$  enquanto favorece o aumento na síntese de prostaglandina E2 ( $\text{PGE2}$ ) no endométrio e células trofoblásticas do embrião e conceito. A  $\text{PGE2}$  exerce efeitos anti-luteolíticos e luteotróficos, ambos fundamentais para o êxito da prenhez (McCRACKEN *et al.*, 1999). O IFNT e a  $\text{PGE2}$ , por mecanismos luteotróficos, garantem a permanência do CL e manutenção de altas concentrações circulantes de  $\text{P4}$ , condição fundamental para o estabelecimento da prenhez (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  $\text{PGF2}\alpha$  e aumentar a síntese de  $\text{PGE2}$  pelo endométrio, embrião e/ou conceito se tornam de grande interesse econômico.

É reconhecido que o uso de diferentes ácidos graxos pode alterar a proporção de  $\text{PGF2}\alpha$  e  $\text{PGE2}$  produzidas nas células trofoblásticas de embriões e conceitos (HWANG *et al.*, 1988). Portanto, considerando o impacto das perdas econômicas ocasionadas pela MEP, a suplementação estratégica com lipídios específicos no meio de cultivo de oócitos e embriões durante a PIVE pode determinar uma diminuição da síntese de  $\text{PGF2}\alpha$  e/ou aumento da síntese de  $\text{PGE2}$  e na razão  $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$ .

Para o estudo da ação dos ácidos graxos específicos na síntese de  $\text{PGF2}\alpha$  e  $\text{PGE2}$  pelo embrião, inclusive o ácido oleico (AO), o grupo tem utilizado dois modelos biológicos, o cultivo de células trofoblásticas e embriões bovinos produzidos *in vitro*. Embora vários estudos tenham investigado o uso de AO em modelos *in vivo* e *in vitro*, os mecanismos de ação do AO são pouco conhecidos. Em um estudo recente realizado pelo grupo (LOURENÇO, 2022), células trofoblásticas bovinas (CT-1) foram cultivadas com AO nas concentrações de 0, 50, 100, 200, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  durante 72 horas. Com 72 horas de tratamento de CT-1 com 1000  $\mu\text{M}$ , foi verificada uma redução na síntese de  $\text{PGF2}\alpha$ , aumento na síntese de  $\text{PGE2}$ , embora não tenha sido ocasionado um aumento na razão  $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$ . Este estudo possibilitará uma maior compreensão dos mecanismos pelos quais o AO age determinando alterações na biossíntese de  $\text{PGE2}$  e  $\text{PGF2}\alpha$ .

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Mortalidade Embrionária Precoce em Fêmeas Bovinas

A limitada eficiência reprodutiva motivou um grande volume de pesquisas nas últimas décadas, que almejaram compreender e controlar o funcionamento do sistema reprodutor feminino. Obteve-se expressivo sucesso no tocante ao controle do processo ovulatório, de maneira que atualmente é possível programar inseminações de forma racional, econômica e efetiva. Entretanto, os eventos reprodutivos que ocorrem nas três semanas subsequentes ao acasalamento caracterizam falhas no estabelecimento da prenhez. Um dos principais fatores que compromete o êxito da prenhez em fêmeas bovinas de corte é a MEP, ocasionadas por falhas no RMF, especificamente no período compreendido entre 15 a 17 dias após a fecundação (BINELLI *et al.*, 2001).

Em rebanhos bovinos, a MEP é uma das maiores causas de falhas reprodutivas, conforme revisado por Santos *et al.* (2004) e Sartori (2004). Nos primeiros sete dias pós-inseminação tal mortalidade foi associada a falhas de fertilização, defeitos genéticos e anormalidades no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Neste referido período, a mortalidade normalmente é inferior a 10%, mas especificamente em vacas de leite sob estresse calórico pode ultrapassar 40% (SARTORI, 2004). De fato, segundo Vanroose *et al.* (2000) e dados obtidos do rebanho zebuíno no Estado de São Paulo (MACHADO *et al.*, 2009), em vacas de corte, 20 a 40% das falhas de concepção decorrem da MEP que ocorre nas três primeiras semanas de prenhez. Tal fato provavelmente decorra da grande complexidade dos eventos fisiológicos caracterizados nesse período.

O emprego da IATF e TETF, além de suas comprovadas vantagens, possibilita agrupar um grande número de fêmeas em um mesmo momento cronológico de RMP, especialmente entre os dias 15 e 19 considerado o “período crítico”. Tal coincidência temporal, permite o emprego de estratégias que possam favorecer o desenvolvimento embrionário e/ou do conceito, em um determinado momento do seu desenvolvimento, incrementando as taxas de concepção. Diante deste contexto, atualmente busca-se o desenvolvimento de estratégias que possam favorecer o RMP durante o período crítico. Tais estratégias, que se tornam de grande interesse econômico, objetivam

reduzir a capacidade de síntese de  $\text{PGF2}\alpha$  pelo endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo conceito.

## 2.2 Mecanismos Fisiológicos Envolvidos no Reconhecimento Materno-fetal

Após a fertilização, ocorre a formação de um zigoto, caracterizado por possuir uma única célula. A partir daí ocorrem diversas divisões celulares, processo denominado de clivagem (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Quando o embrião adquire de nove a dezesseis células, é denominado de mórula, momento em que passa por um processo de reprogramação caracterizado pela ativação do genoma embrionário, não dependendo mais das transcrições derivadas do oócito, mas sim impulsionado pela transcrição *de* suas células. Em bovinos, o embrião deixa o oviduto e entra no útero por volta do 4º dia após o estro, aproximadamente no estágio de 16 células onde continua o seu desenvolvimento (SIRARD, 2010).

Uma vez no útero, o embrião continua seu desenvolvimento formando uma estrutura compacta de células, conhecida como mórula, onde os blastômeros individuais não podem mais ser distinguidos com precisão. Os processos que levam à transformação da mórula a blastocisto, com 6 a 8 dias pós-fertilização, incluem: (i) o crescimento da blastocela caracterizada pela ativação da bomba de sódio nas células externas da mórula; e (ii) a diferenciação de duas populações celulares, o trofoblasto e a massa celular interna (FRANKENBERG *et al.*, 2016). O desenvolvimento de junções intercelulares compactas da mórula durante a compactação é seguida por acúmulo de fluido dentro da cavidade central, formando a blastocela, dando início assim ao estágio de blastocisto. Nos dias 9 e 11 pós-fertilização, devido às forças mecânicas exercidas pela expansão do blastocisto e pela produção de enzimas proteolíticas pelo trofoblasto, o blastocisto eclode rompendo a zona pelúcida (NEGRON-PEREZ *et al.*, 2017). No dia 13 pós-fertilização, o blastocisto passa por uma fase de alongamento logarítmico, passando de uma forma esférica com 3 mm no dia 13 para uma forma filamentosa de 25 cm no dia 17 (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O estabelecimento e a manutenção da prenhez requerem uma comunicação endócrina e parácrina recíproca entre os ovários, endométrio e conceito. Em fêmeas bovinas, entre 14 a 16 dias de desenvolvimento, modificações morfológicas nas células trofoblásticas aliadas ao aumento de proliferação das mesmas, transformam

o conceito esférico em uma estrutura alongada de forma filamentosa que ocupa a maioria da extensão do corno uterino ipsolateral a ovulação (ROBINSON *et al.*, 2006). A rápida expansão das células trofoblásticas favorecem o aumento da área de superfície de contato de tais células com o epitélio uterino. Considera-se que quanto maior o alongamento e comprimento do conceito, maior a expansão das células trofoblásticas e consequentemente maior a biossíntese e secreção de IFNT. A produção de IFNT aumenta dramaticamente de 14 a 15 dias de prenhez coincidindo com a rápida alongação do conceito, expressão que diminui abruptamente depois de 21 dias de prenhez (ROBINSON *et al.*, 2006).

Durante o alongamento, o conceito é nutrido exclusivamente pela secreção epitelial endometrial, condição que persiste até que ocorra o estabelecimento da placentação. A adesão das células trofoblásticas ao útero não é evidenciada até 19 a 21 dias de prenhez. Para compor a secreção epitelial endometrial ocorre o transporte seletivo de moléculas, especialmente fatores de crescimento, íons, glicose e aminoácidos para o lúmen uterino (SPENCER *et al.*, 2004a; SPENCER *et al.*, 2007). Esse grande conjunto de moléculas irá constituir o histotrofo, caracterizado como a única fonte nutritiva para a proliferação das células trofoblásticas e alongação do conceito (THATCHER *et al.*, 2001; INSKEEP; DAILEY, 2005). Assume-se que quanto mais enriquecido o histotrofo, maiores são as possibilidades de alongamento e produção de IFNT pelo conceito.

O IFNT secretado pelas células trofoblásticas exerce por mecanismos parácrinos, a função de prevenção da secreção pulsátil de  $\text{PGF2}\alpha$  (SPENCER *et al.*, 2004b; SPENCER *et al.*, 2007). As ações do IFNT no RMP foram relacionadas por Arosh *et al.* (2016) e Pate (2020). A ação parácrina do IFNT inicia-se no momento da sinalização, quando o IFNT secretado no lúmen uterino se liga aos seus receptores (IFNR) na membrana das células endometriais. Tais receptores são constituídos por duas subunidades (IFNR1 e IFNR2). A ligação do IFNT ao IFNR inicia a cascata de sinalização JAK/STAT, que resulta na formação do fator de transcrição ISGF3, que é transportado ao núcleo da célula onde inibe a transcrição gênica dos receptores de estradiol (ER) e consequentemente a formação dos receptores de ocitocina (OXTRs). A ausência de OXTRs impede que a OT se ligue aos seus receptores, desta forma inibindo a síntese e a ocorrência dos pulsos de  $\text{PGF2}\alpha$  endometrial, impedindo a luteólise. A inibição da síntese de  $\text{PGF2}\alpha$  e da luteólise pelo IFNT é o mecanismo chave para o êxito do RMP. O IFNT, nas células do estroma e do epitélio endometrial

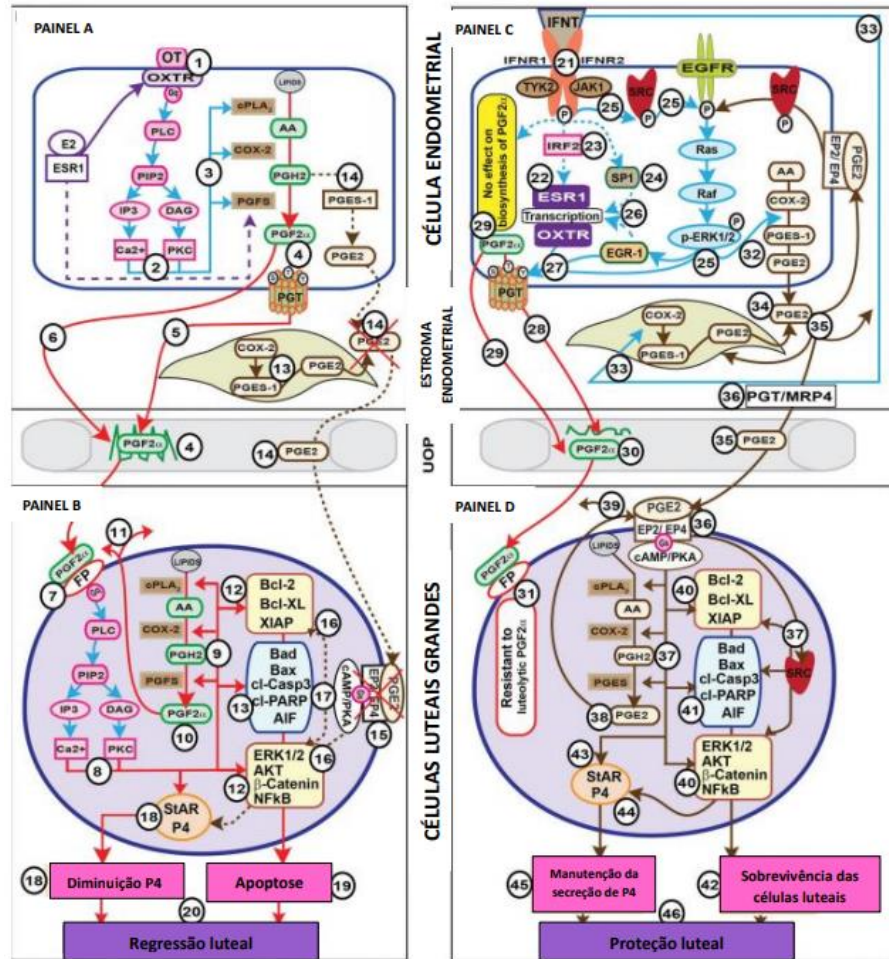
ainda aumenta a síntese de PGE<sub>2</sub>, onde atua desfavorecendo a via que forma PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e favorecendo a via de síntese da PGE<sub>2</sub>. O IFNT também age aumentando os receptores de PGE<sub>2</sub> nas células endometriais.

Conforme ilustrado na **Figura 1**, segundo Arosh *et al.* (2016) e Pate (2020), na ação endócrina o IFNT produzido pelo conceito no lúmen uterino é transportado para a veia uterina, onde pode seguir dois caminhos: A) o IFNT vai para a circulação sistêmica onde estimula nas células imunes a expressão dos genes específicos (genes específicos estimulados pelo IFNT; ISGs); B) o IFNT, pela via de transporte por contracorrente, passa da veia uterina para a artéria ovariana chegando ao ovário onde irá promover um conjunto ações no CL. No CL o IFNT exerce várias funções: A) aumenta a proliferação celular; B) estimula a expressão de genes que promovem o aumento da secreção de P<sub>4</sub> no CL; C) promove a sobrevivência das células endoteliais mantendo a perfusão sanguínea do CL e D) aumenta o RNAm para as proteínas que medeiam a angiogênese. Assim, o IFNT desfavorece no CL a luteólise funcional. O IFNT ainda promove no CL várias outras ações: A) diminui a síntese de citocinas no CL; B) previne a resposta das células do sistema imune que participam da luteólise estrutural; C) diminui o RNAm das proteínas que medeiam a apoptose protegendo o CL da morte celular e D) aumenta a proliferação celular no CL e diminui a abundância de RNAm nas células endoteliais de forma a prevenir a luteólise. Assim, o IFNT desfavorece no CL a luteólise estrutural. Sabe-se que existe um influxo de neutrófilos no CL durante o RMP, onde o IFNT altera a funcionalidade das células imunes, desfavorecendo a luteólise funcional e estrutural. Segundo os mesmos autores, além do IFNT, o embrião bovino a partir do dia 13 de desenvolvimento também secreta prostaglandinas, como a PGE<sub>2</sub> e a prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) que atuam de forma parácrina no endométrio, regulando a expressão de genes e funções importantes para a receptividade uterina, crescimento e desenvolvimento do conceito durante a fase inicial da prenhez. Sabe-se também que as PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> desempenham ações luteotróficas importantes no CL, favorecendo a secreção de P<sub>4</sub>. O IFNT favorece a síntese de PGE<sub>2</sub> endometrial (quando não prioriza a síntese de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e prioriza PGE<sub>2</sub>), que esta irá exercer um conjunto de ações luteotróficas (favorecimento da manutenção e atividade do CL). Os mecanismos de ação da PGE<sub>2</sub> decorrem de: A) diminui a sensibilidade do CL à ação da PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ; B) estimula o aumento da produção de P<sub>4</sub> nas células luteais e C) aumenta no tecido luteal as concentrações de AMPc e a ativação da PKA, que estimularia a síntese de P<sub>4</sub>.

Portanto temos três mecanismos conjugados que favorecem o RMP, a inibição na síntese de  $\text{PGF2}\alpha$ , maior resistência do CL às ações luteolíticas da  $\text{PGF2}\alpha$  e um amplo conjunto de ações luteotróficas desencadeadas pelo IFNT e  $\text{PGE2}$ . Diante desse contexto, ampliar o entendimento dos mecanismos de biossíntese e secreção de  $\text{PGF2}\alpha$  e  $\text{PGE2}$  pelas células trofoblásticas e embriões bovinos tornam-se de grande interesse.

Conforme representado na **Figura 1**, a célula endometrial secreta pulsos de alta amplitude de  $\text{PGF2}\alpha$  que ao chegar na célula esteroidogênica luteal, determina a luteólise funcional e estrutural do corpo lúteo. A luteólise funcional é caracterizada pela falência na produção de progesterona e a estrutural pelo desencadeamento dos mecanismos apoptóticos na célula luteal. Na presença do conceito secretando IFNT de maneira competente, ocorre a inibição da secreção de alta amplitude de  $\text{PGF2}\alpha$ , que se mantém em níveis basais. O IFNT ainda estimula a secreção de  $\text{PGE2}$ , esta que ao chegar na célula luteal, impede qualquer ação da  $\text{PGF2}\alpha$ , além de promover aumento na vascularização do CL e aumento na síntese de  $\text{P4}$  além de desfavorecer os mecanismos apoptóticos no CL.

Figura 1 - Mecanismos envolvidos na regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (Painel A) e na manutenção estrutural e funcional do corpo lúteo, durante o reconhecimento materno fetal (Painel B)



Fonte: Arosh, Banu e McCracken (2016).

**(Painel A):** 1) A ocitocina (OT) se liga em seu receptor (OXTR); 2) ocorre a liberação de Ca<sup>2+</sup> no citosol que ativa proteína kinase C (PKC); 3) a maquinaria enzimática para a biossíntese de PGF2α é ativada sequencialmente; 4) ocorre a produção de PGF2α na célula endometrial e pulsos de PGF2α são liberados pela célula endometrial; 5) a PGF2α, é transportada através de proteínas transportadoras (PGT) pelo plexo úteroovariano (UOP); 6) a PGF2α também pode ser transportada, por um mecanismo independente de PGT ou por difusão simples, chegando ao corpo lúteo (CL) pelo UOP. **(Painel B):** 7) através dos pulsos a PGF2α endometrial, a PGF2α se liga ao seu receptor (FP) presente nas células luteais grandes; 8) a ligação PGF2α-FP promove a liberação de Ca<sup>2+</sup> no citosol que ativa PKC; 9) a maquinaria enzimática de biossíntese de PGF2α no CL é ativada sequencialmente; 10) produção de PGF2α pelas células luteais grandes; 11) por mecanismos autócrinos e parácrinos, ocorre uma auto amplificação da produção de PGF2α nas células luteais grandes; 12) PGF2α ligada à FP suprime as vias de sobrevivência do CL; 13) vias envolvidas no mecanismo de apoptose nas células luteais grandes são ativadas; 14) a produção de PGE2 é suprimida no momento da luteólise; 15) a não ligação de PGE2, que teve a produção suprimida, no seu receptor específico promove nas células luteais grandes; 16) supressão da sobrevivência das células luteais grandes; 17) ativação das vias apoptóticas nas células luteais grandes; 18) ativação do FP e supressão do EP2/EP4 sinaliza um decréscimo na biossíntese e secreção de progesterona (P4); 19) indução da apoptose nas células luteais grandes; 20) regressão funcional e estrutural do CL, evento denominado de luteólise. **(Painel C):** 21) o interferon-tau (IFNT) se liga aos seus receptores específicos IFNR1 e IFNR2; 22) tal ligação suprime os receptores

$\alpha$  de estrógeno (ESR-1) e os receptores de ocitocina (OXTR); 23) o Fator 2 regulador do IFNT (IRF-2) ou 24) proteínas específicas tipo 1 (SP1) sinalizam sequencialmente a cascata de IFNR e IRF2 ou SP1. Em paralelo, o IFNT ativa; 25) o complexo IFNR-JAK-SRCEGFR-RAS-RAF-ERK1/2-EGR1; 26) o aumento da resposta da proteína 1 (EGR1), faz com que esta possa competir ou substituir a ligação com SP1 e suprimir OXTR (este mecanismo ainda não foi confirmado); 27) ERK1/2 e EGR1 inibe a função de PGT; 28) com a supressão de PGT o transporte de PGF2 $\alpha$  do endométrio para o CL, através do UOP, não ocorre; 29) interessante o IFNT não inibe a produção basal de PGF2 $\alpha$  endometrial, e a PGF2 $\alpha$  pode ser transportada por um mecanismo independente de PGT ou por difusão simples do endométrio para o UOP; 30) a concentração basal de PGF2 $\alpha$  nesse momento é registrada no UOP; 31) esta PGF2 $\alpha$  atua ligando-se aos seus receptores (FP) nas células luteais grandes do CL no início da prenhez tornando estas células resistentes à ação luteolítica da PGF2 $\alpha$ ; 32) as células epiteliais do endométrio e; 33) células do estroma endometrial através de múltiplos mecanismos; 34) aumentam a produção de PGE2 endometrial; 35) através da sinalização autócrina e parácrina a PGE2 liga-se em EP2/EP4 determinando uma auto amplificação na produção de PGE2; 36) a PGE2 é transportada do endométrio para o CL através do UOP por via PGT ou por mecanismos mediados pela MRP4. **(Painel D):** 37) a PGE2 se liga no EP2/EP4 das células luteais grandes, ativa cAMP/PKA e via SRC via que se auto amplifica; 38) produção de PGE2 intra luteal; 39) sinalização EP2/EP4 por ação parácrina e autócrina promove; 40) sobrevivência ou anti apoptose do CL; 41) supressão das vias pró apoptóticas protegendo o CL da luteólise funcional; 42) a PGE2 através do cAMP/protein kinase A (PKA); 43) via SRC-ERK1/2 ou SRC-AKT reconduzem; 44) a produção de progesterona nas células luteais protegendo o CL da luteólise funcional; 45) coletivamente o IFNT ou a PGE2 produzida pelo endométrio e CL promove a resistência do CL em relação à PGF2 $\alpha$  através de múltiplos mecanismos intracelulares que protegerão o CL da regressão durante o reconhecimento materno fetal.

Estratégias que favoreçam a maior proliferação das células trofoblásticas e consequentemente maior produção de IFNT, menor produção de PGF2 $\alpha$  endometrial e/ou maior produção de PGE2 pelo endométrio e conceito; certamente contribuem para o favorecimento do RMF. Diante desse contexto, ampliar o entendimento dos mecanismos de biossíntese e secreção de PGF2 $\alpha$  e PGE2 pelas células trofoblásticas e embriões bovinos tornam-se de grande interesse. As CT-1 utilizadas nesse estudo, foram obtidas da cultura de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com 10 a 11 dias de desenvolvimento, conforme técnica descrita por Rexroad e Powell (1999) e Talbot *et al.* (2000) e foram cedidas pelo Prof Dr. Alan Ealy.

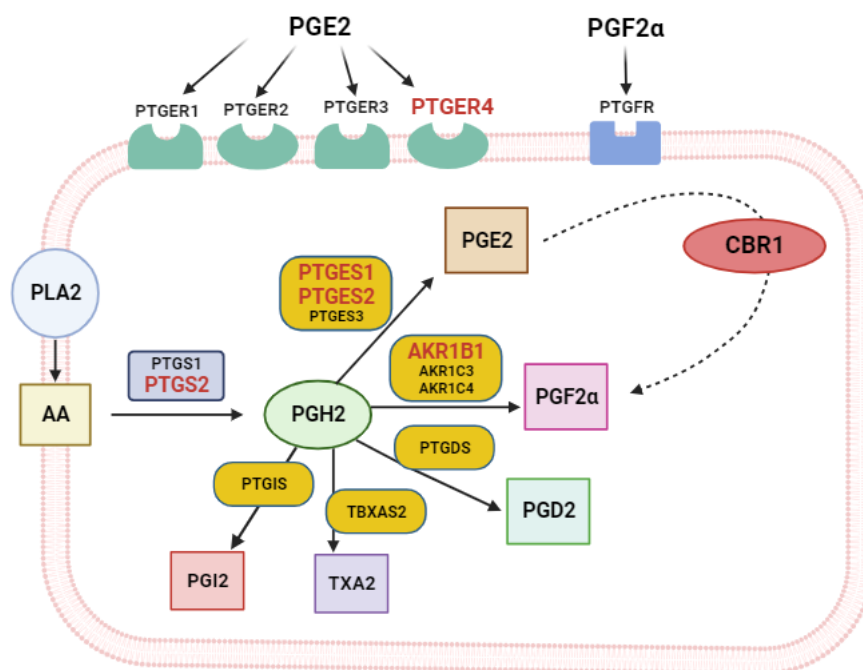
### 2.3 Biossíntese e Secreção de Prostaglandinas no Endométrio

Os eicosanóides são metabólitos oxigenados dos ácidos graxos essenciais compostos por prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. Grande parte dos eicosanóides relevantes derivam do AA através de diferentes vias de síntese.

Conforme ilustrado na **Figura 2**, no endométrio de fêmeas bovinas, a enzima fosfolipase citosólica A2 (PLA2) libera o AA da membrana fosfolipídica, este pode ser convertido pela cicloxigenase 1 (PTGS1) ou cicloxigenase 2 (PTGS2) à PGH2, precursora de todos os prostanóides. A PGH2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 ou PTGES3) em PGE2; PGF sintase (AKR1B1, AKR1C3,

AKR1C4) em PGF2 $\alpha$ ; PGD sintase (PTGDS) em PGD2; TXAs sintase (TBXAS2) em TXA2 ou PGI sintase (PTGIS) no produto PGI2. Depois de sintetizadas, a PGD2 pode ser convertida à PGF2 $\alpha$  pela ação da enzima AKR1C3, assim como a PGE2 que pode ser convertida à PGF2 $\alpha$  pela ação da enzima CBR1. A seguir, os prostanóides atravessam a membrana plasmática passivamente ou por transporte facilitado. Uma vez no exterior das células, os prostanóides se ligam aos seus receptores específicos: a PGE2 aos receptores PTGER-1, PTGER-2, PTGER-3, PTGER-4; a PGF2 $\alpha$  ao PTGFR; a PGD2 ao PTGDR; a PGI2 ao PTGIR e o tromboxano A2 ao TBXAR2. A PGE2 e PGF2 $\alpha$  podem entrar na célula alvo por transporte facilitado utilizando a proteína transportadora de membrana SLCO2A1 ou podem ser inativadas pela enzima PGDH. Uma vez que PGF2 $\alpha$  e PGE2 são produzidas a partir de PGH2, as concentrações específicas destas prostaglandinas dependem da disponibilidade de PGH2 e da atividade específica de PGF e PGE isomerase e sintase (MOUSSAVI *et al.*, 2013).

Figura 2 - Desenho esquemático representando a síntese de prostaglandinas na célula endometrial



Fonte: adaptado por Oliveira (2013).

A síntese de PGF2 $\alpha$  e PGE2 na célula endometrial é determinada da seguinte forma: a enzima fosfolipase A2 (PLA2) libera o ácido araquidônico (AA) da membrana para o citosol, este pode ser convertido pela PTGS1 e/ou PTGS2 em PGH2. A PGH2 é convertida pelas enzimas PGE sintases (PTGES1, PTGES2 e PTGES3) em PGE2, PGF sintases (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4 e CBR1) em

PGF2 $\alpha$ , PGD sintase (PTGDS) em PGD2, PGI sintase (PTGIS) em PGI2 e TXA2 sintase (TBXAS2) em TXA2. Ainda existe a possibilidade de a PGE2 ser convertida em PGF2 $\alpha$  pela ação da enzima CBR1 e a PGD2 ser convertida em PGF2 $\alpha$  pela ação da enzima AKR1C3. Os prostanoídes prontos, agora atravessam a membrana plasmática passivamente ou por transporte facilitado. No exterior das células, os mesmos se ligam aos seus receptores específicos: a PGE2 aos receptores PTGER-1, PTGER-2, PTGER-3, PTGER-4; a PGF2 $\alpha$  ao PTGFR; a PGD2 ao PTGDR; a PGI2 ao PTGIR e o tromboxano A2 ao TBXAR2. A PGE2 e PGF2 $\alpha$  podem entrar na célula alvo por transporte facilitado utilizando a proteína transportadora de membrana SLCO2A1 ou podem ser inativadas pela enzima PGDH.

Em vacas, foi demonstrado que o aumento da relação PGE2/PGF2 $\alpha$  durante o início da gestação apoia a função lútea para um bom desenvolvimento e implantação embrionária (PARENT *et al.*, 2002; AROSH *et al.*, 2004). Um aumento na expressão da enzima chave da síntese de PG, prostaglandina-endoperoxídeo sintase 2 (PTGS2) endometrial durante o diestro induz a síntese e liberação de pulsos luteolíticos de PGF2 $\alpha$ , essenciais para luteólise (SIMMONS *et al.*, 2010). Além disso, a prostaglandina (PG) no lúmen uterino é essencial em promover o desenvolvimento e alongamento embrionário. Sendo assim, tanto o endométrio quanto o embrião sintetizam PG, sendo a concentração de PG luminal uterina maior durante a gestação do que durante o ciclo estral (DORNIK *et al.*, 2011).

Um aumento na produção de PGE2 durante o início da prenhez é induzida por IFNT através da regulação positiva do PTGS2 endometrial. A PGE2 exerce funções essenciais na quiescência miometrial e na manutenção do CL durante o RMF em bovinos (AROSH *et al.*, 2004). Trabalhos realizados por Wijayagunawardane *et al.* (2001) e Marei *et al.* (2009) sugerem que a PGE2 também está envolvida na regulação da contração do oviduto e no desenvolvimento inicial do embrião, respectivamente. Assim, a PGE2 embrionária é considerada um fator importante nas interações iniciais entre o embrião e endométrio materno, levando ao RMF.

Estudos em múltiplas espécies, incluindo humanos, macacos, ratos e espécies domésticas como ovelhas, éguas e vacas, demonstraram um papel essencial da sinalização de prostaglandina E2 (PGE2) em vários aspectos da reprodução de mamíferos. Estudos em ratos e vacas demonstraram que uma deficiência na expressão das principais enzimas de síntese da prostaglandina leva à redução das taxas de expansão do *cumulus*, ruptura do folículo, maturação do oócito e atraso no desenvolvimento embrionário (NUTTINCK *et al.*, 2011; MAREI *et al.*, 2014). A PGE2 está diretamente envolvida no transporte ovidutal de gametas em bovinos e equinos (STOUT; ALLEN, 2001; WIJAYAGUNAWARDANE *et al.*, 2001), na eclosão da zona

pelúcida de blastocistos ovinos (SAYRE; LEWIS, 1993) e no desenvolvimento inicial do embrião bovino (NUTTINCK *et al.*, 2011).

#### **2.4 Biossíntese e Secreção de Prostaglandinas no Embrião**

A PGE2 produzida pelos embriões bovinos exercem regulação parácrina durante o desenvolvimento. Um trabalho realizado por Boruszezwska *et al.* (2019) investigou níveis de mRNA e imunolocalização das enzimas responsáveis pela síntese de PGE2 (PTGS2, PTGES1, PTGES2 e PTGES3) em todos os estágios iniciais de desenvolvimento, ou seja, desde 2 células a blastocisto eclodido, de embriões bovinos de clivagem precoce e tardia. Transcrições de PTGS2, PTGES2 e PTGES3 foram detectadas em todos os estágios dos embriões, enquanto o transcrito e a proteína PTGES1 não foi detectada em embriões do estágio de 2 a 16 células. Os resultados mostraram diferentes perfis de transcrição das enzimas envolvidas na síntese de PGE2 em embriões de clivagem precoce e tardia durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento pré-implantação *in vitro*. Verificou-se também que todas as fases analisadas de embriões bovinos pré-implantados liberaram PGE2, com maior concentração no dia 7 de cultivo tanto no grupo de clivagem precoce quanto tardia. Os níveis de transcrição das PGE2 sintases foram afetados pelo estágio embrionário de desenvolvimento e qualidade. Os diferentes perfis de transcrição de PTGS2, PTGES1, PTGES2 e PTGES3, bem como a concentração de PGE2, em embriões com clivagem precoce e tardia, dependem da qualidade dos oócitos de onde foram obtidos os embriões, o que poderia revelar a associação da produção de PGE2 durante desenvolvimento pré-implantacional bovino com estágios mais avançados de desenvolvimento embrionário.

As PGs produzidas pelo embrião desempenham um papel fundamental no desenvolvimento embrionário inicial (LEWIS, 1989), onde a PGE2 contribui para a síntese de P4 no CL, fundamental para determinar com êxito o estabelecimento da prenhez (WEEMS *et al.* 2006; WEEMS *et al.*, 2007; WATHES *et al.*, 2007). O embrião pré-implantação produz muitas prostaglandinas incluindo PGF2 $\alpha$ , PGE2 e PGI2. Hwang *et al.* (1988) estudaram o metabolismo do ácido araquidônico pelo embrião em diferentes fases da prenhez. Os mesmos autores, verificaram que os embriões bovinos produzem predominantemente PGE2 antes do dia 12, PGE2 e PGF2 $\alpha$  entre os dias 13 e 15, e adicionalmente PGI2 após o dia 15 de desenvolvimento.

Até a fase de blastocisto, os embriões possuem alguma autonomia. Os oócitos aspirados dos folículos ovarianos podem ser inseminados *in vitro* e cultivados por aproximadamente 7 dias. Durante este tempo, eles não precisam de exposição ao trato reprodutivo materno para estabelecer a prenhez. Da mesma forma, o oviduto não precisa de contato com o embrião para estabelecer a prenhez durante o procedimento de TETF. As prostaglandinas são os principais mediadores do sistema reprodutivo feminino, incluindo ovulação, fertilização, manutenção da gestação e/ou parto (LONERGAN; FORDE, 2014).

Vários trabalhos sugerem que a PGE2 desempenha um papel importante no estabelecimento da prenhez em bovinos. Embriões bovinos coletados entre o dia 6 e o dia 10 após fertilização (estágios de mórula e blastocisto eclodido) metabolizam ácido araquidônico principalmente em PGE2 (HWANG *et al.*, 1988). Após a eclosão da zona pelúcida, o blastocisto bovino alongado continua a secretar quantidades crescentes de PGE2 antes e durante todo o período de reconhecimento materno da gestação (10 a 18 dias após fertilização), além de PGF2 $\alpha$  (12 dias após a fertilização) e PGI2 (15 dias após a fertilização; HWANG *et al.*, 1988; WILSON *et al.*, 1992).

A PGE2 originada do embrião bovino pode ter efeitos parácrinos e/ou endócrinos tanto no oviduto como no endométrio, uma vez que vários subtipos do receptor PGE2 acoplado à proteína G (EP) são expressos em células do oviduto bovino durante todas as fases do ciclo estral (EP2, EP3 e EP4; GABLER *et al.*, 2008) e em tecidos uterinos durante os primeiros 50 dias de gestação (EP2 e EP3; AROSH *et al.*, 2004).

Saint-Dizier e colaboradores (2011) investigaram a expressão de mRNA de enzimas envolvidas na síntese de PGE2 em embriões produzidos *in vitro* em novilhas holandesas. Os resultados mostraram que embriões bovinos produzidos *in vitro* nos estágios de mórula e blastocisto utilizam exclusivamente a via COX-2/ PTGES1 para a biossíntese de PGE2. Similarmente, em embriões humanos, a COX-2 foi predominantemente expressa mais tarde nos estágios de 8 células, mórula e blastocisto (WANG *et al.*, 2002). O estudo também relatou que os níveis de expressão de mRNAs de COX-2 e PTGES1 foram maiores em blastocistos e blastocistos expandidos do que em mórula e estágios iniciais de blastocisto. Este achado sugere que a biossíntese de PGE2 aumenta no momento da expansão da blastocle e pode estar envolvido neste processo, bem como na eclosão do blastocisto.

Além disso, a expressão de COX-2 e PTGES1 foi maior em embriões de grau 1 do que em embriões de qualidade inferior. Estes resultados sugerem que embriões de alta qualidade, que apresentam maior competência de desenvolvimento do que embriões de grau inferior após transferência intrauterina (HANSEN, 2006), também têm maior capacidade de sintetizar PGE2. Uma análise transcricional de biópsias de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* de boa qualidade mostrou que os mRNAs de COX-2 foram mais expressos em embriões, resultando em gestações a termo em comparação com embriões que foram reabsorvidos após transferência para receptores (EL-SAYED *et al.*, 2006). Tomados em conjunto, estes resultados indicam que COX-2 e PTGES1 podem ser bons marcadores genéticos candidatos de competência de desenvolvimento em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

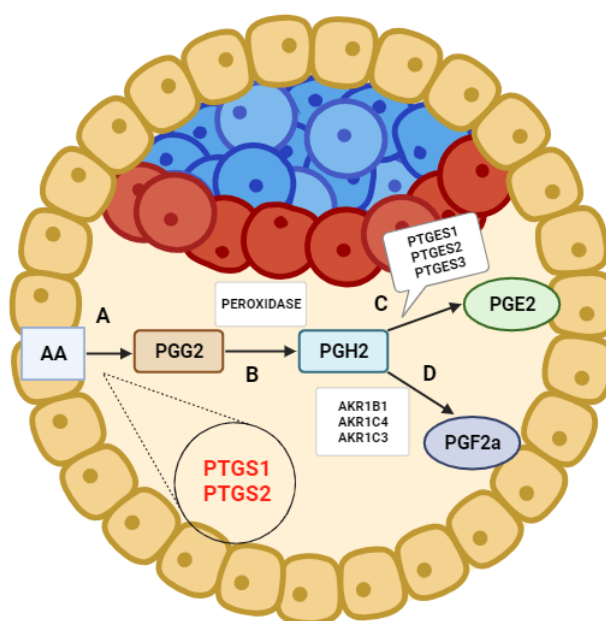
Em conclusão, os resultados sugerem que mórulas e blastocistos bovinos produzidos *in vitro* utilizam a via COX-2/PTGES1 para a biossíntese de PGE2 e que esta via pode estar envolvida na expansão do blastocisto e na competência de desenvolvimento. Transcritos para COX-2 foram relatados em biópsias de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em uma análise transcricional em larga escala por El-Sayed *et al.* (2006). Além disso, tanto o mRNA quanto a proteína para COX-2, bem como para as três PGE sintases (PTGES1, PTGES2 e PTGES3) foram descritos em complexos *cumulus-oócitos* bovinos imaturos e maturados *in vitro* (COCs) (NUTTINCK *et al.*, 2011).

Grycmacher e colaboradores (2019) utilizaram o modelo de cultivo *in vitro* baseado no momento da primeira clivagem para determinar a expressão de mRNA e imunolocalização da PGF2 $\alpha$  sintase e seu receptor em embriões bovinos no estágio de 2 células até o estágio de blastocisto eclodido. Também foi avaliada a produção de PGF2 $\alpha$  aos 2, 5 e 7 dias de cultivo *in vitro*. Investigou-se a expressão de genes envolvidos na síntese e ação da PGF2 $\alpha$  em dois grupos diferentes de embriões bovinos cultivados *in vitro* em diferentes estágios de desenvolvimento com base no tempo de sua primeira divisão. Os resultados obtidos comprovaram que em embriões bovinos pré-implantados, a expressão de mRNA de PGFS e PTGFR mudou substancialmente de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião pré-implantacional, bem como sua qualidade. Este resultado indica que existe uma via regulatória autócrina para a PGF2 $\alpha$ , que é altamente ativa em embriões de clivagem tardia, ou seja, a expressão do RNAm de PGF2 $\alpha$  sintase e seu receptor dependem do estágio de desenvolvimento e da qualidade do embrião. Além disso, análises da

expressão de PGFS e PTGFR em blastocistos bovinos sugerem que a prostaglandina F2 $\alpha$  pode atuar de maneira auto e parácrina em embriões pré-implantacionais bovinos produzidos *in vitro*.

De acordo com Boruszewska *et al.* (2019), conforme ilustrado na **Figura 3**, as prostaglandinas são metabólitos do ácido araquidônico, o qual por meio da prostaglandina-endoperóxido sintase 1 (PTGS1) ou 2 (PTGS2) (anteriormente conhecidas como COX-1 e COX-2) é convertido em PGG2 e posteriormente em PGH2. A isoenzima PTGS1 foi encontrada em muitos tecidos, enquanto PTGS2 é uma isoforma induzível, participando de eventos cruciais em 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 $\alpha$  através da ação de enzimas sintases (AKR1B1; AKR1C4 e AKR1C3) (FORTIER *et al.*, 2008).

Figura 3 – Modelo da síntese de prostaglandina F2 $\alpha$  e E2 pelo embrião



Fonte: adaptado por Lourenço (2022).

A) o AA através das enzimas PTGS1 e PTGS2 é convertido em PGG2; B) o PGG2 é convertido em PGH2 por meio da peroxidase; C) A PGH2 por ação da PTGES1; PTGES2; PTGES3 é convertida em PGE2; D) A PGH2 por ação da AKR1B1; AKR1C4 e AKR1C3 é convertida em PGF2 $\alpha$ .

## 2.5 Efeitos dos Ácidos Graxos na Síntese de Prostaglandinas

A suplementação com ácidos graxos tem sido amplamente avaliada durante as últimas décadas como uma forma de melhorar a eficiência reprodutiva em bovinos de corte. A maioria dos grupos de pesquisa tem focado nos benefícios dos AO e ácido linolênico (ALA), com base em dados que sugerem que esses ácidos graxos essenciais modulam diretamente a função reprodutiva em bovinos (WILLIAMS; STANKO, 2000; HESS *et al.*, 2005; HESS *et al.*, 2008). Uma modificação na síntese de PG pode estar, pelo menos em parte, envolvida na melhoria da fertilidade observada após uma dieta com suplementação de ácidos graxos. Um dos fatores cruciais é a alteração do líquido uterino, essencial para apoiar o desenvolvimento embrionário (BROOKS; SPENCER, 2015).

As PGs sustentam funções homeostáticas fisiológicas reprodutivas, sendo a prostaglandina E2 (PGE2) envolvida em quase todo o processo reprodutivo como ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário e implantação precoce (NIRINGIYUMUKIZA *et al.*, 2018). A PGF2 $\alpha$  possui uma função particularmente importante na ovulação, desenvolvimento lúteo, parto e contração da musculatura lisa uterina (SAITO *et al.*, 2003). Prostaglandinas bem como os ácidos graxos ômega 3 e 6 são ligantes para receptores nucleares, como a família de fatores de transcrição dos ativadores de receptores para a proliferação de peroxissoma (PPARs), que impactam na expressão gênica (DESERGNE; WAHLI, 1999). O envolvimento dos PPARs no desenvolvimento e na reprodução já foi relatado em trabalhos de pesquisa assim como a suplementação com ômega 3 a qual altera a expressão de genes envolvidos na reprodução agindo no endométrio bovino (BERGER; MOLLER, 2002; WATERS *et al.*, 2012). O receptor gama ativado sinalização da proliferação do peroxissomo trofodérmico (PPARG) está envolvido na captação e metabolismo de glicose e ácidos graxos, essencial para o alongamento inicial e sobrevivência do embrião (BROOKS; SPENCER, 2015).

Desta forma, um estudo realizado por Giller *et al.* (2018) investigou o efeito do ômega 3 dietético no alongamento do embrião. Como a composição da membrana celular e, portanto, o conteúdo de precursores de prostaglandinas, como ômega 3 e 6 podem variar dependendo da dieta disponível, novilhas Angus em crescimento foram suplementadas com óleo de peixe protegido no rúmen rico em ômega 3, especificamente EPA e DHA. Para maximizar as diferenças nas proporções de ômega

3 e 6 entre o grupo experimental e o grupo controle, o último foi suplementado com óleo de girassol protegido no rúmen, rico em ômega 6. Avaliou-se o alongamento e desenvolvimento embrionário e outros parâmetros associados no endométrio, assim como o CL, tendo como objetivo específico, os efeitos da dieta na composição do líquido folicular. Os resultados permitiram evidenciar que os embriões de 15 dias foram significativamente mais longos em animais alimentados com ômega 3 em comparação com animais alimentados com ômega 6. A concentração de AA foi significativamente menor, enquanto a concentração de EPA foi significativamente maior e o DHA não foi afetado no endométrio de animais alimentados com ômega 3 em comparação com animais alimentados com ômega 6. As concentrações de PG uterinas não diferiram entre grupos de dieta, apesar de quantidades endometriais significativamente diferentes do seu precursor AA e aumento da concentração plasmática de P4 em ômega 3 em comparação com animais alimentados com ômega 6 durante o crescimento do CL foi associado com embriões filamentosos presentes no 15º dia de gestação.

Estudos evidenciam principalmente o papel desses ácidos graxos na síntese de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , a qual desencadeia luteólise e possui efeitos embriotóxicos diretos durante o início da gestação (INSKEEP, 2004). O ALA é um precursor do EPA e DHA, que inibem a atividade da ciclooxigenase e conseqüentemente síntese de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (YAQOOB; CALDER, 2007). Assim, a suplementação com ácidos graxos foi associada à redução das perdas de prenhez em vacas leiteiras (THATCHER *et al.*, 1997; MATTOS *et al.*, 2000).

O AO ativa a proliferação e a maturação das vias de sinalização nas quais a proteína quinase C participa. Considerando-se as informações disponíveis sobre o papel crítico da proteína quinase C na maturação de oócitos bovinos e desenvolvimento embrionário inicial, o AO pode ser considerado um importante regulador da reprodução atuando no nível de uma via de sinalização comum (MONDADORI *et al.*, 2008). O metabolismo dos ácidos graxos AO e ômega 6, também conhecido como ácido graxo poliinsaturado (AGPIs) n-6 compartilham etapas comuns da via enzimática catalisadas por dessaturases e prostaglandina-endoperoxídeo sintases. Portanto, o AO pode modificar o metabolismo dos AGPI e, posteriormente PG (CHENG *et al.*, 2015).

Algumas estratégias utilizando os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) da família ômega 6, sendo o principal representante desta família o AL, já vem sendo

investigadas por esse grupo ao longo da última década. Dentre os principais trabalhos com AL realizados pelo 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, sendo verificado 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).

Reporta-se ainda que a suplementação lipídica com AGPI poderia incrementar a eficiência reprodutiva por favorecer um maior desenvolvimento do embrião (FOULADI-NASHTA *et al.*, 2007); melhor qualidade dos embriões e maior desenvolvimento embrionário (RYAN D.P., 1992; THANGAVELU *et al.*, 2007). Mudanças dependentes do tempo na síntese de prostaglandinas embrionárias são importantes na determinação da sobrevivência embrionária (HWANG *et al.*, 1988). Evidenciou-se que o aumento da biossíntese de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  durante o início da prenhez reduziu o desenvolvimento do embriões pré-implantação (SCENNA *et al.*, 2004) e reduziu a sobrevivência embrionária (HWANG *et al.*, 1988). A PGE<sub>2</sub> aumentou as taxas de clivagem e o crescimento dos embriões (GUREVICH *et al.*, 1993) inclusive determinando um efeito protetivo durante os períodos de estresse oxidativo (WENTZEL *et al.*, 1999). Assim, uma redução na síntese de PGE<sub>2</sub> durante período pré-implantação pode ser prejudicial à sobrevivência embrionária. No camundongo, a PGI<sub>2</sub> aumenta o desenvolvimento embrionário e a eclosão do embrião (LIU *et al.*, 2006), indicando que a PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> favorecem o desenvolvimento embrionário. Os efeitos dos AGPI na síntese de PGs embrionárias foram pouco perseguidos e compreendidos comparado aos efeitos dos mesmos na biossíntese e secreção das prostaglandinas endometriais. Um maior conhecimento dos papéis dos AGPI na biossíntese das prostaglandinas embrionárias torna-se fundamental para que possam ser criadas estratégias para melhorar o crescimento e desenvolvimento embrionário favorecendo as taxas de prenhez.

Recentemente o nosso grupo realizou um estudo (MALDONADO *et al.*, 2023) especificamente com a suplementação com ácido linoleico conjugado [CLA; cis-9, trans-11 (c9, t11) e trans-10, cis-12 (t10, c12)] em meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1). Verificou-se que células trofoblásticas tratadas com CLA (10, 20, 50 e 100  $\mu$ M) tiveram uma redução na síntese de PGF2 $\alpha$  com 24, 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle (0  $\mu$ M). Também, observou-se que a relação PGE2/PGF2 $\alpha$  foi maior em todos os grupos tratados com CLA com 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle; tendo havido modificações na abundância de transcritos envolvidos na biossíntese de PGF2 $\alpha$  e PGE2. Em complemento, em um estudo recente realizado pelo grupo (LOURENÇO, 2022), células trofoblásticas bovinas (CT-1) foram cultivadas com AO nas concentrações de 0, 50, 100, 200, 500 e 1000  $\mu$ M durante 72 horas. Em tal estudo, foi observada uma redução na síntese de PGF2 $\alpha$ , aumento na síntese de PGE2, embora tenha sido ocasionada uma diminuição na razão PGE2/PGF2 $\alpha$ .

## 2.6 Efeitos dos Ácidos Oleico e Linoleico em Oócitos e Embriões

O AO, caracterizado com um ácido graxo monoinsaturado da família ômega 9, também foi relacionado com benefícios no contexto reprodutivo. Os ácidos graxos insaturados podem ser divididos em monoinsaturados (MUFA), com uma dupla ligação, ou poliinsaturados (AGPI), com mais de uma dupla ligação. A dupla ligação, quando ocorre em um ácido graxo natural, é sempre do tipo cis (BELL *et al.*, 1997). O ômega 9, também chamado de ácido oleico (AO, 18: 1 cis 9), é um ácido carboxílico de cadeia longa constituído por 18 carbonos e um grupo funcional COOH. Por possuir uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 do grupo metil final, é classificado como monoinsaturado e sua fórmula química é  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$  (ROSE; CONNOLY, 1999).

O AO pode ser sintetizado por todos os mamíferos, incluindo humanos, a partir dos AGPI ômegas 3 e 6 provenientes da dieta (PARK *et al.*, 2014). Um único cis, a ligação dupla na posição 9, confere ao AO uma alta capacidade de solubilizar lipídios (PEREIRA *et al.*, 2014). O AO é um dos principais determinantes da fluidez da membrana plasmática (FUNARI *et al.*, 2003), e está associado a funções importantes, incluindo interação célula-célula, transporte de membrana, eventos de sinalização, regulação da temperatura do corpo, produção de hormônios sexuais como o estradiol

e a progesterona, além de contribuir para o aumento da absorção de vitaminas A, D, E e K e atuar em funções metabólicas e estruturais (WARZYCH *et al.*, 2017). O AO em culturas celulares promove nas células um acúmulo de triglicerídeos, atuando também como agente protetor contra a lipotoxicidade dos triglicerídeos (LISTENBERGER *et al.* 2003). Durante o período de desenvolvimento embrionário inicial, a divisão de um a quatro blastômeros requer um grande aumento na área de superfície da membrana, onde o AO é o principal ácido graxo de membrana em tal organização (LOPEZ *et al.*, 2014). O AO é capaz de doar um cátion de hidrogênio a um acceptor e se opõe à oxidação ou inibe as reações provocadas pelo dioxigênio ou peróxidos (CHOE; MIN, 2009). Além disso, AO pode ser diretamente ligado a proteínas, combinação importante no crescimento e diferenciação de vários tipos de células (RIOS-ESTEVEZ; RESH, 2013). As principais classes lipídicas dos oócitos bovinos são triglicerídeos, fosfolipídios, ésteres de colesterol e ácidos graxos livres (AGL). No líquido folicular das novilhas, 37 ácidos graxos estão presentes na concentração total de 600 µg/mL. A maior concentração foi registrada como sendo do ácido oleico (87 µg/mL), ácido linoléico (48 µg/mL), ácido esteárico (31 µg/mL) e ácido palmítico (26 µg/mL) (BENDER *et al.*, 2010). O AO é um importante ácido graxo monoinsaturado nos extratos lipídicos de oócitos bovinos, ovinos, suínos e humanos. AO livres e esterificados são regulados metabolicamente e divididos em fluídos extracelulares, organelas celulares e citosol (HOMA *et al.*, 1986; PRATES *et al.*, 2013; DUNNING *et al.*, 2014).

A interferência dos AO nas funções reprodutivas pode ser avaliada de acordo com a funcionalidade de tais biomoléculas em um organismo (STRÖHLE; DÖRING, 2010). Trabalhos estabeleceram AO como biomarcadores de sobrevivência blastomérica e pós-criopreservação em bovinos, confirmando assim os efeitos positivos do AO no embrião em desenvolvimento (GONZÁLEZ-SERRANO *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2014).

Os efeitos dos AGPI diferem dependendo dos tipos de células (WANG; TSUJII, 2009). Em cultivo de células endoteliais, o AL aumentou a quantidade de cálcio intracelular enquanto produziu superóxido e produtos de óxido nítrico (SARASWATHI *et al.* 2004). No entanto, foi observado que o AL protege as células contra estresse oxidativo em linhas celulares secretoras de insulina e fibroblastos humanos normais primários (BEEHARRY *et al.* 2004).

A suplementação dietética com ácidos graxos de cadeia longa tem aumentado a taxa de ovulação, o número de folículos, as concentrações circulantes de progesterona em ovelhas (LEROY *et al.*, 2014). Consistente com esta hipótese, Bilby e colaboradores (2006) observaram que um maior número de oócitos foi coletado de vacas leiteiras alimentadas com AO em comparação com vacas não alimentadas com AO. Da mesma forma, vacas suplementadas com AO na dieta apresentaram um aumento da taxa de produção e qualidade do blastocisto durante a fertilização *in vitro*, possivelmente através da melhora na biossíntese celular e neutralização dos efeitos adversos da insulina (FOULADI-NASHTA *et al.*, 2007).

A adição de trans-10, cis-12 ácido octadecadienóico (t10, c12 CLA), um derivado de ácido linoleico conjugado, ao meio de cultura de embriões bovinos demonstrou aumentar a viabilidade dos embriões após o descongelamento (PEREIRA *et al.* 2007). Um estudo realizado por Karaşahin (2019) consistiu em avaliar a resposta da suplementação de AO e AL em diferentes doses em meios de cultura sobre a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados. Os oócitos fertilizados foram alocados em três grupos: 1) tratamento com AL (10, 100, 500 e 1000 µM), 2) tratamento com AO (10, 100, 500 e 1000 µM), 3) grupo controle sem tratamento, e colocado em uma incubadora (5% CO<sub>2</sub>, 95% de umidade, 38,5°C). O desenvolvimento embrionário foi monitorado com 48 horas e nos dias 7 e 8. Os mesmos foram então vitrificados e depois aquecidos. Como resultado, observou-se que os ácidos graxos essenciais apresentaram contribuições significativas para o desenvolvimento embrionário após vitrificação/aquecimento. Conforme houve um aumento na quantidade de AL e AO no meio de cultura, também ocorreu um aumento na capacidade de desenvolvimento e de eclosão após o aquecimento do embrião. Altas doses de AO apresentaram efeitos notáveis sobre o desenvolvimento embrionário, levando à conclusão que a proporção de ácidos graxos insaturados encontrada no meio de cultura afeta positivamente a capacidade de desenvolvimento embrionário.

## **2.7 Ação da Matriz Metalopeptidase**

A matriz extracelular (MEC) desempenha um papel de suporte para órgãos e tecidos, assim como participa ativamente de outras funções, como regulação do ciclo

celular e motilidade celular, sobrevivência e apoptose, bem como distribuição e integração de fatores de crescimento (CUI *et al.*, 2017).

A MEC é composta por centenas de moléculas, incluindo proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteínas estruturais como colágeno e elastina, proteínas de adesão tais como fibronectina e laminina. O MEC também é composto de proteases, estas denominadas metaloproteinases de matriz ou matriz metalopeptidases (MMPs) (KAPOOR *et al.*, 2016).

As MMPs são uma família de endopeptidases remodeladoras da MEC, estas dependentes de zinco, que possuem a capacidade de degradar quase todos os componentes da MEC. A degradação da MEC é de grande importância, pois está relacionada ao desenvolvimento embrionário e à angiogênese (SAKAMURI *et al.*, 2017). As MMPs estão envolvidas na reparação celular e na remodelação dos tecidos, porém quando a expressão das MMPs está alterada, pode ocorrer a degradação anormal da MEC (EGEBLAD; WERB, 2002).

Dentro da MEC, os inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) inibem a atividade proteolítica das MMPs. TIMPs são importantes reguladores da renovação da MEC, remodelação tecidual e comportamento celular. Os TIMPs, semelhantes às MMPs, modulam a angiogênese, a proliferação celular e a apoptose. Uma interrupção no equilíbrio entre MMPs e TIMPs tem sido implicada na fisiopatologia e na progressão de diversas doenças (JABLONSKA-TRYPUC *et al.*, 2016).

As MMPs desempenham um papel importante na remodelação tecidual durante vários processos fisiológicos, como embriogênese, morfogênese, angiogênese e reparo tecidual. Durante processos biológicos normais, como a prenhez e cicatrização tecidual, foram observadas alterações na expressão e atividade da MMP. As MMPs e TIMPs são de grande importância na morfogênese dos órgãos fetais e nos eventos necessários para o desencadeamento do parto (CUI *et al.*, 2017).

Com base na sua distribuição e especificidade para componentes da MEC, as MMPs são divididas em metaloproteases de matriz do tipo membrana (MT-MMPs), collagenases, gelatinases, estromelinas e matrilisinas (SAKAMURI *et al.*, 2017).

As collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18) degradam o colágeno fibrilar de hélice tripla, que é fundamental nos ossos e ligamentos. As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) estão envolvidas em diferentes processos celulares incluindo a angiogênese, alterando as moléculas da lâmina basal de forma a determinar posteriormente à morte celular. As estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) são

pequenas proteases que degradam parte da MEC. As matrilisinas (MMP-7 e MMP-26) processam moléculas da superfície celular e digerem os componentes da MEC. MT-MMPs possuem atividade colagenolítica e podem ativar algumas proteases e componentes da superfície celular (JABLONSKA-TRYPUC *et al.*, 2016).

As MMPs e TIMPs controlam o local e a remodelação do tecido endometrial e estão associadas a uma variedade de processos fisiológicos e patológicos. A regulação coordenada entre as MMPs, MMP2 (gelatinase-A) e MMP9 (gelatinase-B) e seus inibidores, TIMP1/2, desempenha um papel importante nas alterações vasculares estruturais e funcionais necessárias para o sucesso do estabelecimento da prenhez (KARTHIKEYAN *et al.*, 2013; RAHAT *et al.*, 2016).

MMPs, citocinas e fatores de crescimento intervêm em processos fisiológicos, como implantação de embriões, invasão e migração de trofoblastos e decidualização, com estudos referindo-se aos blastocistos como sendo uma fonte direta de MMP-2 (ROTH *et al.*, 2017).

Além das citocinas envolvidas na decidualização, níveis elevados de MMPs, como MMP-2, MMP-3 e MMP-9, expressos na decídua estão associados a um aumento na invasão trofoblástica. A presença de MMPs, juntamente com o hormônio gonadotrofina coriônica e VEGF, permite modificações no endométrio que são necessárias para a implantação embrionária, além de desempenhar um importante papel no desenvolvimento da placenta (GODBOLE *et al.*, 2011).

O desenvolvimento placentário é caracterizado por células citotrofoblásticas extravilosas que invadem a parede uterina e as artérias espirais, que por sua vez substituem as células da parede vascular e levam ao desenvolvimento de vasos de alto fluxo e baixa resistência que garantem um suprimento contínuo de sangue à placenta durante a gestação (MORRISH *et al.*, 1998). A invasão insuficiente do trofoblasto e a remodelação inadequada da vascularização uterina estão associadas à restrição do crescimento fetal (BROSENS *et al.*, 2011). Estudos evidenciaram a importância da expressão de MMP2 e MMP9 em células citotrofoblásticas extravilosas, pois medeiam sua invasibilidade tornando-se essenciais durante o período de implantação embrionária (BAI *et al.*, 2005; SUMAN; GUPTA, 2012).

Um estudo em mulheres realizado por Yan e colaboradores (2021) demonstrou que a expressão ou secreção reduzida de MMP2 pode contribuir para a invasão insuficiente de células trofoblásticas extravilosas e remodelação aberrante da MEC endometrial justificando, em parte, o efeito desvantajoso do SNP MMP2 (-735C> T)

em pacientes com abortos espontâneos recorrentes (AER). Choi *et al.* (2003) demonstraram que os níveis de mRNA de MMP2 são menores nas vilosidades coriônicas de pacientes com AER. Embora as vilosidades coriônicas e o endométrio tenham genomas diferentes, esses resultados também sugerem que a regulação negativa da MMP2 na interface materno-fetal pode estar associada ao risco de AER.

Os resultados de meta-análise de Yan e colaboradores (2021) também mostraram que o alelo MMP9 -1562T em mulheres estava associado ao risco de AER. Estudos *in vitro* mostraram que o SNP MMP9 (-1562C> T) resulta na perda de ligação de uma proteína repressora nuclear que leva ao aumento da expressão de MMP9 (ZHANG *et al.*, 1999). Foi demonstrado que a hiperatividade da MMP9 está associada a um ambiente uterino desfavorável (MULAYIM *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006). A atividade da MMP9 é regulada positivamente no fluido uterino de mulheres com falha recorrente de implantação (INAGAKI *et al.*, 2003). Além disso, um estudo recente mostra que o SNP MMP9 (-1562C>T) está associado ao nascimento prematuro (PANDEY; AWASTHI, 2020). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que a alta expressão e atividade da MMP9 não são benéficas para o sucesso da gravidez e podem explicar a associação entre o SNP MMP9 (-1562C> T) e o risco de AER.

Um estudo realizado por Kizaki *et al.* (2008) em fêmeas bovinas gestantes demonstrou que MMP2 e MMP9 foram expressas no endométrio e nos tecidos fetais durante a gestação. A expressão gênica de MMP2 diminuiu com o progresso da gestação, porém sua intensidade foi mantida em nível alto durante o período peri-implantacional e aumentou no final da gestação. Já o nível de expressão da MMP9 foi mantido de forma estável, mas foi relativamente baixo em comparação com o da MMP2. Como conclusão, foi possível observar que ocorreu expressão de MMP2 e MMP9 no endométrio e placentoma bovino durante toda a gestação. Dessa forma, estes dados sugerem que a MMP2 é um dos principais fatores de remodelação endometrial para implantação e pré-parto em bovinos.

### 3 HIPÓTESE

A hipótese é que a suplementação com AO aumenta a abundância dos transcritos PTGES1, PTGES2, PTGER4, PTGS2, IFNT, MMP2 e diminui a abundância dos transcritos MMP9 e AKR1B1.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Objetiva-se determinar os efeitos do AO na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de prostaglandinas, no RMF e na implantação placentária e remodelação da matriz extracelular em CT-1.

### **4.2 Objetivos Específicos**

Objetiva-se determinar os efeitos do AO (C18:1 cis-9; Sigma-Aldrich O1383) nas concentrações de 0, 100, 500 e 1000  $\mu$ M durante 72 horas de cultivo, na expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de PG (PTGS2, AKR1B1, PTGES1, PTGES2 e PTGER4), no RMF (IFNT) e na implantação placentária e remodelação da matriz extracelular (MMP2 e MMP9) pela técnica de RT-qPCR.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Local do Experimento**

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

### **5.2 Origem 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 CO<sub>2</sub> a 39,5 °C. As CT-1 foram cultivadas em placas de cultura de 4 poços (NUNC) contendo camadas de manutenção de células de fibroblastos de camundongo (STO). A passagem secundária das culturas das células foi feita por tratamento com tripsina-EDTA. O tratamento com tripsina-EDTA ou somente com EDTA foi considerado prejudicial para as células, e a passagem subsequente das culturas foi realizada apenas por desnudamento das camadas de células dos blastocistos, as camadas de células foram fragmentadas por repetidas aspirações com auxílio de uma pipeta sorológica. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação em um tubo Falcon. Depois de aspirar o meio, usando pipeta sorológica de 2 mL, o pellet foi ressuspendido em DMEM-199 a 10% e semeados em células alimentadoras STO. As CT-1 foram cultivadas continuamente por mais de 2 anos e 76 passagens com porções congeladas a cada 5-10 passagens. As passagens das CT-1 foram realizadas em diluição de 1:3 ou 1:5 para as primeiras 15 passagens e depois disso diluída em uma proporção de 1:10. 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.

### **5.3 Preparação da Matriz de Membrana Basal Matrigel para o Início do Cultivo Celular**

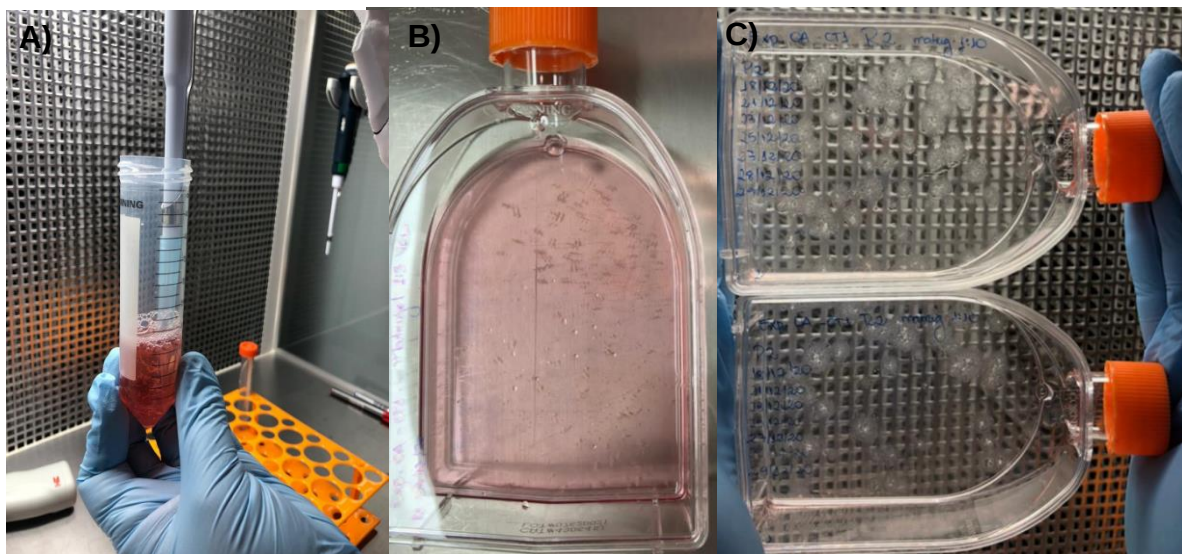
A matriz de membrana basal Matrigel® (Ref. 356237, BD Bioscience, Bedford, MA, USA), foi diluída a 1:3 e 1:10 em meio não suplementado com SFB, composto por 50 mL de DMEM (1X) + GlutaMAX TM -I (Gibco, Ref. 10569-010, Grand Island, NY, USA); 500 µL de solução antibiótica e antimicótica (100X) (Gibco, Ref. 15240062,

Grand Island, NY, USA); e 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.

#### 5.4 Propagação das CT-1

Previamente ao descongelamento das CT-1, preparou-se a garrafa (F1) de cultivo de 75cm<sup>2</sup> (Corning, Ref. 430641U) com 15 mL de Matrigel diluída a 1:3, incubada (Panasonic, COM-19AIC(UV)) a 38,5 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> 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. Conforme ilustrado na **Figura 4 A**, 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 TM –I (Gibco, Ref. 10569-010, Grand Island, NY, USA); 50 mL de SFB (Gibco, Ref. 12657029, inativado por calor a 56°C por 30 minutos); 50 mL de solução antibiótica e antimicótica (100X) (Gibco, Ref. 15240062, Grand Island, NY, USA); 5 mL de aminoácidos não essenciais, MEM NEAA(100X) (Gibco, Ref. 11140050, Grand Island, NY, USA); e 500 µL de 2-mercaptoetanol (1000X) (Gibco, Ref. 21985023, Grand Island, NY, USA). Conforme ilustrado na **Figura 4 B**, depois da ressuspensão das CT-1, as mesmas foram adicionadas à garrafa (F1), onde foram cultivadas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> 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 (**Figura 4 C**). Em cada troca de meio utilizaram-se 15 mL de meio suplementado.

Figura 4 – Células CT-1



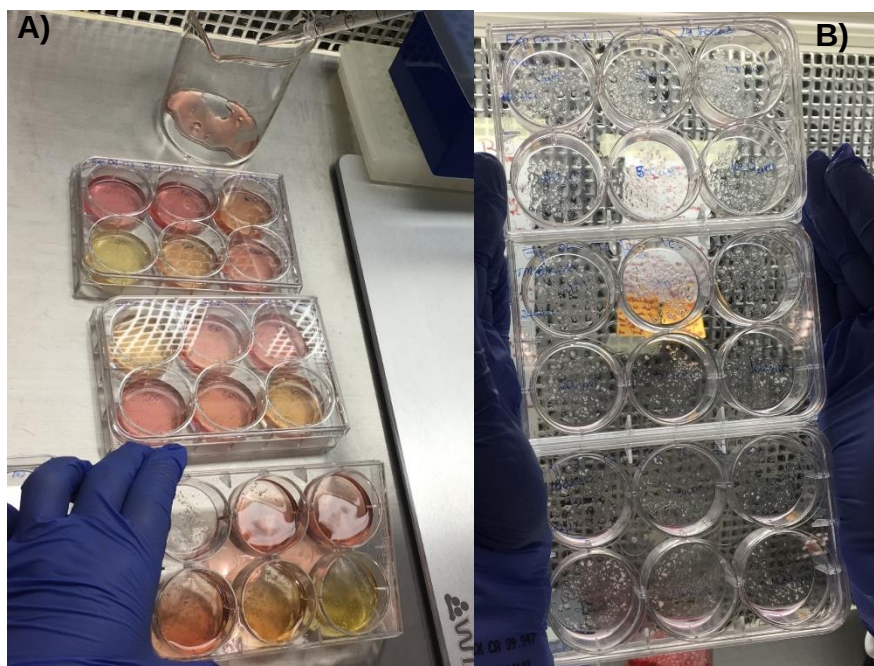
Fonte: Lourenço (2022).

A) Células CT-1 descongeladas e ressuspensas em tubo Falcon contendo 15 mL de meio suplementado. B) Dia 1 das CT-1 ressuspensas em garrafas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. C) CT-1 em desenvolvimento aumentando a confluência.

Após atingirem 100% de confluência as células foram transferidas para duas novas garrafas de cultivo (F2), previamente preparadas com Matrigel (1:10) contendo 15 mL de meio suplementado. Para o processo de ressuspensão as CT-1 foram removidas da garrafa de cultivo com auxílio de um “*cell scraper*”, raspando toda a superfície da garrafa de forma a promover o descolamento das células. Posteriormente, as CT-1 foram transferidas para um tubo cônico com capacidade de 50 mL e dissociadas com o auxílio de uma seringa de 20 mL acoplada a uma agulha de calibre 18 G. O volume obtido foi dividido igualmente entre as duas garrafas F2. Novamente, as CT-1 foram incubadas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, por mais 12 dias quando observou-se 100% de confluência. As trocas do meio de manutenção foram realizadas a cada 48 horas. Após atingirem 100% de confluência, as CT-1 foram novamente ressuspensas e semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células em poços de 9,6 cm<sup>2</sup> (Corning, Ref. 3516, NY, USA) em meio de cultivo completo suplementado com 10% de SFB e outros aditivos conforme descrito no item 5.4. As culturas foram incubadas a 38,5°C com 5% de saturação de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada 48 horas (**Figura 5 A**). Após cinco dias de cultivo das células nos poços, o meio foi substituído, porém sem SFB (**Figura**

**5 B).** Após 24 horas, no 6º dia de cultivo, o meio foi substituído pelo mesmo meio sem soro contendo os respectivos tratamentos ou não com AO (0, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ ), onde permaneceu durante 72 horas de cultivo.

Figura 5 - Placas de cultivo



Fonte: Lourenço (2022).

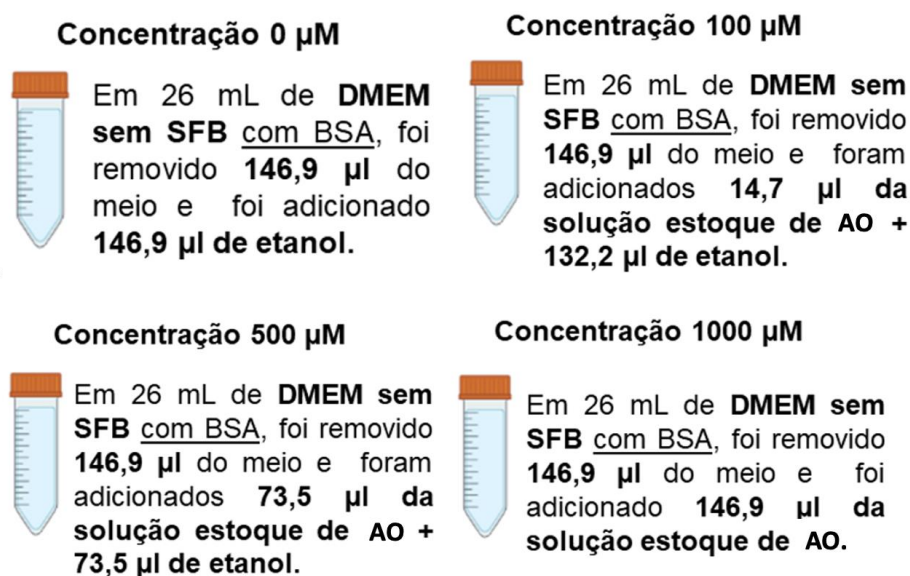
A) Troca de meio suplementado das placas de cultivo. B) CT-1 com 50% de confluência, prontas para receber seus respectivos tratamentos.

### 5.5 Preparo da Solução Estoque de AO e das Soluções com as Diferentes Concentrações Utilizadas nos Tratamentos

Neste experimento utilizamos o AO (Sigma-Aldrich, USA, Cat n° O1383). Realizou-se o preparo da solução estoque do AO baseado no método descrito por Vanholder *et. al* (2005). Para a preparação da solução estoque do AO o conteúdo total da ampola (5g) foi diluído em etanol 100% até completar o volume final de 100 mL, resultando em uma **solução estoque de 50 mg/mL ou 177.000  $\mu\text{M/mL}$** , considerando o peso molecular do AO de 282,46g. Então, essa solução estoque foi aliquotada em microtubos e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No momento do uso, a solução estoque de AO foi descongelada e diluída em meio não suplementado (sem SFB), contendo 0,1125% de

BSA como veículo, de forma a obter a concentração final desejada de 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  e grupo controle, conforme representado na **Figura 6**.

Figura 6 - Preparo das soluções de trabalho em diferentes concentrações de AO (Sigma-Aldrich, USA, Cat n° O1383)



Fonte: Lourenço (2022).

Preparo das soluções de trabalho com meio não suplementado contendo 0,1125% de BSA como veículo em diferentes concentrações de AO (0, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  e o grupo controle) para compor os tratamentos com a solução estoque e/ou etanol.

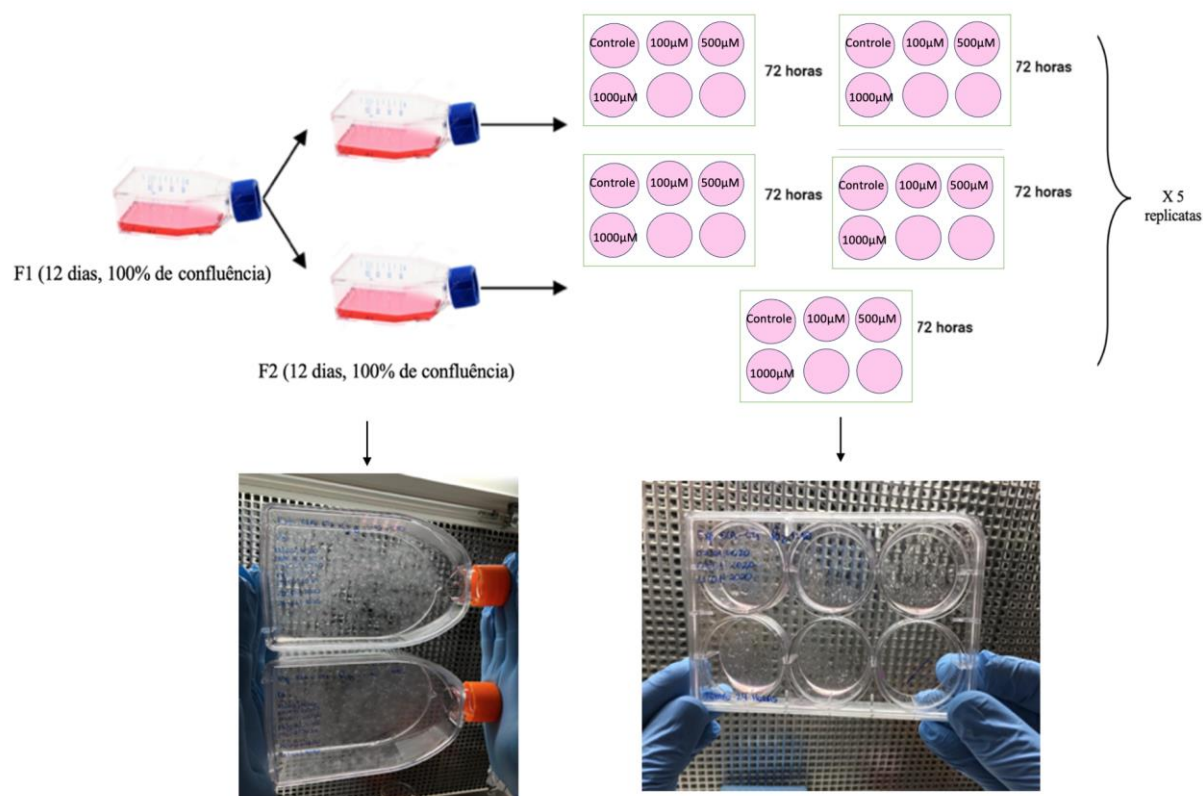
## 5.6 Aplicação dos Tratamentos com AO

Após serem transferidas para as placas de 6 poços as CT-1 foram incubadas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$  por 5 dias, até atingirem 50% de confluência. No 5º dia de cultivo o meio de manutenção de cada poço foi então retirado e substituído por 4 mL de meio não suplementado com SFB, adicionado dos componentes de solução antibiótica e antimicótica e aminoácidos não essenciais, como descrito no item 5.4. No 6º dia de cultivo, o meio de cada poço foi novamente retirado e substituído por 4 mL de meio contendo os respectivos tratamentos.

## 5.7 Delineamento Experimental

Neste experimento, CT-1 foram cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de AO (100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ , além do grupo controle) durante 72 horas. Foram realizadas 5 repetições, sendo que em cada repetição foi utilizado 1 poço de cultivo para cada tratamento, conforme representado na **Figura 7**.

Figura 7 - Representação esquemática dos tratamentos de AO realizados nas CT-1



Fonte: Lourenço (2022).

As CT-1 foram transferidas para uma garrafa de cultura (F1) previamente preparada com matrigel, onde foram cultivadas durante 12 dias. Após esse período, as células foram ressuspensas e passadas para duas novas garrafas de cultura (F2), permanecendo em cultivo *in vitro* por mais 12 dias, até atingirem 100% de confluência. Posteriormente, as CT-1 foram transferidas para placas de cultura de 6 poços onde foram mantidas em cultivo *in vitro* por 5 dias. Vinte e quatro horas antes da adição dos tratamentos com AO o meio de suplementação das CT-1 foi substituído por meio sem SFB. No 6º dia de cultivo os tratamentos com AO foram adicionados nas concentrações 100, 500 ou 1000 µM, além do grupo controle aos respectivos poços de cultivo. Foram realizadas 5 repetições experimentais. Após 72 horas de tratamento, as CT-1 foram coletadas e armazenadas a -80 °C para análises futuras por RT-qPCR.

## 5.8 Extração de RNA

As células CT-1 que estavam aderidas à placa de cultivo, referentes aos diferentes grupos de tratamento, foram utilizadas para a extração de RNA. Para tanto, 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. A solução foi recuperada, alíquotada em microtubos livre de RNase e DNase e estocada 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 1,7 e 2.

### 5.9 Síntese de cDNA

Amostras de RNA (1000 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  $\mu$ L de acordo com as diretrizes do fabricante. Após a incubação, 1  $\mu$ 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 (10 $\mu$ L) contendo primers aleatórios, enzimas transcriptase reversa e desoxinucleotídeos foi adicionada a 11 $\mu$ L 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).

### 5.10 Seleção e Validação dos Primers

Foram selecionados genes representativos de três vias principais na dinâmica do reconhecimento materno, onde avaliou-se a expressão de transcritos envolvidos na biossíntese de PG (PTGS2, AKR1B1, PTGES, PTGES2 e PTGER4), no RMF (IFNT) e na implantação placentária e remodelação da matriz extracelular (MMP2 e MMP9) 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              |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------|------------------|-------------------------|
| <b><i>Processo metabólico dos eicosanóides</i></b>                         |                   |                                                      |                  |                         |
| PTGER4                                                                     | NM_174589         | F: CGATGAGTATTGAGCGCTACC<br>R: AGCCCGCATACATGTAGGAG  | 237              | Ulbrich et al., 2009    |
| PTGES                                                                      | NM_174443.2       | F: GCTGCGGAAGAAGGCTTTTGCC<br>R: GGGCTCTGAGGCAGCGTTCC | 101              | Oliveira et al., 2017   |
| PTGS2                                                                      | NM_174445.2       | F: CCAGAGCTCTTCCCTCCTGTG<br>R: GGCAAAGAATGCAAACATCA  | 161              | Oliveira et al., 2017   |
| PTGES2                                                                     | NM_001166554.1    | F: GTGGGCGGACGACTGGTTGG<br>R: CGGAGGTGGTGCTGCGTTT    | 192              | Oliveira et al., 2017   |
| AKR1B1                                                                     | NM_001012519      | F: ATACAAGCCGGCGGTTAAC<br>R: TGTCTGCAATCGCTTTGATC    | 188              | Ulbrich et al., 2009    |
| <b><i>Implantação placentária e remodelação da matriz extracelular</i></b> |                   |                                                      |                  |                         |
| MMP2                                                                       | NM174745.2        | F: GGCATCTCTCAGATCCGTGG<br>R: TGTGGGTCTTCGTACACAGC   | 155              | Hughes et al., 2017     |
| MMP9                                                                       | NM_174744.2       | F: AGGGTAAGGTGCTGCTGTTC<br>R: AGGAGGTCAAGGTCACGTA    | 2350             | Hughes et al., 2017     |
| <b><i>Reconhecimento da prenhez</i></b>                                    |                   |                                                      |                  |                         |
| IFN- $\tau$                                                                | NM_001015511      | F: GCCCGAATGAACAGACTCTC<br>R: CCATCTCCTGAGGAAGACCA   | 1313             | Hughes et al., 2017     |
| <b><i>Controle endógeno</i></b>                                            |                   |                                                      |                  |                         |
| RPS9                                                                       | NM_001101152.2    | F: GAGCTGGGTTTGTGCGAAA<br>R: GGTCGAGGCGGGACTTCT      | 65               | Hughes et al., 2017     |
| ACTB                                                                       | NM_173979.3       | F: GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA<br>R: TCGTCCCAGTTGGTGACGAT | 78               | Bettegowda et al., 2006 |

Fonte: adaptado por 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/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9913&INPUT\\_SEQUENCE=NM\\_173950.2&LINK\\_LOC=nucore](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9913&INPUT_SEQUENCE=NM_173950.2&LINK_LOC=nucore); [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=XM\\_005211921.4](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  $\mu$ L usando 8  $\mu$ L 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:H<sub>2</sub>O).

### **5.11 Análise da Abundância dos Transcritos**

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 AO nas concentrações de 100, 500 e 1000 µM durante 72 horas. As reações foram realizadas em triplicata. A eficiência do qPCR foi determinada e os valores do ciclo de quantificação (C<sub>q</sub>) 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).

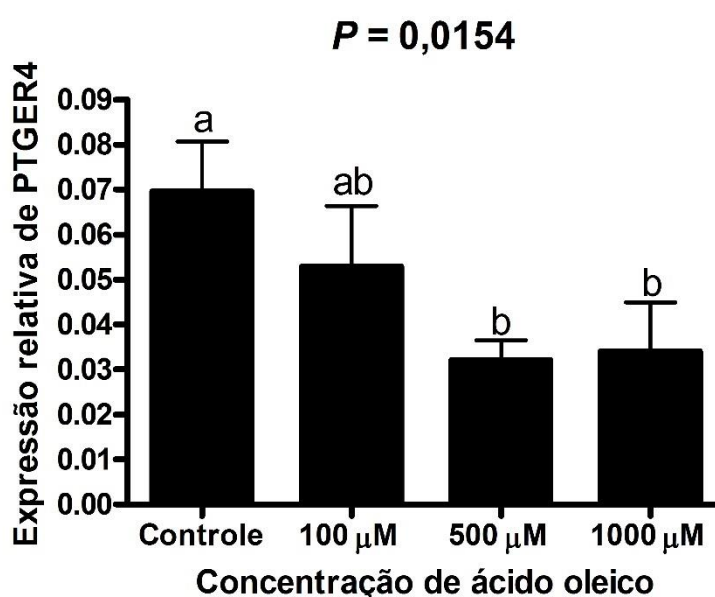
### **5.12 Análise Estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) considerando o poço como unidade experimental. Os pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram verificados para cada modelo por meio do teste de Shapiro-Wilk. Quando uma das premissas não foi atendida, transformações logarítmicas foram aplicadas aos dados brutos. Os dados de abundância dos transcritos foram analisados por ANOVA usando o efeito fixo do tratamento. Os resultados estão relatados com média  $\pm$  erro padrão da média. Foi considerado um nível de significância quando  $P \leq 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

**6.1 Expressão Relativa de PTGER4.** Conforme ilustrado na **Figura 8**, os níveis de expressão relativa de PTGER4 foi menor nos grupos 500 e 1000  $\mu\text{M}$  comparado ao controle ( $0,0320 \pm 0,0097$  e  $0,0292 \pm 0,0106$  vs.  $0,0695 \pm 0,0097$  respectivamente;  $P = 0,0154$ ) não tendo tais grupos diferido do grupo 100  $\mu\text{M}$  ( $0,0546 \pm 0,0106$ ).

Figura 8 - Expressão relativa do receptor 4 da prostaglandina E (PTGER4) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR

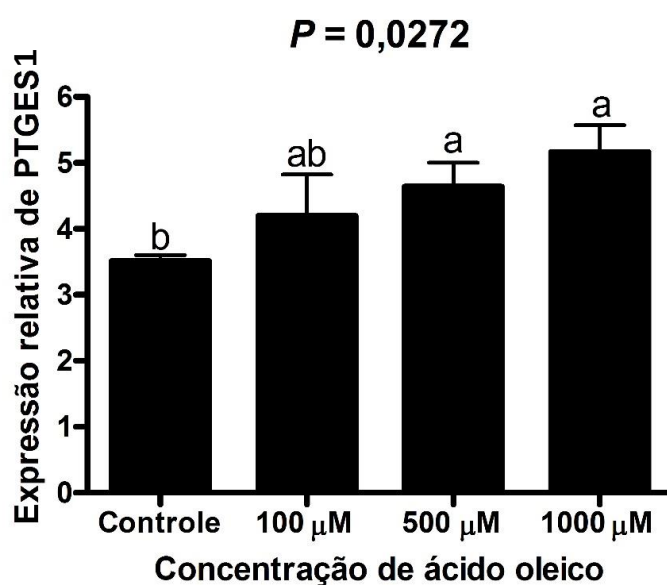


Fonte: elaborado pela autora.

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

**6.2 Expressão Relativa de PTGES1.** Conforme ilustrado na **Figura 9**, os níveis de expressão relativa de PTGES1 foi maior nos grupos 500 e 1000  $\mu\text{M}$  comparado ao controle ( $4,6370 \pm 0,3782$  e  $5,1669 \pm 0,3782$  vs.  $3,5120 \pm 0,3782$  respectivamente;  $P = 0,0272$ ) não tendo tais grupos diferido do grupo 100  $\mu\text{M}$  ( $4,2088 \pm 0,4177$ ).

Figura 9 - Expressão relativa da Prostaglandina E sintase 1 (PTGES1) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR

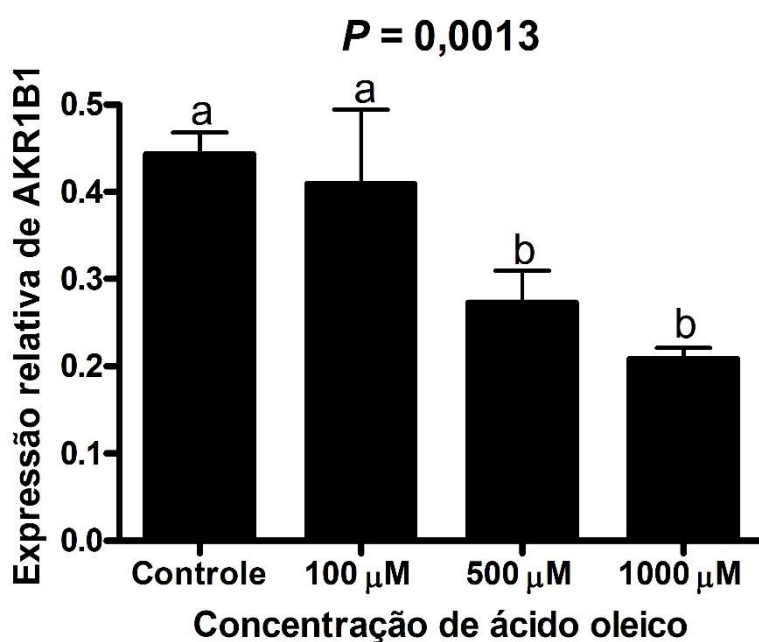


Fonte: elaborado pela autora.

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

**6.3 Expressão Relativa de AKR1B1.** Conforme ilustrado na **Figura 10**, os níveis de expressão relativa de AKR1B1 foi menor ( $P = 0,0013$ ) nos grupos 500 e 1000  $\mu\text{M}$  ( $0,2725 \pm 0,0413$  vs.  $0,2084 \pm 0,0413$  respectivamente) comparado aos grupos controle e 100  $\mu\text{M}$  ( $0,4433 \pm 0,0413$  e  $0,4039 \pm 0,0451$  respectivamente).

Figura 10 - Expressão relativa da família aldo-ceto redutase membro B1 (AKR1B1) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR

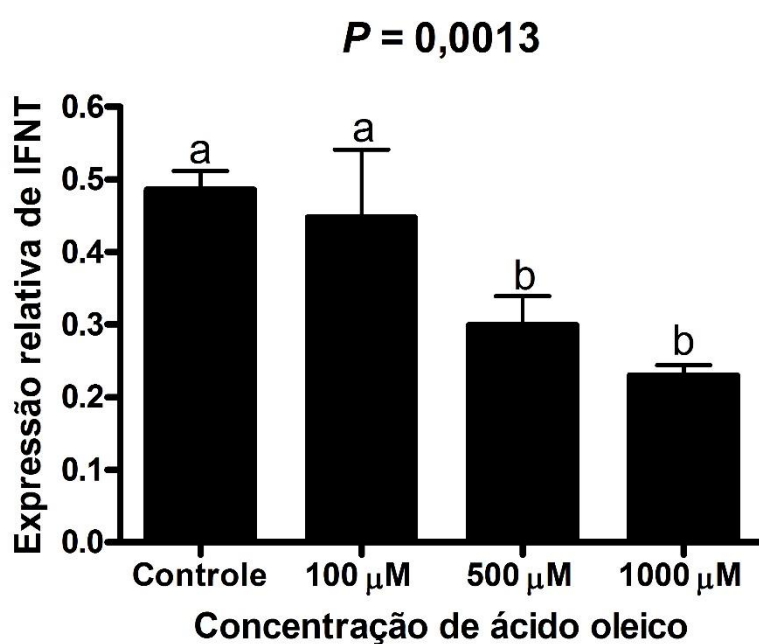


Fonte: elaborado pela autora.

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

**6.4 Expressão Relativa de IFNT.** Conforme ilustrado na **Figura 11**, os níveis de expressão relativa de IFNT foram menores ( $P = 0,0013$ ) nos grupos 500 e 1000  $\mu\text{M}$  ( $0,2986 \pm 0,0450$  e  $0,2300 \pm 0,0450$  respectivamente) quando comparados aos grupos controle e 100  $\mu\text{M}$  ( $0,4852 \pm 0,0450$  e  $0,4422 \pm 0,0491$  respectivamente).

Figura 11 - Expressão relativa do interferon-tau (IFNT) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR

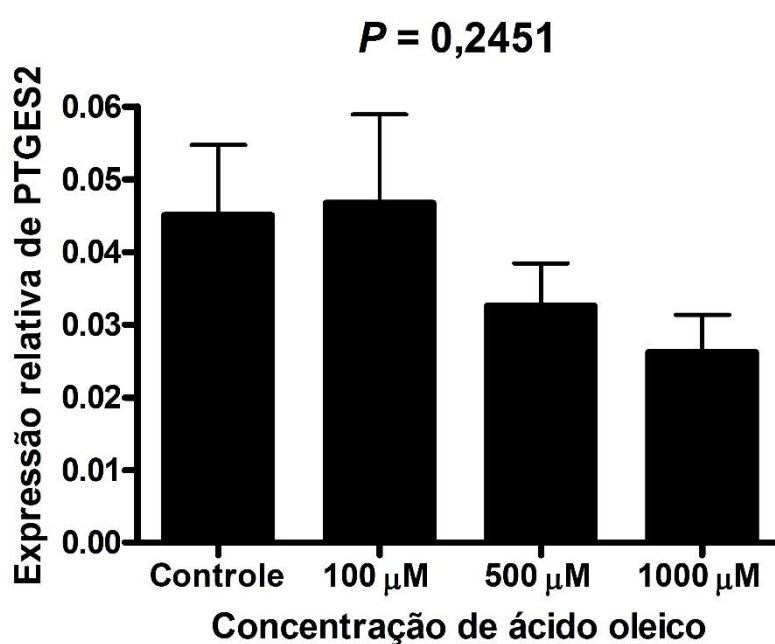


Fonte: elaborado pela autora.

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

**6.5 Expressão Relativa de PTGES2.** Conforme ilustrado na **Figura 12**, os níveis de expressão relativa de PTGES2 não diferiu entre os grupos ( $P = 0,2451$ ); sendo de  $0,0450 \pm 0,0096$ ;  $0,0467 \pm 0,0122$ ;  $0,0326 \pm 0,0057$  e  $0,0262 \pm 0,0051$  respectivamente para os grupos controle, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de AO.

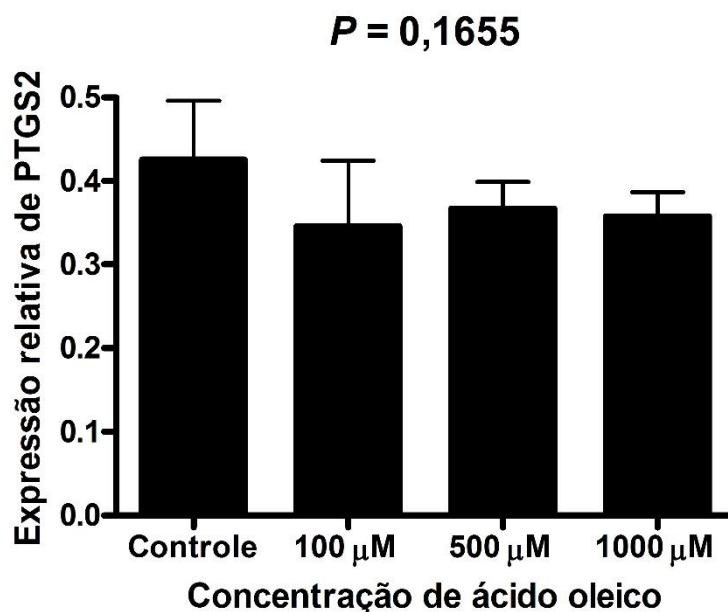
Figura 12 - Expressão relativa da Prostaglandina E sintase 2 (PTGES2) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR



Fonte: elaborado pela autora.

**6.6 Expressão Relativa de PTGS2.** Conforme ilustrado na **Figura 13**, os níveis de expressão relativa de PTGS2 não diferiu entre os grupos ( $P = 0,1655$ ); sendo de  $0,4256 \pm 0,0705$ ;  $0,3461 \pm 0,0783$ ;  $0,3167 \pm 0,0317$  e  $0,3576 \pm 0,0286$  respectivamente para os grupos controle, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de AO.

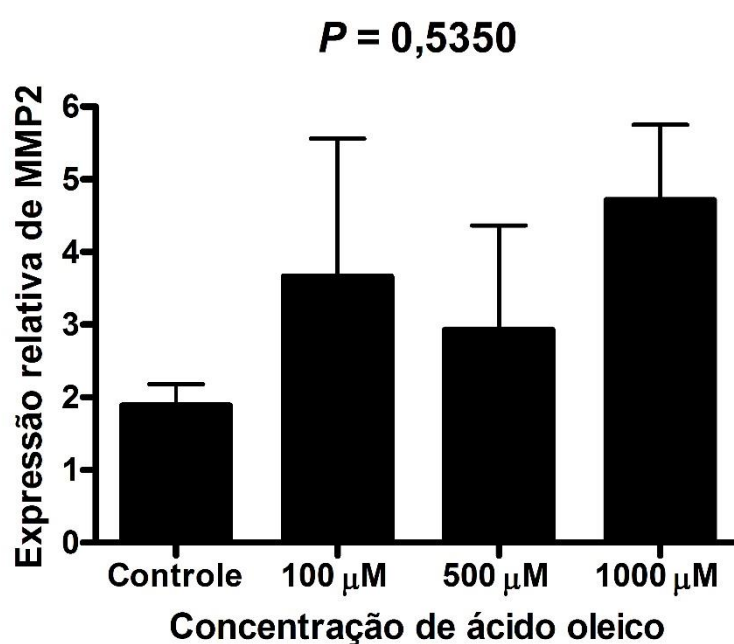
Figura 13 - Expressão relativa da Prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (PTGS2) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR



Fonte: elaborado pela autora.

**6.7 Expressão Relativa de MMP2.** Conforme ilustrado na **Figura 14**, os níveis de expressão relativa de MMP2 não diferiu entre os grupos ( $P = 0,5350$ ); sendo de  $1,8899 \pm 0,2947$ ;  $3,6633 \pm 1,8975$ ;  $2,9281 \pm 1,4376$  e  $4,7144 \pm 1,0354$  respectivamente para os grupos controle, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de AO.

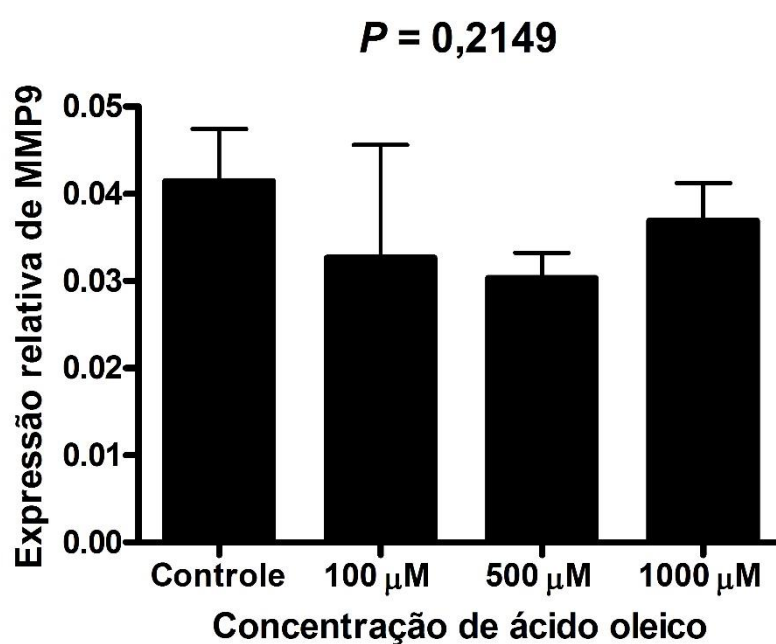
Figura 14 - Expressão relativa da matriz metalopeptidase 2 (MMP2) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR



Fonte: elaborado pela autora.

**6.8 Expressão Relativa de MMP9.** Conforme ilustrado na **Figura 15**, os níveis de expressão relativa de MMP9 não diferiu entre os grupos ( $P = 0,2149$ ); sendo de  $0,0414 \pm 0,0059$ ;  $0,0326 \pm 0,0129$ ;  $0,0303 \pm 0,0029$  e  $0,0368 \pm 0,0043$  respectivamente para os grupos controle, 100, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  de AO.

Figura 15 - Expressão relativa da matriz metalopeptidase 9 (MMP9) em CT-1 cultivadas com 0, 100, 500 ou 1000  $\mu\text{M}$  de AO durante 72 horas, avaliada pela técnica de RT-qPCR



Fonte: elaborado pela autora.

A **Figura 16** ilustra uma sumarização dos principais resultados.



## 7 DISCUSSÃO

Em nosso estudo prévio realizado pelo grupo (LOURENÇO, 2022) investigamos os efeitos da suplementação com AO no meio de cultivo na síntese de prostaglandinas pelas células CT-1. Verificamos que o tratamento com AO diminuiu a síntese de PGF2 $\alpha$  e aumentou a síntese de PGE2, de forma dose-dependente, onde tal efeito foi observado apenas quando se utilizou a concentração de 1000  $\mu$ M por 72 horas, enquanto não houve efeito para as concentrações de 50, 100, 200 e 500  $\mu$ M. Estratégias que possam favorecer a síntese de PGE2 e a razão PGE2/ PGF2 $\alpha$  tornam-se promissoras para aumentar o êxito do conceito no RMF. Em complemento ao estudo de Lourenço (2022), neste estudo atual do grupo, avaliamos o efeito do tratamento com AO na expressão de genes alvos no biossínese de PGE2 e PGF2 $\alpha$ ; assim como outros genes envolvidos no RMF. Nossa descoberta mais importante foi que o tratamento com AO, de forma dose-dependente, nas concentrações de 500 e 1000  $\mu$ M; aumentou a abundância do transcrito PTGES1, envolvido na conversão de PGH2 em PGE2, desta forma favorecendo a biossínese de PGE2. Também observamos uma redução na abundância do transcrito AKR1B1, envolvido na conversão de PGH2 em PGF2 $\alpha$ , desta forma desfavorecendo a biossínese de PGF2 $\alpha$ . Observamos que o AO diminui a abundância do transcrito para PTGER4, um dos quatro tipos de receptores para a PGE2 e não alterou transcritos relacionados à matriz metalopeptidase (MMP2 e MMP9). Verificamos que a abundância de transcritos para o IFNT foi diminuída pelo tratamento com AO nas concentrações de 500 e 1000  $\mu$ M, resultado diferente do esperado.

Os achados no presente trabalho elucidam em parte os resultados obtidos por Lourenço (2022), onde o aumento nos níveis de expressão relativa de PTGES1, enzima responsável por converter PGH2 em PGE2, possivelmente tenha favorecido o aumento da síntese de PGE2. Em complemento, a redução na expressão relativa de AKR1B1 observada neste estudo, enzima responsável pela conversão de PGH2 em PGF2 $\alpha$ , possivelmente tenha desfavorecido a síntese de PGF2 $\alpha$ . A redução na expressão relativa de AKR1B1, promoveria uma maior disponibilidade de PGH2 que agora por maior abundância de PTGES1, aumentaria a conversão de PGH2 em mais PGE2.

Este estudo representa parte de uma investigação maior realizada pelo grupo, que avalia a suplementação com diferentes ácidos graxos no meio de células trofoblásticas bovinas CT-1 e embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para os ácidos

graxos testados: ácido linoleico não conjugado (AL; C18:2 $\omega$ 6), ácido oleico (AO; C18:1 $\omega$ 9) e uma mistura contendo ácido eicosapentanoico (EPA; 20:5 $\omega$ 3) + docosahexanoico (DHA; 22:6 $\omega$ 3). Maldonado *et al.* 2023, realizou estudo similar cultivando células CT-1 com ácido linoleico conjugado (CLA), este um representante da família  $\omega$ 6. Os autores verificaram que CT-1 suplementados com CLA nas concentrações de 10, 20, 50, 100  $\mu$ M por 72 horas, em todas as doses testadas nas CT-1 apresentaram redução da síntese de PGF2 $\alpha$  e PGE2; entretanto foi verificado um aumento da razão PGE2/PGF2 $\alpha$ . Quando a expressão dos mesmos transcritos averiguados em nosso estudo, foi avaliada por Maldonado *et al.* (2023), verificou-se que a suplementação com CLA exerceu um efeito quadrático na expressão relativa dos transcritos de PTGES2 e PTGER4. Os níveis relativos da expressão de PTGES2, PTGER4 e MMP9 foram reduzidos em células CT-1 cultivadas com 100  $\mu$ M comparado ao grupo não tratado e tratado com 10  $\mu$ M. A expressão dos outros genes analisados (PTGES, PTGS2, AKR1B1, MMP2, IFNT) não foi alterada pela suplementação com CLA. Assim, os mesmos autores verificaram que para a maior concentração testada (100  $\mu$ M) houve uma redução na abundância PTGER4 e PTGES2 comparado ao uso de 10  $\mu$ M. Em nosso estudo, de forma similar, o AO promoveu na dose de 500 e 1000  $\mu$ M, diminuição na abundância de PTGER4 entretanto não alterou a abundância de PTGES2.

Em nosso estudo não era esperado que a abundância de IFNT fosse reduzida em células CT-1 cultivadas com AO. Sabidamente uma das ações do IFNT, em células endometriais bovinas durante o RMF, refere-se a sua ação em aumentar a síntese de PGE2 e diminuir a de PGF2 $\alpha$  em prol do RMF. No presente estudo, considerando ter havido um aumento na síntese de PGE2, esperava-se que também que houvesse um aumento no transcrito para IFNT, evento que não ocorreu. Uma das hipóteses para a redução de IFNT associado as maiores concentrações de PGE2 no meio de cultivo refere-se a sua ação, bem conhecida em células endometriais, onde o IFNT antecede o aumento da síntese de PGE2. Assim, considerando que a abundância foi mensurada em CT-1 cultivadas por 72 horas com AO, acreditamos que possivelmente o aumento da abundância do transcrito para IFNT tenha antecedido às 72 horas.

Em nosso estudo, dois mecanismos poderiam estar promovendo aumento da concentração de PGE2 na referida dose. O primeiro mecanismo poderia ser a inibição da síntese de PGF2 $\alpha$  pelo AO, evento que restringiria a síntese de PGF2 $\alpha$  promovendo um acúmulo de AA nas células, levando assim a uma maior

disponibilidade de AA, favorecendo a maior conversão de AA em PGE2. O segundo mecanismo refere-se ao fato de que o AO pode estimular diretamente a síntese de PGE2 pelo aumento da abundância de PTGES1. Niringiyumukiza, Cai e Xiang (2018), relatam a importância do aumento da PGE2 no desenvolvimento embrionário, especificamente na proliferação das células embrionárias e trofoblásticas permitindo assim um maior êxito no RMF.

Em um estudo de Cheng *et al.* (2015), os autores observaram que células endometriais de ovelhas expostas a baixas concentrações de AO (20 e 100  $\mu$ M) por 24 horas tiveram incremento na síntese de PGE2, redução de PGF2 $\alpha$  e duplicação da razão PGE2/PGF2 $\alpha$ . No estudo de Lourenço (2022), observamos um incremento na síntese de PGE2 e uma redução de PGF2 $\alpha$  apenas na maior concentração utilizada (1000  $\mu$ M), embora tal concentração não tenha alterado a razão PGE2/PGF2 $\alpha$ . Lourenço (2022), diferente de Cheng *et al.* (2015) que utilizaram uma linhagem celular de origem materna, utilizou uma linhagem de origem embrionária (CT-1). Além disso o tempo de exposição ao AO em nosso estudo foi muito mais longo (72 horas) comparado ao estudo de Cheng *et al.* (2015) que foi de 24 horas. Em conjunto, esses dados indicam que linhagens celulares de origem materna e embrionária respondem de forma diferente a diferentes concentrações de AO, ou seja, enquanto baixas concentrações de AO (20 e 100  $\mu$ M) favorecem a síntese de PGE2 e desfavorecem PGF2 $\alpha$  em células de origem materna, células de origem embrionárias mostram efeitos semelhantes apenas em concentrações mais altas de AO (1000  $\mu$ M). Além disso, o período de exposição com AO também pode ser outro fator importante no contexto da síntese das duas prostaglandinas investigadas.

Em outro estudo, foi investigado a expressão de mRNA de enzimas envolvidas na síntese de PGE2 em embriões produzidos *in vitro* em novilhas holandesas. Os autores verificaram que todos os embriões bovinos produzidos *in vitro* 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). Similarmente, em embriões humanos, a PTGS2 foi predominantemente expressa em embriões de 8 células, mórula e blastocisto (WANG *et al.*, 2002). Em nosso estudo com células trofoblásticas, em concordância aos achados de Saint-Dizier *et al.* (2011), verificamos que o aumento

da síntese de PGE2 foi relacionado de fato a um aumento na abundância do transcrito PTGES1 sem ter havido alteração na abundância de PTGS2.

Saint-Dizier *et al.* (2011), também verificaram que embriões de excelente qualidade (Grau 1) apresentaram níveis mais elevados de PTGS2 e PTGES1 quando comparado aos embriões de boa e média qualidade (Grau 2 e 3), e que a maior produção de PGE2 pelo embrião aumentaria sua competência no desenvolvimento. Em nosso estudo, o fato do AO aumentar a abundância de PTGES1 poderia contribuir para o desenvolvimento do embrião e favorecimento do RMF. Este conjunto de observações, indica que PTGS2 e PTGES1 podem ser bons marcadores genéticos candidatos de competência de desenvolvimento em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Em nosso estudo encontramos aumento na abundância de PTGES1 em CT-1 tratadas com 500 e 1000  $\mu$ M de AO, condição que favoreceu a maior síntese de PGE2.

A PGE2 originada do embrião bovino pode ter efeitos parácrinos e/ou endócrinos tanto no oviduto como no endométrio, uma vez que vários subtipos do receptor PGE2 acoplado à proteína G (EP) são expressos em células do oviduto bovino durante todas as fases do ciclo estral (GABLER *et al.*, 2008) e em tecidos uterinos durante os primeiros 50 dias de gestação (AROSH *et al.*, 2004). Em nosso estudo foi verificada uma redução dos receptores para PGE2 do tipo 4 (EP4) nas CT-1. Tal achado permite pressupor que as ações da PGE2 por mecanismos autócrinos seriam menos prováveis. Assim, podemos pressupor que as ações de PGE2 possam estar mais vinculadas ao endométrio materno e ao corpo lúteo do que as próprias células trofoblásticas do embrião.

O tratamento com AO não alterou a MMP2 e MMP9. A expectativa era que em favorecimento ao RMF houvesse um aumento na abundância de transcritos para MMP2 e redução para MMP9. Desta forma não evidenciamos a ação do AO na remodelação de MEC.

## 8 CONCLUSÃO

A suplementação de células trofoblásticas CT-1 com AO nas concentrações de 500 e 1000  $\mu$ M durante 72 horas, aumenta abundância do transcrito PTGES1, diminui a abundância para PTGER4, AKR1B1 e IFNT e não altera PTGS2, PTGES2, MMP2 e MMP9.

## 9 REFERÊNCIAS

ABRAFRIGO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FRIGORÍFICOS –. Exportações totais de carne bovina fecham em queda no primeiro semestre, diz Abrafrigo.

**Clipping da ABRAFRIGO**, n. 2024, 19 jul. 2023. Disponível em:

<https://www.abrafrigo.com.br/index.php/2023/07/19/clipping-da-abrafrigo-no-2024-de-19-de-julho-de-2023/>. Acesso em: 20 jan. 2024.

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; MCCRACKEN, J. A. Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. **J. Dairy Sci.**, [s.l.], v. 99, p. 5926-5940, 2016.

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; KIMMINS, S.; CHAPDELAINE, P.; MACLAREN, L. A.; FORTIER, M. A. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. **Endocrinology**, [s.l.], v. 145, 5280e93, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **Index ASBIA: 1º** trimestre de 2023. Disponível em: <https://asbia.org.br/index-asbia/>. Acesso em: 20 jan. 2024.

BAI, S. X.; WANG, Y.L.; QIN, L.; XIAO, Z. J.; HERVA, R.; PIAO, Y. S. Dynamic expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, -9 and -14) and the tissue inhibitors of MMPs (TIMP-1, -2 and -3) at the implantation site during tubal pregnancy. **Reproduction**, [s.l.], v. 129, p. 103-113, 2005.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 56, p. 1483–1496, 2010.

BARUSELLI, P. S. Com desaceleração de 5% em 2022, mercado da IATF registra primeiro recuo em 20 anos. *In*: BOLETIM Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP. 7. ed. [S.l.: s.n.], 2023. Disponível em: <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>. Acesso em: 20 jan. 2024.

BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C. M.; SALES, J. N. S.; FERREIRA, R. M. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinaria**, [s.l.], v. 36, p. 433-448, 2008.

BEEHARRY, N.; CHAMBERS, J. A.; GREEN, I. C. Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition. **Apoptosis**, [s.l.], v. 9, p. 599-607, 2004.

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

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, [s.l.], v. 139, p. 1047–1055, 2010.

BERGER, J.; MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu. Rev. Med.**, [s.l.], v. 53, p 409–435, 2002.

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.

BILBY, T. R.; BLOCK, J.; DO AMARAL, B. C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F. T.; HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, [s.l.], v. 89, n. 10, p. 3891-3903, 2006.

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

BORUSZEWSKA, D.; GRZYMACHER, 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. 15, n. 133, p.45-55, jul. 2019.

BROOKS, K.; SPENCER, T. E. Biological roles of interferon tau (IFNT) and type I IFN receptors in elongation of the ovine conceptus. **Biol. Reprod.**, [s.l.], v. 92, n. 47, 2015.

BROSENS, I.; PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; ROMERO, R. The "Great Obstetrical Syndromes" are associated with disorders of deep placentation. **Am J Obstet Gynecol**, [s.l.], v. 204, p. 193-201, 2011.

CHENG, Z.; ABAYASEKARA, D. R. E.; ELMES, M.; KIRKUP, S.; WATHES, D.C. Effect of oleic acid supplementation on prostaglandin production in maternal endometrial and fetal allantochorion cells isolated from late gestation ewes. **Placenta**, [s.l.], v. 36, p. 1011–1017, 2015.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 345-358, 2009.

CHOI, H. K.; CHOI, B. C.; LEE, S. H.; KIM, J. W.; CHA, K. Y.; BAEK, K.H. Expression of angiogenesis and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. **Mol. Reprod. Dev.**, [s.l.], v. 66, p. 24-31, 2003.

CORDEIRO, M. B.; PERES, M. S.; DE SOUZA, J. M.; GASPAR, P; BARBIERE, F.; SÁ FILHO, M. F.; FILHO, M. M.; DINARDI, R. N.; NOGUEIRA, G. P. ; MESQUITA, F. S.; PUGLIESI, G.; MARTINS, T.; BINELLI, M.; MEMBRIVE, C. M. B. Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol

concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v. 83, p. 1461-1468, 2015.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R.A. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, [s.l.], v. 147, p. 1–73, 2017.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocr. Rev.**, [s.l.], v. 20, p. 649–668, 1999.

DORNIK, P.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. **Biol. Reprod.**, [s.l.], v. 84, p. 1119–1127, 2011.

DUNNING, K. R.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and  $\beta$ -oxidation. **Reproduction**, [s.l.], v. 148, R15–27, 2014.

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

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.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer.**, [s.l.], v. 2, p. 161–174, 2002.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiol. Genomics**, [s.l.], v. 28, p. 84–96, 2006.

FAO. **Meat market review**: emerging trends and outlook. Rome: FAO, 2022.

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

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.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of reproduction**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.9-17, 2007.

FRANKENBERG, S. R.; DE BARROS, F. R. O.; ROSSANT, J.; RENFREE, M. B. The mammalian blastocyst. Wiley Interdiscip. **Rev. Dev. Biol.**, [s.l.], v. 5, 210e32, 2016.

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

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.

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

GODBOLE, G.; SUMAN, P.; GUPTA, S. K.; MODI, D. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion. **Fertil. Steril**, [s.l.], v. 95, p. 1278–1283, 2011.

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

GONZÁLEZ-SERRANO, A. F.; PIRRO, V.; FERREIRA, C. R.; OLIVERI, P.; EBERLIN, L. S.; HEINZMANN, J.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; COOKS, R.G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. **PLoS One**, [s.l.], v. 8, e74981, 2013.

GRYCMACHER, K.; BORUSZEWSKA, D.; SINDEREWICZ, E.; KOWALCZYK-ZIĘBA, I.; STASZKIEWICZ-CHODOR, J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I. Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) 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.

GUREVICH, M.; HAREL-MARKOWITZ, E.; MARCUS, S.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M. Prostaglandin production by the oocyte cumulus complex around the time of fertilization and the effect of prostaglandin E on the development of the early bovine embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, [s.l.], v. 5, p. 281-283, 1993.

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

HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle:an overview. **Theriogenology**, [s.l.], v. 65, n. 1, p. 119-125, 2006.

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

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

HOMA, S.T.; RACOWSKY, C.; MCGAUGHEY, R. W. Lipid analysis of immature pig oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, [s.l.], v. 77, p. 425–34, 1986.

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.

INAGAKI, N.; STERN, C.; MCBAIN, J.; LOPATA, A.; KORNMAN, L.; WILKINSON, D. Analysis of intra-uterine cytokine concentration and matrix-metalloproteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer. **Hum. Reprod.**, [s.l.], v. 18, p. 608-615, 2003.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rebanho de bovinos (bois e vacas)**. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>. Acesso em: 20 jan. 2024.

JABLONSKA-TRYPUC, A.; MATEJCZYK, M.; ROSOCHACKI, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. **J. Enzym. Inhib. Med. Chem.**, [s.l.], v. 31, 177–183, 2016.

KAPOOR, C.; VAIDYA, S.; WADHWAN, V.; KAUR, G.; PATHAK, A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). **J. Cancer Res. Ther.**, [s.l.], v. 12, p. 28–35, 2016.

KARAŞAHİN, T. The effect of oleic and linoleic acid addition to the culture media on bovine embryonic development following vitrification. **Pol. J. Vet. Sci.**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 661-666, dez. 2019.

KARTHIKEYAN, V. J.; LANE, D. A.; BEEVERS, D. G.; LIP, G. Y.; BLANN, A. D. Matrixmetalloproteinases and their tissue inhibitors in hypertension-related pregnancy complications. **J. Hum. Hypertens.**, [s.l.], v. 27, p. 72–78, 2013.

KASTELIC, J. P.; CURRAN, S.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. **Theriogenology**, [s.l.], v. 29, p. 39–54, 1998.

KIZAKI, K.; USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; YAMADA, O.; TODOROKI, J.; SATO, T.; ITO, A.; HASHIZUME, K. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s.l.], v. 6, n. 66, 2008.

LEROY, J. L.; VALCKX, S. D.; ARIAS-ALVAREZ, M.; DE PAUW, I.; FIEVEZ, V.; VLAEMINCK, B.; FRANSEN, E. Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 1-11, 2014.

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

LISTENBERGER, L. L.; HAN, X.; LEWIS, S. E.; CASES, S.; FARESE JR, R. V.; ORY, D. S.; SCHAFFER, J. E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, [s.l.], v. 100, p. 3077-3082, 2003.

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

LIU, G.; ZHANG, X.; LIN, H.; WANG, H.; LI, Q.; NI, J.; ZHU, C. Effects of E-cadherin on mouse embryo implantation and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, [s.l.], v. 343, p. 832-838, 2006.

LONERGAN, P.; FORDE, N. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. **Animal**, [s.l.], Suppl. 1, p. 64–69, 2014.

LOPEZ, S.; BERMUDEZ, B.; MONTSERRAT-DE LA PAZ, S.; JARAMILLO, S.; VARELA, L. M.; ORTEGA-GOMEZ, A.; ABIA, R.; MURIANA, F. J. G. Membrane composition and dynamics: A target of bioactive virgin olive oil constituents. **Biochim. Biophys. Acta**, [s.l.], v. 1838, p. 1638–1656, 2014.

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

MACHADO, R. S.; SUDANO, R. J.; BARBOSA, R. T.; BERGAMASCHI, M. A. M. C.; BINELLI, M. Metodologia para obtenção de conceito bovino. *In*: BOLETIM de Pesquisa e Desenvolvimento. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. p. 22.

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.

MAREI, W. F.; ABAYASEKARA, D. R. E.; WATHES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. Role of PTGS2- generated PGE2 during gonadotrophin-induced bovine oocyte maturation and cumulus cell expansion. **Reprod. Biomed. Online**, [s.l.], v. 28, 388e400, 2014.

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

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

McCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiol Rev.**, [s.l.], v. 72, p. 263-323, 1999.

MCLAREN, J.; TAYLOR, D. J.; BELL, S. C. Prostaglandin E2-dependent production of latent matrix metalloproteinase-9 in cultures of human fetal membranes. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 11, p. 1033–1040, 1 nov. 2000.

MONDADORI, R. G.; NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. Protein kinase C (PKC) role in bovine oocyte maturation and early embryo development. **Anim. Reprod. Sci.**, [s.l.], v. 107, p. 20–29, 2008.

MORRISH, D. W.; DAKOUR, J.; LI, H. Functional regulation of human trophoblast differentiation. **J. Reprod. Immunol.**, [s.l.], v. 39, p. 179-195, 1998.

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.

MULAYIM, N.; SAVLU, A.; GUZELOGLU-KAYISLI, O.; KAYISLI, U.A.; ARICI, A. Regulation of endometrial stromal cell matrix metalloproteinase activity and invasiveness by interleukin-8. **Fertil Steril**, [s.l.], v. 81, Suppl 1, p. 904-911, 2004.

NEGRON-PEREZ, V. M.; HANSEN, P. J. The bovine embryo hatches from the zona pellucida through either the embryonic or abembryonic pole. **J. Assist. Reprod. Genet.**, [s.l.], v. 34, 725e31, 2017.

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. PTGS2- Related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development. **Biol. Reprod.**, [s.l.], v. 84, 1248e57, 2011.

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.

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

PANDEY, M.; AWASTHI, S. Role of MMP-1, MMP-8 and MMP-9 gene polymorphisms in preterm birth. **J. Genet.**, [s.l.], v. 99, 2020.

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

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

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

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

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

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic. Acids Res.**, [s.l.], v. 29, e45, 2001.

PRATES, E. G.; ALVES, S. P.; MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C.; HORTA, A. E. M.; BESSA, R. J. B.; PEREIRA, R. M. Fatty acid composition of porcine cumulus oocyte complexes (COC) during maturation: effect of the lipid modulators trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (t10,c12 CLA) and forskolin. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.**, [s.l.], v. 49, 335–345, 2013.

RAHAT, B.; SHARMA, R.; BAGGA, R.; HAMID, A.; KAUR, J. Imbalance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preeclampsia and gestational trophoblastic diseases. **Reproduction**, [s.l.], v. 152, p. 11-22, 2016.

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.

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

ROBERTS, S.J. Gestation period: embryology, fetal membranes and placenta. In: ROBERTS, S. J. (ed.). **Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology)**. Ann Arbor: Edward Brothers, 1996. p. 38–50.

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

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & therapeutics**, [s.l.], v. 83, n. 3, p. 217–244, 1999.

ROTH, G. A.; JOHNSON, C.; ABAJOBIR, A.; ABDALLAH, F.; ABERA, S. F.; ABYU, G.; AHMED, M.; AKSUT, B.; ALAM, T.; ALAM, K. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. **J. Am. Coll. Cardiol.**, [s.l.], v. 70, p. 1–25, 2017.

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

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cattle. I. Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, [s.l.], v. 72, p. 210–218, 2009.

SAKAMURI, S.; WATTS, R.; TAKAWALE, A.; WANG, X.; HERNANDEZ-ANZALDO, S.; BAHITHAM, W.; FERNANDEZ-PATRON, C.; LEHNER, R.; KASSIRI, Z. Absence of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 (TIMP4) ameliorates high fat diet-induced obesity in mice due to defective lipid absorption. **Sci. Rep.**, [s.l.], v.7, n. 6210, 2017.

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.

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

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; BALLOU, M. A.; HIGGINBOTHAM, G. E.; KIRK, J. H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive

performance of holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, [s.l.], v. 80, p. 31-45, 2004.

SARASWATHI, V.; WU, G.; TOBOREK, M.; HENNIG, B. Linoleic acid-induced endothelial activation: role of calcium and peroxynitrite signaling. **J. Lipid Res.**, [s.l.], v. 45, p.794-804, 2004.

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

SAYRE, B. L.; LEWIS, G. S. Arachidonic acid metabolism during early development of ovine embryos: a possible relationship to shedding of the zona pellucida. **Prostaglandins**, [s.l.], v. 45, p. 557e69, 1993.

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

SIMMONS, R. M.; SATTERFIELD, M. C.; WELSH JR, T. H.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. HSD11B1, HSD11B2, PTGS2, and NR3C1 expression in the periimplantation ovine uterus: effects of pregnancy, progesterone, and interferon tau. **Biol. Reprod.**, [s.l.], 2010.

SIRARD, M. A. Activation of the embryonic genome. **Soc Reprod Fertil Suppl.**, [s.l.], v. 67, 145e58, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES – SBTE. A pandemia e o mercado de embriões. **Jornal O embrião**, [s.l.], v. 36, n. 67, 2021. Disponível em: [https://www.sbte.org.br/arquivos/jornal/Ed\\_67\\_Oembriao\\_Site-4.pdf](https://www.sbte.org.br/arquivos/jornal/Ed_67_Oembriao_Site-4.pdf). Acesso em: 20 jan. 2024.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal Animal Science**, [s.l.], v. 82, E4-E13, 2004a.

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

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

STOUT, T. A.; ALLEN WR. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Reproduction**, [s.l.], v. 121, 771e5, 2001.

STRÖHLE, A.; DÖRING, F. Molecularization in nutritional science: a view from philosophy of science. **Mol. Nutr. Food Res.**, [s.l.], v. 54, p. 1385–1404, 2010.

SUMAN, P.; GUPTA, S. K. Comparative analysis of the invasion-associated genes expression pattern in first trimester trophoblastic (HTR-8/SVneo) and JEG-3 choriocarcinoma cells. **Placenta**, [s.l.], v. 33, p. 874-877, 2012.

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

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

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

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

THATCHER, W. W.; 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**, [s.l.], v. 56, p. 1435-1440, 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.

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

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

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.

WANG, G.; TSUJII, H. Metabolism of exogenous palmitic and oleic acids by preimplantation mouse embryos. **J. Mamm. Ova Res.**, [s.l.], v. 16, p. 10–15, 2009.

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

WATERS, S. M.; COYNE, G. S.; KENNY, D. A.; MACHUGH, D. E.; MORRIS, D. G. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation alters the expression of genes involved in the control of fertility in the bovine uterine endometrium. **Physiol. Genomics**, [s.l.], v. 44, p. 878–888, 2012.

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

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

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

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

WIJAYAGUNAWARDANE, M. P.; MIYAMOTO, A.; TAQUAHASHI, Y.; GABLER, C. ACOSTA, T. J.; NISHIMURA, M.; KILLIAN, G.; SATO, K. *In vitro* regulation of local secretion and contraction of the bovine oviduct: stimulation by luteinizing hormone, endothelin-1 and prostaglandins, and inhibition by oxytocin. **J. Endocrinol.** [s.l.], v. 168, 117e30, 2001.

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

WILSON, J. M.; ZALESKY, D. D.; LOONEY, C. R.; BONDIOLI, K. R.; MAGNESS, R. R. Hormone-secretion by preimplantation embryos in a dynamic *in vitro* culture system. **Biol. Reprod.**, [s.l.], v. 46, p. 295–300, 1992.

YAN, Y.; FANG, L.; LI, Y.; YU, Y.; LI, Y.; CHENG, J. C.; SUN, Y. P. Association of MMP2 and MMP9 gene polymorphisms with the recurrent spontaneous abortion: a meta-analysis. **Gene**, [s.l.], v. 30, n. 767, p. 145173, 2021.

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.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, [s.l.], v.13, p. 134, 2012.

ZHANG, B.; YE, S.; HERRMANN, S. M.; ERIKSSON, P.; DE MAAT, M.; EVANS, A.; ARVEILER, D.; LUC, G.; CAMBIEN, F.; HAMSTEN, A.; WATKINS, H.; HENNEY, A. M. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. **Circulation**, [s.l.], v. 99, p. 1788-1794, 1999.