

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS (FCAT)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL
CAMPUS DE DRACENA**

Dayane Colhados Cabrini

Médica Veterinária

**ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO ADICIONADO AO MEIO
DE CULTIVO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* ALTERA A SECREÇÃO DE
PROSTAGLANDINA F2 α E E2**

Dracena - SP

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS (FCAT)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL
CAMPUS DE DRACENA**

Dayane Colhados Cabrini

Médica Veterinária

**ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO ADICIONADO AO MEIO
DE CULTIVO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* ALTERA A SECREÇÃO DE
PROSTAGLANDINA F2 α E E2**

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

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

Dracena - SP

2023

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

C117a

Cabrini, Dayane Colhados.

Ácido linoleico conjugado adicionado ao meio de cultivo de Oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro altera a secreção de prostaglandina F2 α e E2 / Dayane Colhados Cabrini. -- Dracena: [s.n.], 2023.

80 f. : il.

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

Orientador: Claudia Maria Bertan Membrive

Co-orientadora: Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado

1. Ácidos graxos. 2. Ácidos graxos Ômega-6. 3. Oócito. 4. Embrião. 5. Prostaglandinas. Título.

Bibliotecário Fábio S. Rosas
CRB 8/6665

IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE

No que se refere aos dezessete objetivos preconizados pela Organização das Nações Unidas até 2030, o Brasil busca aumentar o número de bezerros geneticamente superiores nascidos, assim tem empregado a produção *in vitro* de embriões (PIVE). O uso de CLA nos meios de cultivo da PIVE pode gerar embriões mais competentes em estabelecerem a prenhez.

EXPECTED IMPACT ON SOCIETY

With regard to the seventeen aims established by the United Nations Organization until 2030, Brazil seeks to increase the number of genetically superior calves born, thus it has used in vitro embryo production (IVEP). The use of CLA in IVEP culture medium can generate embryos that are more competent in establishing pregnancy.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA
DISSERTAÇÃO:

**ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO ADICIONADO AO MEIO DE CULTIVO
DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN*
VITRO ALTERA A SECREÇÃO DE PROSTAGLANDINA F2a E
E2"**

AUTORA: DAYANE COLHADOS CABRINI

ORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

COORIENTADORA: MARIÂNGELA BUENO CORDEIRO MALDONADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência e Tecnologia Animal, pela Comissão Examinadora:



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



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



Profa. Dra. CALIÊ CASTILHO (Participação
Departamento de Clínica de Reprodução Animal / UNOESTE - Presidente Prudente, SP

Documento assinado digitalmente

CALIÊ CASTILHO SILVESTRE

Data: 01/08/2023 18:32:13-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dracena, 01 de agosto de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Dayane Colhados Cabrini, nascida em 26 de maio de 1995, na cidade de Ourinhos - SP. Em 2015, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade de Marília (UNIMAR), tendo concluído em dezembro de 2019. Durante a graduação, realizou estágio curricular no Laboratório de Fertilização *In Vitro* Central Senepol, sediado na cidade de Marília - SP, onde foi contratada e exerceu a função de auxiliar de laboratório de 2020 a 2022. Em agosto de 2021, ingressou no Mestrado acadêmico em Ciência e Tecnologia Animal pela FCAT (UNESP), em Dracena - SP, sob orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive. Em 2022, foi contratada como técnica de laboratório na Canto Porto Exportação de Embriões (CPEX), na cidade de Mogi Mirim - SP. Atualmente trabalha na equipe de expansão da multinacional Vytelle. De 2020 até o momento, produziu aproximadamente 25.000 embriões bovinos *in vitro*.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, **Sérgio Ricardo Boechat Cabrini** e **Maria Eliane Gonçalves Colhados Cabrini**, e a todos que me ofereceram oportunidades e apoio para que eu alcançasse meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, assim como a minha família e amigos por acreditarem nos meus sonhos e me darem forças para realizá-los.

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 e Tecnologia Animal**, da UNESP Câmpus de Dracena e Ilha Solteira, pelos ensinamentos e formação.

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

A minha coorientadora, **Dra. Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado**, pós-doutoranda junto ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências e Letras, UNESP Câmpus de Assis, pelo auxílio nos experimentos e pela imensa colaboração científica na realização deste estudo.

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

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 imensa colaboração na análise estatística dos dados.

Ao **Prof. Dr. Alan Ealy**, do Department of Animal and Poultry Science da Virginia Tech, pela imensa colaboração científica ao grupo. Agradeço por dividir suas experiências e tornar nossos estudos mais relevantes.

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

A **Central Senepol LAB FIV**, agradeço pelas oportunidades, por todo carinho e por estimularem o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

A **Canto Porto Exportação de Embriões (CPEX)**, em especial ao Dr. Rodrigo Camponogara Bohrer, pelo apoio para a realização do mestrado.

Ao **Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião (LIFE)** e a **todos os seus integrantes**. Agradeço o apoio e principalmente por todo trabalho desenvolvido.

RESUMO

A PGF2 α foi reconhecida como a principal molécula luteolítica em fêmeas ruminantes, sendo secretada quando há insucesso no reconhecimento materno fetal (RMF). A PGE2, sintetizada pelo endométrio materno e células trofoblásticas do concepto, determina efeitos anti-luteolíticos e luteotróficos que favorecem o RMF. Alguns ácidos graxos específicos podem alterar a biossíntese de PGF2 α e PGE2, dentre estes o ácido linoleico conjugado (CLA). A hipótese é que a suplementação com CLA durante a maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV) ou somente durante a CIV, estimula nos oócitos durante a MIV e nos embriões durante a CIV a menor síntese de PGF2 α , maior síntese de PGE2, maior razão PGE2/PGF2 α e maior taxa de blastocistos produzidos no D7 e D9 (D0 = dia da fertilização), sendo tal efeito dose dependente. Objetivou-se com este estudo determinar os efeitos de diferentes concentrações de CLA (0, 50, 100 e 150 μ M) na MIV e CIV, onde a mesma concentração foi utilizada durante a MIV e CIV (Experimento 1) ou somente na CIV (Experimento 2,) nas concentrações de PGF2 α e PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α no meio de cultivo ao término da MIV (após 24 horas de cultivo) e da CIV (após 9 dias de cultivo), assim como a taxa de produção de blastocisto no D7 e D9. O uso do CLA na MIV e CIV, para todas às concentrações testadas, promoveu uma menor secreção de PGF2 α (P < 0,0001) e PGE2 (P = 0,0034), embora não tenha afetado a razão PGE2/PGF2 α (P = 0,1902). Quando o CLA foi utilizado apenas na CIV, para todas às concentrações testadas, promoveu uma menor secreção de PGF2 α (P = 0,0005) e PGE2 (P = 0,0046), embora não tenha afetado a razão PGE2/PGF2 α (P = 0,9087). Quanto a produção de blastocistos no D7, o CLA utilizado na MIV e CIV em todas as doses testadas não aumentou taxa de produção blastocisto no D7 e quando o CLA foi utilizado apenas na CIV a concentração de 150 μ M de CLA diminuiu a taxa de blastocistos no D9, quando comparada a concentração de 50 μ M. Conclui-se que a suplementação com CLA, em todas as doses testadas, durante a MIV e CIV ou exclusivamente na CIV diminui nos embriões a secreção de PGE2 e PGF2 α embora não tenha alterado a razão PGE2/PGF2 α . O uso de CLA na CIV na concentração de 150 μ M diminui a taxa de blastocisto eclodido no D9 comparado a concentração de 50 μ M.

Palavras chaves: Ácidos graxos. Ácidos graxos Ômega-6. Oócito. Embrião. Prostaglandinas.

ABSTRACT

PGF 2α was recognized as the main luteolytic molecule in female ruminants, being secreted when there is failure in maternal-fetal recognition (MFR). PGE 2 synthesized by the maternal endometrium and conceptus trophoblastic cells, determines anti-luteolytic and luteotrophic effects that favor MFR. Some specific fatty acids can alter the biosynthesis of PGF 2α and PGE 2 , among them conjugated linoleic acid (CLA). The hypothesis is that supplementation with CLA during in vitro oocyte maturation (IVM) and in vitro embryo culture (IVC) or only during IVC stimulates in oocytes during IVM and in embryos during IVC a lower synthesis of PGF 2α , higher PGE 2 synthesis, higher PGE 2 /PGF 2α ratio and higher rate of blastocysts produced on D7 and D9 (D0 = fertilization day), such effect being dose dependent. Thus, the aim of this study was to determine the effects of different concentrations of CLA (0, 50, 100 and 150 μ M) on IVM and IVC, where the same concentration was used during IVM and IVC (Experiment 1) or only in IVC (Experiment 2), in the concentrations of PGF 2α and PGE 2 and the PGE 2 /PGF 2α ratio in the culture medium at the end of IVM (after 24 hours of culture) and IVC (after 9 days of culture), as well as the rate of blastocyst production on D7 and D9. The use of CLA in IVM and IVC, for all concentrations tested, promoted a lower secretion of PGF 2α ($P < 0.0001$) and PGE 2 ($P = 0.0034$), although it did not affect the PGE 2 /PGF 2α ratio ($P = 0.1902$). When CLA was used only in IVC, for all concentrations tested, it promoted a lower secretion of PGF 2α ($P = 0.0005$) and PGE 2 ($P = 0.0046$), although it did not affect the PGE 2 /PGF 2α ratio ($P = 0.9087$). As for the production of blastocysts on D7, the CLA used in IVM and IVC at all tested doses did not increase the blastocyst production rate on D7 and when CLA was used only in IVC, the concentration of 150 μ M of CLA decreased the rate of blastocysts on D9 compared to 50 μ M concentration. It is concluded that supplementation with CLA, at all doses tested, during IVM and IVC or exclusively in IVC decreases the secretion of PGE 2 and PGF 2α in the embryos, although it did not alter the PGE 2 /PGF 2α ratio. The use of CLA in IVC at a concentration of 150 μ M decreases the rate of hatched blastocysts on D9 compared to a concentration of 50 μ M.

Keywords: Fatty Acids. Omega-6 fatty acids. Oocyte. Embryo. Prostaglandins.

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). A célula endometrial secreta pulsos de alta amplitude de $PGF2\alpha$ que ao chegar na célula esteroideogênica luteal, determina a luteólise funcional e estrutural do corpo lúteo. A luteólise funcional é caracterizada 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 $PGF2\alpha$, que se mantém em níveis basais. O IFNT ainda estimula a secreção de $PGE2$, esta que ao chegar na célula luteal, impede qualquer ação da $PGF2\alpha$, além de promover aumento na vascularização do corpo lúteo e aumento a síntese de progesterona além de desfavorecer os mecanismos apoptóticos no corpo lúteo..... 29
- Figura 2 - Desenho esquemático representando a síntese de prostaglandinas na célula endometrial. 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 PTGES1, 2 ou 3 em $PGE2$. A $PGH2$ é convertida pelas enzimas AKR1B1, AKR1C3 e/ou AKR1C4 em $PGF2\alpha$. Ainda existe a possibilidade de a $PGE2$ ser convertida em $PGF2\alpha$ pela ação da enzima CBR1..... 31
- Figura 3 - Representação esquemática ilustrando a síntese de prostaglandinas no embrião e conceito. Acredita-se que o ácido linoleico conjugado pode alterar a síntese de prostaglandina das seguintes formas: A) aumentando a disponibilidade de AA na membrana, que é a principal matéria prima para síntese de prostaglandinas e/ou B) alterando as enzimas que norteiam a síntese de $PGF2\alpha$ (AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4) e $PGE2$ (PTGES1, PTGES2 e PTGES3) e/ou C) e a alterando a enzima que converte a $PGE2$ em $PGF2\alpha$ (CBR1)..... 36
- Figura 4 - Delineamento do Experimento Piloto A. Oócitos foram selecionados para compor um dos dois grupos de tratamento: Meio MIV com 10% de SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (**Grupo SFB MIV e CIV**; n = 136); ou Meio MIV sem SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (**Grupo SFB CIV**; n = 135). O cultivo de oócitos e embriões foram realizados em placas de 4 poços (Nunc) contendo 500 μ L do meio correspondente a cada tratamento. Ao término da MIV (24 horas após) e da CIV (9 dias após) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. No D7 e D9 (D0= dia a fertilização) foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Foram utilizados de 11 a 22 oócitos em cada tratamento para cada repetição, e no total foram realizadas 8 repetições, assim o número experimental de oócitos apresentado por grupo refere-se ao número total de oócitos considerando todas as repetições..... 43
- Figura 5 - Delineamento do Experimento Piloto B. Oócitos foram selecionados para compor um dos dois grupos de tratamento: Meio MIV sem DMSO e sem SFB + Meio CIV sem DMSO e com 2,5% de SFB (**Grupo sem DMSO**; n = 135); ou Meio MIV com 0,15% DMSO sem SFB + Meio CIV com 0,15% DMSO e 2,5% de SFB (**Grupo com DMSO**; n = 135). O cultivo de oócitos e embriões foram realizados em placas de 4 poços (Nunc) contendo 500 μ L do meio correspondente a cada tratamento. Ao término da MIV (24 horas após) e da CIV (9 dias após) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. No D7 e D9 (D0= dia a fertilização) foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Foram utilizados de 11 a 22 oócitos em cada tratamento para cada repetição, e no total foram realizadas 8 repetições,

assim o número experimental de oócitos apresentado por grupo refere-se ao número total de oócitos considerando todas as repetições.....	45
<p>Figura 6 - Delineamento do Experimento 1. Oócitos foram selecionados para compor quatro grupos de tratamento: Meio MIV sem CLA com 0,15% de DMSO + Meio CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (Grupo CLA 0 μM; n = 136); Meio MIV contendo 50 μM de CLA + Meio CIV contendo 50 μM de CLA (Grupo CLA 50 μM; n = 135); Meio MIV contendo 100 μM de CLA + Meio CIV contendo 100 μM de CLA (Grupo CLA 100 μM; n = 135) e Meio MIV contendo 150 μM de CLA + Meio CIV contendo 150 μM de CLA (Grupo CLA 150 μM; n = 135). O cultivo de oócitos e embriões foram realizados em placas de 4 poços (Nunc) contendo 500 μL do meio correspondente a cada tratamento. Ao término da MIV (24 horas após) e da CIV (9 dias após) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. No D7 e D9 (D0= dia a fertilização) foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Foram utilizados de 11 a 22 oócitos em cada tratamento para cada repetição, e no total foram realizadas 8 repetições, assim o número experimental de oócitos apresentado por grupo refere-se ao número total de oócitos considerando todas as repetições.....</p>	47
<p>Figura 7 - Delineamento do Experimento 2. Oócitos foram selecionados para compor quatro grupos de tratamento: Meio MIV sem CLA e sem DMSO + Meio CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (Grupo CLA 0 μM; n = 131); Meio MIV sem CLA e sem DMSO + Meio CIV contendo 50 μM de CLA (Grupo CLA 50 μM; n = 131); Meio MIV sem CLA e sem DMSO + Meio CIV contendo 100 μM de CLA (Grupo CLA 100 μM; n = 132) e Meio MIV sem CLA e sem DMSO + Meio CIV contendo 150 μM de CLA (Grupo CLA 150 μM; n = 130). O cultivo de oócitos e embriões foram realizados em placas de 4 poços (Nunc) contendo 500 μL do meio correspondente a cada tratamento. Ao término da MIV (24 horas após) e da CIV (9 dias após) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. No D7 e D9 (D0= dia a fertilização) foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Foram utilizados de 12 a 28 oócitos em cada tratamento para cada repetição, e no total foram realizadas 8 repetições, assim o n experimental apresentado por grupo refere-se ao número total de oócitos considerando todas as repetições.....</p>	49
<p>Figura 8 - Experimento Piloto A - Concentração de PGF2α e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2α, PGE2 e a razão PGE2/PGF2α em ng/mL; mensurada por ELISA, em meio de cultivo de oócitos bovinos cultivados por 24 horas em meio MIV sem SFB (SFB CIV; n=135) ou em meio MIV suplementado com 10% e SFB (Grupo SFB MIV e CIV; n=136).....</p>	53
<p>Figura 9 - Experimento Piloto A - Concentração de PGF2α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2α, PGE2 e a razão PGE2/PGF2α em ng/mL; mensurada por ELISA em embriões com 9 dias de cultivo, produzidos com e Meio MIV com 10% de SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (Grupo SFB MIV e CIV) ou Meio MIV sem SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (Grupo SFB CIV).....</p>	55
<p>Figura 10 - Experimento Piloto A - Experimento Piloto A - Produção de blastocisto no D7. Média + erro padrão da taxa de blastocisto sete dias após a fertilização (D7) com e Meio MIV com 10% de SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (Grupo SFB MIV e CIV) ou Meio MIV sem SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (Grupo SFB CIV)</p>	56
<p>Figura 11 - Experimento Piloto B - Concentração de PGF2α e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2α, PGE2 e a razão PGE2/PGF2α em ng/mL; mensurada por ELISA, em meio de cultivo de oócitos bovinos</p>	

cultivados por 24 horas em meio MIV sem DMSO (Grupo sem DMSO ; n=135) ou com 0,15% de DMSO (Grupo SFB com DMSO ; n=135).....	57
Figura 12 - Experimento Piloto B - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA em embriões com 9 dias de cultivo, produzidos em Meio MIV sem DMSO e sem SFB + Meio CIV sem DMSO e com 2,5% de SFB (Grupo sem DMSO); ou Meio MIV com 0,15% DMSO sem SFB + Meio CIV com 0,15% DMSO e 2,5% de SFB (Grupo com DMSO)	59
Figura 13 - Experimento Piloto B - Produção de blastocisto no D7. Média \pm erro padrão da taxa de blastocisto sete dias após a fertilização (D7) produzidos em Meio MIV sem DMSO e sem SFB + Meio CIV sem DMSO e com 2,5% de SFB (Grupo sem DMSO); ou Meio MIV com 0,15% DMSO sem SFB + Meio CIV com 0,15% DMSO e 2,5% de SFB (Grupo com DMSO).....	60
Figura 14 - Experimento 1 - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA no meio de oócitos cultivados por 24 horas em meio MIV sem CLA com 0,15% de DMSO (Grupo CLA 0 μM ; n = 136); Meio MIV contendo 50 μ M de CLA (Grupo CLA 50 μM ; n = 135); Meio MIV contendo 100 μ M de CLA (Grupo CLA 100 μM ; n = 135) e Meio MIV contendo 150 μ M de CLA (Grupo CLA 150 μM ; n = 135).....	61
Figura 15 - Experimento 1 - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA no meio de embriões 9 dias após a fertilização (D9; término da CIV) provenientes de meio MIV sem CLA com 0,15% de DMSO + Meio CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (Grupo CLA 0 μM); Meio MIV contendo 50 μ M de CLA + Meio CIV contendo 50 μ M de CLA (Grupo CLA 50 μM); Meio MIV contendo 100 μ M de CLA + Meio CIV contendo 100 μ M de CLA (Grupo CLA 100 μM) e Meio MIV contendo 150 μ M de CLA + Meio CIV contendo 150 μ M de CLA (Grupo CLA 150 μM).....	63
Figura 16 - Experimento 1 - Produção de blastocisto no D7. Média \pm erro padrão da taxa de blastocisto 7 dias após a fertilização (D7) provenientes de meio MIV sem CLA com 0,15% de DMSO + Meio CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (Grupo CLA 0 μM); Meio MIV contendo 50 μ M de CLA + Meio CIV contendo 50 μ M de CLA (Grupo CLA 50 μM); Meio MIV contendo 100 μ M de CLA + Meio CIV contendo 100 μ M de CLA (Grupo CLA 100 μM) e Meio MIV contendo 150 μ M de CLA + Meio CIV contendo 150 μ M de CLA (Grupo CLA 150 μM).....	64
Figura 17 - Experimento 2 - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA no meio de oócitos cultivados por 24 horas sem CLA mas que posteriormente foram tratados na CIV com as referidas concentrações (0, 50, 100 e 150 μM).....	65
Figura 18 - Experimento 2 - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA no meio de embriões 9 dias após a fertilização (D9; término da CIV) provenientes de Meio MIV sem CLA + Meio CIV sem CLA (Grupo CLA 0 μM); Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 50 μ M de CLA (Grupo CLA	

50 µM); Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 100 µM de CLA (**Grupo CLA 100 µM**) e Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 150 µM de CLA (**Grupo CLA 150 µM**)..... 67

Figura 19 - Experimento 2 - Produção de blastocisto no D7 e D9. Média \pm erro padrão da taxa de blastocisto no D7 e taxa de blastocisto eclodido no D9 (D0 = dia da fertilização) provenientes de Meio MIV sem CLA + Meio CIV sem CLA (**Grupo CLA 0 µM**); Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 50 µM de CLA (**Grupo CLA 50 µM**); Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 100 µM de CLA (**Grupo CLA 100 µM**) e Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 150 µM de CLA (**Grupo CLA 150 µM**)..... 68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
μL	Microlitro
AA	Ácido araquidônico
AGs	Ácidos graxos
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AL	Ácido linoleico
AKR1B1	Enzima PGF sintase B1
AKR1C3	Enzima PGF sintase C3
AKR1C4	Enzima PGF sintase C4
Ca	Cálcio
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo Lúteo
CLA	Ácido linoleico conjugado
COX-2	Ciclooxigenase-2
DHA	Ácido docosahexanóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPA	Ácido eicosapentanóico
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FU	Fluído uterino
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
IFNT	Interferon-tau
IFNR	Receptores de interferon-tau
ISGF3	Fator Gênico 3 Estimulado por Interferon
LA	Ácido linoleico
LH	Hormônio luteinizante
MII	Meiose II

MIV	Maturação <i>in vitro</i>
AO	Ácido oleico
ONU	Organização das Nações Unidas
OT	Ocitocina
P4	Progesterona
PIVE	Produção de embriões <i>in vitro</i>
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2α	Prostaglandina F ₂ alfa
PGH2	Prostaglandina H2
PGIs	Enzimas PGIs sintases
PGI2	Prostaglandina I ₂
PGs	Prostaglandinas
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA2	Fosfolipase A ₂
PTGDS	Enzima PGD sintase
PGD2	Prostaglandina D2
PTGES	Enzimas PGEs sintases
PTGE1	Enzima PGE sintase 1
PTGE2	Enzima PGE sintase 2
PTGE3	Enzima PGE sintase 3
PTGER	Receptor de prostaglandina E
PTGFR	Receptor de prostaglandina F
PTGIs	Enzimas PGIs sintases
PTGS1	Prostaglandina-endoperóxido sintase 1
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintase 2
RMF	Reconhecimento materno-fetal
SFB	Soro fetal bovino
SLCO2A1	Proteína transportadora de membrana
TETF	Transferência de embriões em tempo fixo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 Mortalidade Embrionária Precoce em Fêmeas Bovinas	24
2.2 Mecanismos Fisiológicos Envolvidos no Reconhecimento Materno-Fetal	26
2.3 Biossíntese e Secreção de Prostaglandinas	30
2.4 Uso de Ácidos Graxos Específicos Como Moduladores da Síntese de Prostaglandinas	31
2.5 Metabolismo Lipídico na Célula	34
2.6 Síntese de Prostaglandina no Embrião	36
2.7 Uso de Ácidos Graxos Específicos Como Promotores da Melhor Qualidade Embrionária	37
3 HIPÓTESE	40
4 OBJETIVOS	40
5 MATERIAL E MÉTODO	40
5.1 Local do Experimento	40
5.2 Recuperação dos Complexos <i>Cumulus</i> -oócito e Seleção	41
5.3 Delineamento Experimental	41
5.3.1 Experimento Piloto A	42
5.3.2 Experimento Piloto B	43
5.3.3 Experimento 1: Efeito de Diferentes Concentrações de CLA na MIV e CIV	45
5.3.4 Experimento 2: Efeito de Diferentes Concentrações de CLA na CIV	47

5.4	Maturação <i>In Vitro</i> dos Oócitos (MIV)	49
5.5	Fertilização <i>In Vitro</i> (FIV)	50
5.6	Cultivo <i>In Vitro</i> dos Embriões (CIV)	50
5.7	Quantificação de PGF2 α e PGE2 por Ensaio Imunoenzimático	51
5.8	Análise Estatística	51
6	RESULTADOS	52
6.1	Experimento Piloto A	52
6.2	Experimento Piloto B	56
6.3	Experimento 1	60
6.4	Experimento 2	64
7	DISCUSSÃO	69
8	CONCLUSÃO	74
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por alimentos cresce de forma proporcional ao aumento da população (FEDOROFF, 2010). 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 dezessete 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.

Atualmente, o Brasil tem o maior rebanho bovino comercial do mundo, mas ainda não supera os Estados Unidos no volume de produção de carne. Em 2020, a taxa de desfrute (número de animais abatidos dividido pelo número total de animais x 100) no Brasil foi de 20% com o abate de carcaças com um peso médio de 15 arrobas. Em comparação, os norte-americanos desfrutaram de 30% do seu rebanho abatendo carcaças com 24 arrobas (ANUALPEC, 2021). Assim, o rebanho nacional apresenta uma produção de carne/animal abatido aquém da necessária. 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. Em 2020, o rebanho nacional era composto por 80.632.741 matrizes, destas 65.548.639 eram vacas e 15.084.102 novilhas com mais de 24 meses. Em 2020, estimou-se uma produção nacional de 47.984.262 bezerros (ANUALPEC, 2021), caracterizando uma média nacional de 0,6 bezerro/vaca/ano e um intervalo entre partos de aproximadamente 18 meses, fatores que associados caracterizam uma baixa eficiência reprodutiva.

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. Além disso, 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 biotécnicas aplicadas à reprodução animal, como por exemplo, a inseminação artificial (IA). 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. No Brasil, estima-se que 20% das fêmeas bovinas tenham sido inseminadas em 2021, sendo aproximadamente 80% do total de inseminações realizadas por IATF. Do total de inseminações realizadas no rebanho nacional, estima-se que 65% foram procedidas em matrizes de corte e 35% em fêmeas destinadas à produção de leite (ASBIA, 2021). Em 2020, estimou-se a venda de 25 milhões de protocolos hormonais de IATF, o que demonstra um emprego crescente e extremamente significativo da referida biotecnologia no território nacional (ASBIA, 2021). 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 biotécnicas poderosas na rápida multiplicação de matrizes expoentes geneticamente superiores. De acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (VIANA, 2019), 68,7% dos embriões do mundo são produzidos por PIVE e destes 73,2% são transferidos a fresco, sem prévio congelamento, por TETF. No Brasil, a produção anual de embriões bovinos teve um aumento de 800% ao longo da última década. Atualmente, o Brasil consagrou-se como líder mundial da PIVE na espécie bovina, responsável por 70% do total de embriões gerados no mundo. Entretanto, a metodologia da PIVE ainda apresenta limitações, visto que somente 40 a 50% dos oócitos maturados e fertilizados *in vitro* atingem o estágio de blastocisto (RIZOS *et al.*, 2002).

Após a TETF nas receptoras, as taxas de concepção dificilmente superam 50%. Um dos principais fatores que comprometem o êxito da prenhez em fêmeas bovinas de corte é a mortalidade embrionária precoce, 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 conceito (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 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 concepto, foi caracterizado como o principal fator envolvido no RMF na espécie bovina (ROBINSON *et al.*, 2006; EALY; YANG, 2009). Quando o concepto produz de maneira competente o IFNT, o endométrio apresenta a síntese de PGF2 α suprimida enquanto registra-se um aumento na síntese de prostaglandina E2 (PGE2). Na ocorrência de um RMF bem-sucedido, a síntese de PGE2 é aumentada no endométrio e nas células trofoblásticas do embrião e concepto. A PGE2 exerce efeitos anti-luteolíticos e luteotróficos, ambos fundamentais para o êxito da prenhez (McCRACKEN *et al.*, 1999).

O IFNT e a PGE2, ambos de ação luteotrófica, garantem a permanência do CL e manutenção de altas concentrações circulantes de P4, condição fundamental para o estabelecimento da prenhez (TANIKAWA *et al.*, 2005). Na incapacidade do concepto em promover tais ações coordenadas, será determinada a luteólise e a mortalidade embrionária precoce. Assim, estratégias capazes de reduzir a capacidade da síntese de PGF2 α e aumentar a síntese de PGE2 pelo endométrio, embrião e/ou concepto se tornam de grande interesse econômico.

O consumo de dietas com ácido linoleico (AL) sabidamente afeta a via metabólica do ácido graxo poliinsaturado n-6 por meio da biossíntese de eicosanóides, inclusive as prostaglandinas. Conforme descrito por Moussavi *et al.* (2013), em bovinos diferentes isômeros de CLA determinam alterações na produção de PGF2 α e PGE2. O CLA apresenta potencial promissor para modular a síntese das prostaglandinas F2 α e E2.

É reconhecido que o uso de diferentes ácidos graxos pode alterar a proporção de PGF2 α e PGE2 produzidas nas células trofoblásticas em embriões e conceptos (HWANG *et al.*, 1998). Portanto, considerando o impacto das perdas econômicas ocasionadas pela mortalidade embrionária precoce, a suplementação estratégica, com lipídios específicos no meio de cultivo de oócitos e embriões durante a PIVE, objetiva favorecer no embrião e futuro concepto a diminuição da síntese de PGF2 α e o aumento da síntese de PGE2, assim como o aumento da razão PGE2/ PGF2 α . Para o estudo da ação dos ácidos graxos específicos na secreção de PGF2 α e PGE2 inclusive o CLA, 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 CLA em modelos *in vivo* e *in vitro*, o mecanismo de ação dos CLAs é pouco conhecido. A hipótese do referido

estudo é que a suplementação com CLA durante a maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV) estimula no oócito (após 24 horas de cultivo) e no embrião (após 9 dias de cultivo) uma menor síntese de PGF2 α , maior síntese de PGE2, maior razão PGE2/PGF2 α e maior taxa de blastocistos no D7 e D9, sendo tal efeito dose dependente. Objetivou-se no Experimento 1 determinar os efeitos de diferentes concentrações de CLA (0, 50, 100 e 150 μ M), onde a mesma concentração foi utilizada durante a MIV e CIV, durante a maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV), nas concentrações de PGF2 α , PGE2 e na razão PGE2/PGF2 α no meio de cultivo de oócitos ao término da MIV (após 24 horas de cultivo) e no meio de cultivo de embriões ao término da CIV (após 9 dias de cultivo), assim como a taxa de produção de blastocisto no D7 e D9 (D0 = dia da fertilização). Objetivou-se no Experimento 2 comparar as diferentes concentrações de CLA (0, 50, 100 e 150 μ M) durante a CIV, nas concentrações de PGF2 α , PGE2 e na razão PGE2/PGF2 α no meio de cultivo de oócitos ao término da MIV (após 24 horas de cultivo) e no meio de cultivo de embriões ao término da CIV (após 9 dias de cultivo), assim como a taxa de produção de blastocisto no D7 e D9 (D0 = dia da fertilização).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mortalidade Embrionária Precoce em Fêmeas Bovinas

A limitada eficiência reprodutiva motivou um grande volume de pesquisas nas últimas décadas, que almejam 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 à inseminação caracterizam falhas no estabelecimento da prenhez. Um dos principais fatores que comprometem a performance reprodutiva de fêmeas bovinas, dificultando a obtenção de taxas de concepção acima de 50% com o uso da IATF e TETF, refere-se à incompetência do concepto (embrião e membranas anexas) em promover o estabelecimento da prenhez, condição que determina a mortalidade embrionária precoce. Tal fato provavelmente decorra da grande complexidade dos eventos fisiológicos

caracterizados nesse período. Em rebanhos bovinos, a mortalidade embrionária 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 *et al.*, 2002; 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 mortalidade embrionária que ocorre nas três primeiras semanas de prenhez.

Estudos realizados na década de 70 permitiram a observação de que em bovinos os principais desafios biológicos para o estabelecimento da prenhez ocorrem no período especialmente compreendido entre os dias 15 e 19 após a fecundação, posteriormente designado de “período crítico” (BINELLI *et al.*, 2001). Em fêmeas bovinas durante tal período, o conceito deve produzir competentemente moléculas que interagem com o endométrio materno inibindo a síntese de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) e a luteólise, condição determinante para o reconhecimento materno-fetal e o estabelecimento da prenhez.

O IFNT sintetizado e secretado pelas células trofoblásticas do conceito, foi caracterizado como o principal fator envolvido no reconhecimento materno-fetal na espécie bovina (ROBINSON *et al.*, 2006; EALY; YANG, 2009). Para o sucesso em tal reconhecimento torna-se imprescindível uma competente produção de IFNT pelo conceito, que determinará de maneira eficiente a inibição da síntese de PGF₂ α pelas células endometriais, permanência do CL e manutenção de altas concentrações plasmáticas de P4.

O emprego da IATF e TETF, além de suas comprovadas vantagens, possibilita agrupar um grande número de fêmeas em um mesmo momento cronológico de prenhez, 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

reconhecimento materno-fetal durante o período crítico. Tais estratégias, que se tornam de grande interesse econômico, objetivam reduzir a capacidade de síntese de PGF2 α pelo endométrio materno e/ou maximizar o estímulo anti-luteolítico induzido pelo concepto.

2.2 Mecanismos Fisiológicos Envolvidos no Reconhecimento Materno-Fetal

O estabelecimento e a manutenção da prenhez requerem uma comunicação endócrina e parácrina recíproca entre os ovários, endométrio e concepto. Em fêmeas bovinas, entre 14 a 16 dias de desenvolvimento, modificações morfológicas nas células trofoblásticas aliadas ao aumento de proliferação das mesmas, transformam o concepto esférico em uma estrutura alongada de forma filamentosa que ocupa a maioria da extensão do corno uterino ipsilateral a ovulação (ASHWORTH; BAZER, 1989; GUILLOMOT, 1995; ROBINSON *et al.*, 2006). A rápida expansão das células trofoblásticas favorecem o aumento da área de superfície de contato de tais células com o epitélio uterino. Considera-se que quanto maior o alongamento e comprimento do concepto, maior a expansão das células trofoblásticas e conseqüentemente maior a biossíntese e secreção de IFNT. A produção de IFNT aumenta dramaticamente de 14 a 15 dias de prenhez coincidindo com a rápida alongação do concepto (EALY *et al.*, 2001; ROBINSON *et al.*, 2006), expressão que diminui abruptamente depois de 21 dias de prenhez (XAVIER *et al.*, 1997; ROBINSON *et al.*, 2006).

Durante o alongamento, o concepto 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 concepto (THATCHER *et al.*, 2001; INSKIP; DAILEY, 2005). Assume-se que quanto mais enriquecido o histotrofo, maiores são as possibilidades de alongamento e produção de IFNT pelo concepto.

O IFNT secretado pelas células trofoblásticas exerce por mecanismos parácrinos, a função de prevenção da secreção pulsátil de PGF2 α (SPENCER *et al.*,

2004b; SPENCER *et al.*, 2007). As ações do IFNT no RMF 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 Gênico 3 Estimulado por Interferon (ISGF3), que é transportado ao núcleo da célula onde inibe a transcrição gênica do ER e conseqüentemente a formação dos OXTRs. A ausência de OXTRs impede que a ocitocina (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 RMF. O IFNT, nas células do estroma e do epitélio endometrial ainda aumenta a síntese de PGE2 , onde atua desfavorecendo a via que forma $\text{PGF2}\alpha$ e favorecendo a via de síntese da PGE2 . O IFNT também age aumentando os receptores de PGE2 nas células endometriais.

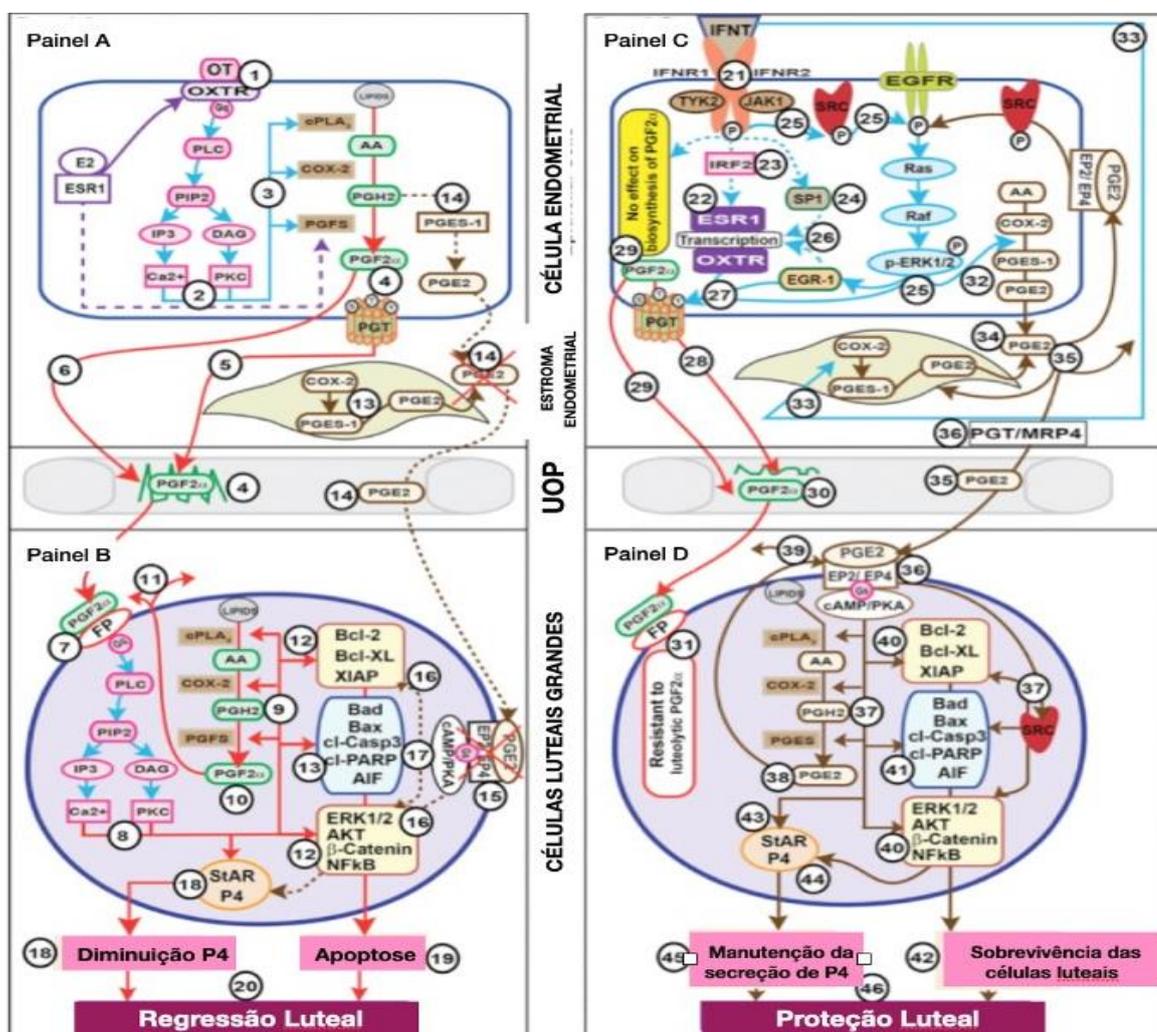
Segundo Arosh *et al.* (2016) e Pate (2020), na ação endócrina, conforme ilustrado na Figura 1, o IFNT produzido pelo concepto no lúmen uterino é transportado para a veia uterina, onde pode seguir dois caminhos: A) o IFNT vai para a circulação sistêmica onde estimula nas células imunes a expressão dos genes específicos (genes específicos estimulados pelo IFNT); 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 de ações no CL. No CL o IFNT exerce várias funções, tais como: A) aumenta a proliferação celular; B) estimula a expressão de genes que promovem o aumento da secreção de P4 no CL; C) promove a sobrevivência das células endoteliais mantendo a perfusão sanguínea do CL e D) aumenta o RNAm para as proteínas que medeiam a angiogênese. Assim, o 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 e C) diminui o RNAm das proteínas que medeiam a apoptose protegendo o CL da morte celular e D) aumenta a proliferação celular no CL e diminui a abundância de RNAm nas células endoteliais de forma a prevenir a luteólise.

Assim, o IFNT desfavorece no CL a luteólise estrutural. O IFNT aumenta a

proliferação celular no CL e diminui a abundância de RNAm nas células endoteliais de forma a prevenir a luteólise. Sabe-se que existe um influxo de neutrófilos no CL durante o RMF, 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 PGE2 e a prostaglandina I2 (PGI2) que atuam de forma parácrina no endométrio, regulando a expressão de genes e funções importantes para a receptividade uterina, crescimento e desenvolvimento do conceito durante a fase inicial da prenhez. Sabe-se também que as PGE2 e PGI2 desempenham ações luteotróficas importantes no CL, favorecendo a secreção de P4. O IFNT favorece a síntese de PGE2 endometrial (quando não prioriza a síntese de PGF2 α e prioriza PGE2), que esta irá exercer um conjunto de ações luteotróficas (favorecimento da manutenção e atividade do CL). Os mecanismos de ação da PGE2 decorrem de: A) diminui a sensibilidade do CL à ação da PGF2 α ; B) estimula o aumento da produção de P4 nas células luteais e C) aumenta no tecido luteal as concentrações de AMPc e a ativação da PKA, que estimularia a síntese de P4.

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

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). 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 falência na produção de progesterona e a estrutural pelo desencadeamento dos mecanismos apoptóticos na célula luteal. Na presença do concepto secretando IFNT de maneira competente, ocorre a inibição da secreção de alta amplitude de $\text{PGF2}\alpha$, que se mantem em níveis basais. O IFNT ainda estimula a secreção de PGE2 , esta que ao chegar na célula luteal, impede qualquer ação da $\text{PGF2}\alpha$, além de promover aumento na vascularização do corpo lúteo e aumento a síntese de progesterona além de desfavorecer os mecanismos apoptóticos no corpo lúteo



Fonte: Arosh (2016).

2.3 Biossíntese e Secreção de Prostaglandinas

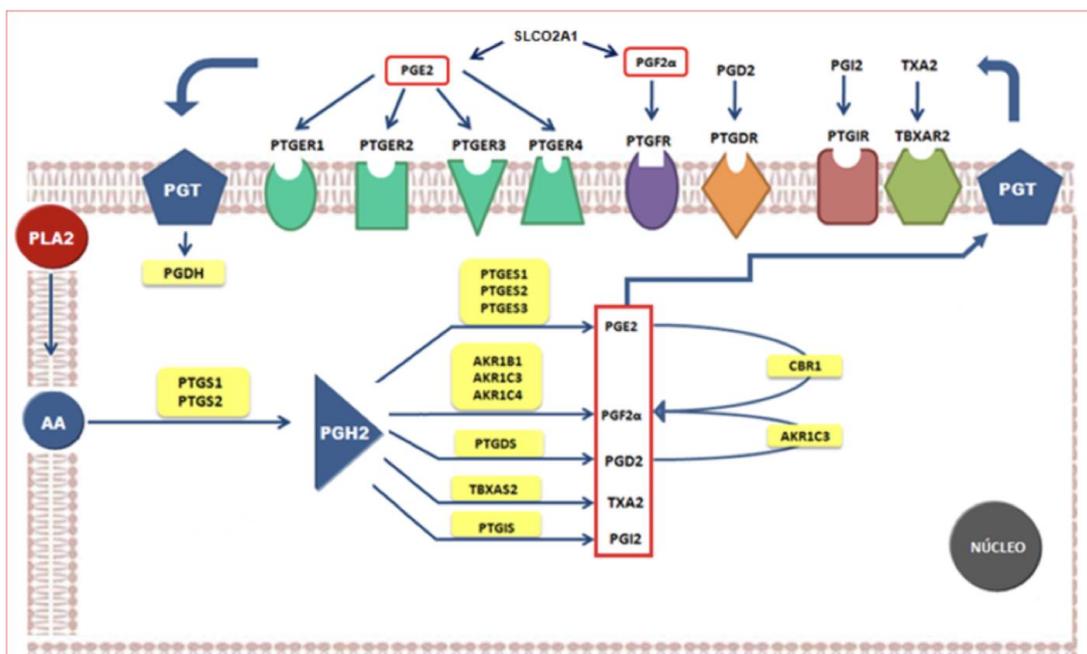
Os eicosanóides são metabólitos oxigenados dos ácidos graxos essenciais compostos por prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, tromboxanos e derivados dos ácidos graxos hidroxilados. Grande parte dos eicosanóides relevantes derivam do AA através de diferentes vias de síntese. Em um modelo ilustrado por Oliveira (2013), 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 α , 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 α pela ação da enzima AKR1C3, assim como a PGE2 que pode ser convertida à PGF2 α 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 α ao PTGFR; a PGD2 ao PTGDR; a PGI2 ao PTGIR e o tromboxano A2 ao TBXAR2. A PGE2 e PGF2 α 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 α 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).

O embrião pré-implantação produz muitas prostaglandinas incluindo PGF2 α , PGE2 e PGI2. Hwang *et al.* (1998) 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 α entre os dias 13 e 15 e adicionalmente PGI2 após o dia 15 de desenvolvimento.

Diante desse contexto, a síntese de PGF2 α e PGE2 no tecido endometrial e células endometriais foi exaustivamente perseguida e compreendida. Entretanto, a síntese de PGF2 α e PGE2 em embriões e conceptos foi pobremente estudada e compreendida. É reconhecido que o uso de diferentes ácidos graxos pode alterar a

proporção de $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 produzidas nas células trofoblásticas, embriões e conceptos.

Figura 2 - Desenho esquemático representando a síntese de prostaglandinas na célula endometrial. A síntese de $\text{PGF2}\alpha$ 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 PTGES1, 2 ou 3 em PGE2 . A PGH2 é convertida pelas enzimas AKR1B1, AKR1C3 e/ou AKR1C4 em $\text{PGF2}\alpha$. Ainda existe a possibilidade de a PGE2 ser convertida em $\text{PGF2}\alpha$ pela ação da enzima CBR1



Fonte: Adaptado por Oliveira (2013).

2.4 Uso de Ácidos Graxos Específicos como Moduladores da Síntese de Prostaglandinas

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) representantes da família ômega 6, especialmente o ácido linoleico (AL) e os isômeros de CLA *cis*-9, *trans*-11 (*c9*, *t11*) e *trans*-10, *cis*-12 (*t10*, *c12*), reconhecidamente determinam modificações na biossíntese de eicosanóides incluindo as PGs. O AL pode ser convertido em ácido araquidônico, estimulando a biossíntese PGs ou, alternativamente, pode sofrer mais

dessaturação tornando-se um precursor dos ácidos graxos ômega 3 (WATHES *et al.*, 2007). Células endometriais bovinas (células BEND) não tiveram a síntese de PG estimulada pelo AL (MATTOS *et al.*, 2003), mas animais alimentados com uma dieta rica em AL tiveram um aumento na biossíntese e liberação de PG induzida por ocitocina (CHENG *et al.*, 2001). Em contraste, Robinson *et al.* (2002) descobriram que dietas à base de ácido linoleico aumentou a liberação de PGF2 α induzida por ocitocina, mas apenas no dia 17 do ciclo estral. Em contrapartida, a infusão abomasal de AL reduziu a liberação de PGFM, principal metabólito da PGF2 α , em resposta à administração de ocitocina no dia 15 do ciclo estral (OLDICK *et al.*, 1997). De acordo com Moussavi *et al.* (2013), em meio de cultura de células epiteliais endometriais bovinas expostas a quantidades > 50 μ M de CLAs por 24 horas, as concentrações de PGE2 e PGF2 α diminuíram significativamente. Ainda nesse estudo, o CLA *t10, c12* promoveu diminuição na produção de PG de forma mais acentuada do que o CLA *c9, t11*. Porém, segundo Cheng *et al.* (2003), em células endometriais de ovelhas, com ou sem ocitocina ou lipopolissacarídeo, o CLA de forma dose-dependente suprimiu a geração de PGF2 α , enquanto baixas doses de CLA 20 μ M aumentaram a geração de PGE2.

Meier *et al.* (2009) avaliaram os efeitos do ácido eicosapentanóico (EPA; 20:5 ω 3), ácido docosahexanóico (DHA; 22:6 ω 3) e ácido linoleico (AL; 18:2 ω 6) na liberação de PGF2 α e PGE2 endometrial e do tecido trofoblástico durante uma breve cultura. Nesse estudo, as células trofoblásticas foram obtidas de vacas pré-sincronizadas, inseminadas ou não, após 16 a 17 dias. A cavidade uterina foi lavada com 20 mL de solução salina e os conceptos foram recuperados. O disco embrionário foi identificado e removido do tecido trofoblástico. Foram realizados separadamente o cultivo do tecido endometrial e do tecido trofoblástico. O tecido trofoblástico foi incubado com EPA, DHA ou AL a uma concentração final de 10 μ M idêntica para todos os ácidos. Após a cultura de 5 horas a 37°C, o meio de cultivo foi isolado para a mensuração de PGF2 α e PGE2 por radioimunoensaio. Os ácidos graxos utilizados individualmente (DHA, EPA ou AL) não alteraram a síntese de PGF2 α e PGE2 no endométrio de fêmeas prenhes e não prenhes no D16 e D17 e também em células trofoblásticas. No geral, tais tratamentos não tiveram efeito na liberação de PGE2 nos tecidos trofoblásticos, embora houvesse uma tendência (P = 0,17) dos ácidos graxos ômega 3 (EPA e DHA) reduzirem a liberação de PGE2. Os

autores alegam que utilizaram um período curto de tratamento (5 horas) e uma dose relativamente baixa (10 μ M) dos diferentes ácidos graxos. Em estudo realizado por Mattos *et al.* (2003), a inibição da síntese de PGF2 α em células BEND por EPA foi dependente de dose, onde a dose de 10 a 20 μ M inibiu a liberação de PGF2 α quando incubadas por 24 horas. Os efeitos dos AGPI na liberação de PG endometriais foram amplamente pesquisados nos últimos 20 a 30 anos, porém pouco se sabe sobre como a síntese de PG embrionárias é afetada por tais ácidos graxos. O AL pode ser convertido em ácido araquidônico, portanto estimula a biossíntese de PGF2 α ou, alternativamente, sofre mais dessaturação tornando-se um precursor dos ácidos graxos ômega 3 (WATHES *et al.*, 2007). Células endometriais bovinas (células BEND) não responderam ao AL (MATTOS *et al.*, 2003). O mecanismo específico que afeta a razão PGE2/ PGF2 α precisa ser compreendido. Menos claro é o efeito dos AGPI na biossíntese de PG produzidas pelo embrião ou concepto.

Algumas estratégias utilizando os AGPI da família ômega 6, vem sendo investigadas por esse grupo. 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 *et al.*, 1992; THOMAS; WILLIAMS, 1995; 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 PGF2 α durante o início da prenhez reduziu o desenvolvimento dos embriões pré-implantação (SCENNA *et al.*, 2004) e reduziu a sobrevivência embrionária (HWANG *et al.*, 1988). A PGE2 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 PGE2 durante período pré-implantação pode ser prejudicial à sobrevivência embrionária. A PGI2 é um potente vasodilatador durante a prenhez (MAGNESS *et al.*, 1981) e parece desempenhar um papel na implantação embrionária inicial. No camundongo, a PGI2 aumenta o desenvolvimento embrionário e a eclosão do embrião (LIU *et al.*, 2006), indicando que a PGE2 e PGI2 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 especificamente com a suplementação com ácido linoleico conjugado [CLA; *cis*-9, *trans*-11 (*c9*, *t11*) e *trans*-10, *cis*-12 (*t10*, *c12*)] em meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1). Verificou-se que células trofoblásticas tratadas com CLA (10, 20, 50 e 100 μ M) tiveram uma redução na síntese de PGF2 α com 24, 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle (0 μ M). Também, observou-se que a relação PGE2/PGF2 α foi maior em todos os grupos tratados com CLA com 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle; tendo havido modificações na abundância de transcritos envolvidos na biossíntese de PGF2 α e PGE2. Em complemento a este estudo, torna-se de nosso interesse, verificar o efeito do CLA na qualidade dos embriões produzidos *in vitro* e seus efeitos na síntese de PGE2 e PGF2 α , assim como na relação PGE2/ PGF2 α .

2.5 Metabolismo Lipídico na Célula

A energia é o principal nutriente requerido por vacas em reprodução, e o seu fornecimento inadequado na dieta tem efeitos deletérios sobre a eficiência

reprodutiva. Segundo Costa e Fontes (2010) o ambiente ruminal é responsável por algumas transformações nos lipídios da dieta, como a lipólise e a biohidrogenação, alterando com isso sua composição e perfil de ácidos graxos que chega ao duodeno. Os AGPI, principalmente os ácidos linoleico e linolênico, liberados pela quebra da ligação éster são hidrogenados pelas bactérias, produzindo primeiro o ácido monoenoico e, finalmente, o ácido esteárico. Costa e Fontes (2010) concluíram que o rúmen é um obstáculo a ser transposto pelos AGPI para que possam ser digeridos e absorvidos no intestino delgado, devido isto, desenvolveu sais de cálcio para que a gordura seja protegida, permitindo a passagem dos lipídios pelo rúmen sem que sofressem biohidrogenação ou lipólise.

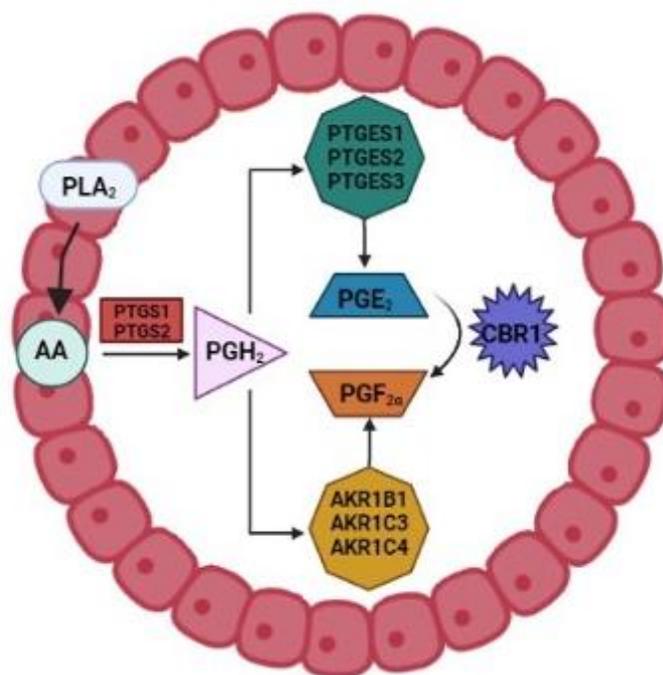
Segundo Atella *et al.* (2012), os ácidos graxos liberados durante a digestão são absorvidos pelas células do epitélio intestinal, enquanto uma das proteínas que pode ter papel importante na absorção desses lipídeos é a proteína transportadora de ácidos graxos (FATP). Dados obtidos em estudos por Kirfel e Komnick (1999), mostraram que as células intestinais absorvem preferencialmente ácido oleico (18:1), seguido pelo ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0).

Em estudos realizados por Lopes *et al.* (2009, 2011) através da suplementação de ácidos graxos da família ômega 6 no desempenho reprodutivo de vacas de corte, encontraram em tecidos, principalmente ácido linoleico e vestígios de ácido linolênico. A suplementação de ácidos graxos aumentou a incorporação de ácido linoleico e seus derivados ômega-6 no plasma, endométrio, corpo lúteo e concepto, enquanto as mesmas respostas não foram observadas para o ácido linolênico e seus derivados ômega-3. Esses resultados indicaram que a suplementação com ácidos graxos aumentou a ingestão e absorção intestinal de ácido linoleico por vacas de corte, que por sua vez foi incorporado, alongado, dessaturado e acumulado por seus tecidos reprodutivos, resultando em maior passagem de ácidos graxos ômega-6 para o concepto. Esses esforços de pesquisa, no entanto, não avaliaram como ocorre a incorporação desses ácidos graxos nos tecidos reprodutivos. Em pesquisas por White *et al.* (2012), obteve-se que a suplementação de ácidos graxos altera o perfil do mesmo nos tecidos reprodutivos de vacas, incluindo o corpo lúteo e o endométrio, além de modular os hormônios associados ao estabelecimento do início da gestação, como as prostaglandinas.

2.6 Síntese de Prostaglandina no Embrião

O embrião é capaz de secretar PGs, que desenvolvem um papel importante no seu desenvolvimento embrionários inicial (LEWIS, 1989). Segundo Giller, *et al.* (2018), após a ação da PTGS2, enzima chave da síntese de PG, ocorre a liberação do AA da membrana celular para o citosol, que é convertido em PGH₂, precursor comum para PGF₂α, PGE₂, PGD₂, PGI₂ e TXA₂ (Figura 3). Como tanto o endométrio quanto o embrião sintetizam PG, a concentração de PG luminal uterino é maior durante a prenhez do que durante o ciclo estral (LEWIS, 1983). De acordo com Hwang *et al.* (1998), após a avaliação do metabolismo do AA pelo embrião em diferentes fases da prenhez, mostrou que os embriões bovinos secretam de forma predominante PGF₂α antes do dia 12, e a PGE₂ e PGF₂α entre os dias 13 e 15 e a PGI₂ no dia 15 do desenvolvimento.

Figura 3 - Representação esquemática ilustrando a síntese de prostaglandinas no embrião e conceito. Acredita-se que o ácido linoleico conjugado pode alterar a síntese de prostaglandina das seguintes formas: A) aumentando a disponibilidade de AA na membrana, que é a principal matéria prima para síntese de prostaglandinas e/ou B) alterando as enzimas que norteiam a síntese de PGF₂α (AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4) e PGE₂ (PTGES1, PTGES2 e PTGES3) e/ou C) e a alterando a enzima que converte a PGE₂ em PGF₂α (CBR1)



Fonte: Lourenço (2022).

2.7 Uso de Ácidos Graxos Específicos como Promotores da Melhor Qualidade Embrionária

Na produção *in vitro* de embriões bovinos relatou-se que a suplementação do meio de cultivo com CLAs (t10, c12 e c9, t11) não melhorou a produção de embriões, mas a inclusão de 100 mM de c9, t11 antes da vitrificação melhorou a qualidade dos mesmos após o descongelamento (ABSALÓN-MEDINA *et al.*, 2014). Stinshoff *et al.*, (2014) observaram que a suplementação do meio de cultivo com 50 mM e 1 mM de c12, t10 não alterou a taxa de clivagem, mas reduziu a taxa de desenvolvimento em comparação com um grupo não suplementado. Nesse mesmo estudo observou-se que o gene SCD, que codifica a enzima estearoil-CoA dessaturase envolvida na biossíntese de ácidos graxos principalmente a síntese de ácido oleico foi menos expresso em embriões cultivados com 50 mM de c9, t11 quando comparado ao grupo não suplementado.

Também foi observado que a quantidade relativa de vários transcritos aumentou em embriões cultivados com 14 mM DMSO em comparação com aqueles que desenvolveram na presença de 50 mM de c12, t10 ou c9, t11. As análises moleculares permitiram concluir que o CLA influencia o metabolismo dos lipídios embrionários. O ácido oleico (AO), caracterizado com um ácido graxo monoinsaturado da família ômega 9, também foi relacionado com benefícios no contexto reprodutivo. O AO é o principal ácido graxo insaturado presente em oócitos (MATORRAS *et al.*, 1998), onde contribui neutralizando os efeitos prejudiciais dos ácidos graxos saturados durante o desenvolvimento oocitário; favorecendo o desenvolvimento embrionário pré-implantação (FAYEZI *et al.*, 2018). Além da abundância no oócito, o AO foi caracterizado como bastante abundante no fluido folicular de vacas pós-parto juntamente com os ácidos palmítico e esteárico (LEROY *et al.*, 2005).

Aardema *et al.* (2011) demonstraram que os oócitos de alta qualidade apresentam mais AO, AL e ácido araquidônico em comparação com oócitos de baixa qualidade (KIM *et al.*, 2003). Os oócitos são capazes de incorporar e metabolizar ácidos graxos exógenos (AARDEMA *et al.*, 2011) assim com os embriões (HILLMAN; FLYNN, 1980). Com base nas evidências da capacidade de incorporação e metabolização de ácidos graxos por oócitos e embriões, a modulação do conteúdo lipídico a favor de embriões de melhor qualidade pode se apoiar estrategicamente na suplementação de AO e ainda na modulação da síntese de prostaglandinas. No embrião, após os ácidos

graxos serem incorporados às células somáticas, os mesmos são esterificados em triacilglicerol e ésteres de colesterol e então armazenados como lipídios neutros na forma de gotículas intracelulares (CARRO *et al.*, 2013). Os lipídios neutros servem como principais moléculas de armazenamento de energia intracelular (BERTEVELLO *et al.*, 2018).

Além disso a beta-oxidação parece ser importante para a maturação nuclear do oócito (PACZKOWSKI *et al.*, 2014; VALSANGKAR *et al.*, 2013; YA e DOWNS, 2013). No entanto, após o estresse oxidativo, a peroxidação lipídica é aumentada e espécies reativas de oxigênio são liberadas, mecanismo que se torna bastante acentuado durante a criopreservação (SEIDEL *et al.*, 2006).

O acúmulo anormal de lipídios ocorre primeiro durante a MIV (DEL COLLADO *et al.*, 2015) e continua durante a CIV (SEIDEL, 2006). Reguladores metabólicos podem ser utilizados para melhorar a qualidade do embrião, dentre estes o CLA. O CLA induz a incorporação AL e a produção de triacilgliceróis e fosfolipídios, melhorando o perfil lipídico das membranas citoplasmáticas e celulares (TOMINAGA *et al.*, 2000). O AL apresenta propriedades antioxidantes e pode reduzir os lipídios citoplasmáticos assim com melhorar o perfil lipídico dos embriões bovinos inclusive para a criopreservação (KARASAHIN *et al.*, 2015). Portanto, a suplementação do meio de cultura com reguladores metabólicos, inclusive AL e CLA, pode melhorar a qualidade do embrião. O uso de CLA adicionado ao meio MIV aumentou o armazenamento de lipídios neutros (CARRO *et al.*, 2013), afetando o perfil lipídico do oócito e promovendo melhora na morfologia dos embriões desenvolvidos após a fertilização de tais oócitos (PHONGNIMITRI *et al.*, 2013).

A suplementação com CLA na CIV teve efeitos controversos. A suplementação com CLA durante a CIV reduziu a disposição de lipídios citoplasmáticos e inclusive melhorou a criotolerância (PEREIRA *et al.*, 2007), mas uma menor sobrevivência embrionária também foi relatada quando a mesma concentração foi utilizada (AL DARWICH *et al.*, 2010). Em outro estudo, o conteúdo lipídico foi aumentado em embriões suplementados com CLA e nenhum efeito positivo foi relatado na criotolerância (ABSALÓN-MEDINA *et al.*, 2014). Entretanto, Oliveira *et al.* (2021) verificou que a suplementação com CLA em D4 e D6 na cultura de embriões bovinos aumentou a taxa de expansão e eclosão após a vitrificação e descongelamento, com melhor resultado quando a suplementação foi realizada no D4 (DE LIMA *et al.*, 2017).

Em alguns estudos verificou-se um acúmulo de lipídios ocorre durante a MIV (AARDEMA *et al.*, 2011; DEL COLLADO *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2021) embora em outros estudos o conteúdo lipídico tenha diminuído durante a MIV (FERGUSON *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2003).

Durante a MIV, comparado a oócitos maturados *in vivo*, houveram modificações nos padrões lipídios dos oócitos, alterando o padrão de diacilgliceróis e triacilgliceróis (DEL COLLADO *et al.*, 2017). Como os lipídios neutros são importantes moléculas de armazenamento de energia intracelular e também participam da biossíntese da membrana durante o desenvolvimento embrionário inicial (HIZAKI *et al.*, 1999; HOCHI *et al.*, 1999), a qualidade do oócito está associada a um perfil lipídico de melhor qualidade (HOCHI *et al.*, 1999).

Assim a modulação lipídica na fase de MIV pode exercer efeitos positivos na qualidade e sobrevivência do embrião formado a partir de tais oócitos. Em muitos estudos também observou um acúmulo de lipídios durante a CIV (SUDANO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Sudano *et al.* (2016) verificaram um aumento do transcrito ACSL3 (ativa ácidos graxos de cadeia longa para a síntese de lipídios celulares) e nas gotículas de lipídios citoplasmáticos durante o estágio de mórula, seguido por uma diminuição no estágio de blastocisto. Segundo Absálon-Medina *et al.* (2014) a suplementação com CLA durante a CIV aumentou o teor lipídico dos embriões e Sudano *et al.* (2012) relata que esse acúmulo pode determinar uma melhoria na qualidade do embrião, sugerindo que a incorporação de lipídios neutros no embrião estabelece um perfil lipídico superior no mesmo inclusive melhorando a criotolerância do mesmo.

Recentemente um estudo do grupo (LOURENÇO, 2022), foi realizada suplementação com ácido linoleico conjugado [CLA; *cis*-9, *trans*-11 (*c9*, *t11*) e *trans*-10, *cis*-12 (*t10*, *c12*)] em meio de cultivo de células trofoblásticas bovinas (CT-1). Verificou-se que células trofoblásticas tratadas com CLA (10, 20, 50 e 100 μ M) tiveram uma redução na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ com 24, 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle (0 μ M). Também, observou-se que a relação $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$ 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 $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2. Em complemento a este estudo, torna-se de nosso interesse, verificar

o efeito do CLA na qualidade dos embriões produzidos *in vitro* e seus efeitos na síntese de PGE2 e PGF2 α , assim como na relação PGE2/ PGF2 α . Embora vários estudos tenham investigado o uso de CLA em modelos *in vivo* e *in vitro*, o mecanismo de ação dos CLAs é pouco conhecido.

3 HIPÓTESE

A hipótese é que a suplementação com CLA durante a maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV) ou somente durante a CIV estimula nos oócitos durante a MIV e nos embriões durante a CIV a menor síntese de PGF2 α , maior síntese de PGE2, maior razão PGE2/PGF2 α e maior taxa de blastocistos produzidos no D7 e D9, sendo tal efeito dose dependente.

4 OBJETIVOS

Objetivou-se determinar os efeitos de diferentes concentrações de CLA (0, 50, 100 e 150 μ M) na maturação *in vitro* de oócitos (MIV) e cultivo *in vitro* de embriões (CIV), onde a mesma concentração foi utilizada durante a MIV e CIV (Experimento 1) ou somente durante a CIV (Experimento 2) nas concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α no meio de cultivo ao término da MIV (24 horas após o cultivo de oócitos) e da CIV (9 dias após o cultivo dos embriões), assim como a taxa de produção de blastocisto no D7 e D9.

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 Local do Experimento

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

pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP de Dracena (Protocolo nº 19/2022), estado de São Paulo, Brasil.

5.2 Recuperação dos Complexos *Cumulus*-Oócito e Seleção

Ovários de fêmeas *Bos taurus indicus* foram obtidos em abatedouros e imediatamente após o abate, foram transportados ao laboratório imersos em solução salina (0,9% NaCl) a 36°C em caixa térmica, de forma que a temperatura fosse mantida durante todo o transporte. No laboratório, folículos com o diâmetro de 2 a 10 mm foram aspirados com o uso de uma seringa de 10 mL acoplada a uma agulha de 18-G. O fluido folicular obtido da aspiração dos folículos foi depositado em um tubo cônico estéril de 15 mL que foi mantido a 37,5°C até que a decantação dos oócitos fosse formada no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi transferido para placas de poliestireno 100 x 20 mm de diâmetro (Corning Incorporated, NY, USA), contendo DPBS suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB). Utilizando um estereomicroscópio (Nikon SMZ800, Tokyo, Japão), os complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram avaliados e categorizados em graus I, II ou III; de acordo com as características morfológicas [25]. Foram utilizados somente COCs com citoplasma homogêneo e circundado por múltiplas camadas de células do *cumulus* (graus I e II).

5.3 Delineamento Experimental

Antes do estudo proposto, foram conduzidos dois experimentos pilotos. No Experimento Piloto A, objetivou-se avaliar os efeitos do soro fetal bovino (SFB) na MIV e CIV, este adicionado rotineiramente no cultivo de oócitos e embriões, na síntese de PGF2 α e PGE2 pelos oócitos e embriões. O SFB é um produto biológico muito heterogêneo em sua composição em função da empresa de produção, código e partida. Deve-se considerar que, sem o uso do SFB na MIV e CIV, a produção de blastocistos no D7 e D9 apresenta baixo sucesso na produção de blastocistos. Considerando que ao término do experimento objetiva-se congelar oócitos e embriões, para a análise posterior por PCR, precisaríamos trabalhar com uma concentração mínima de SFB que nos possibilitasse a produção de estruturas em número suficiente para a análise por PCR. Assim, Experimento Piloto A objetivou determinar a menor concentração de SFB que possibilitasse ao término do estudo a produção de blastocistos em número

suficiente para tal análise porém a concentração determinada deveria ser segura para não interferir na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 pelos oócitos e embriões, objetos de nosso estudo.

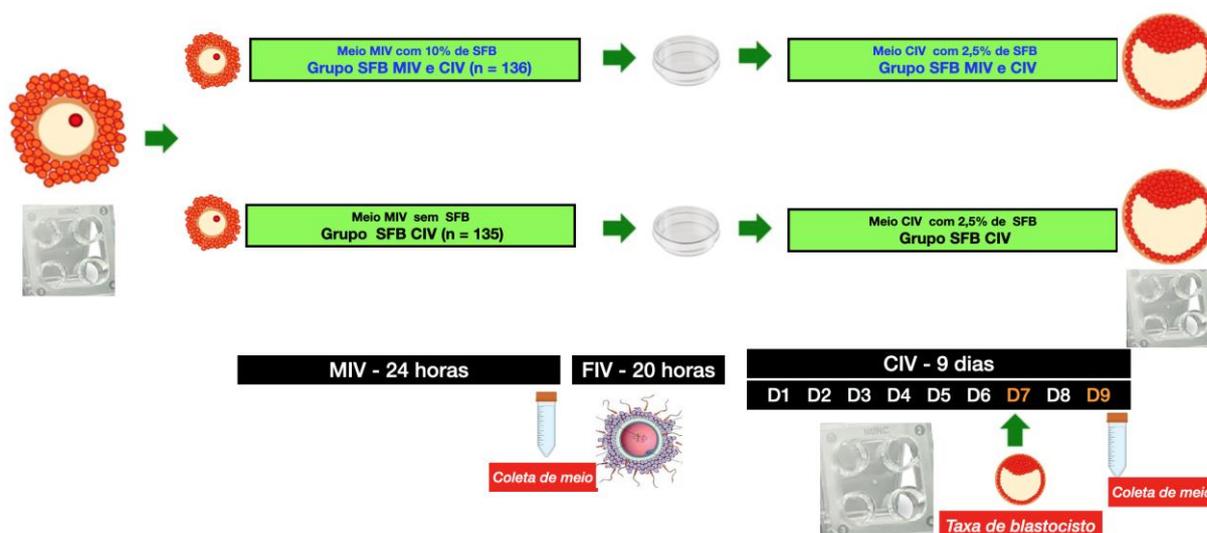
No Experimento Piloto B, objetivou-se avaliar os efeitos do DMSO (utilizado como diluente do CLA) na MIV e CIV, na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 pelos oócitos e embriões. Foi utilizada uma concentração de 0,15% de DMSO nos meios de cultivo da MIV e CIV, onde objetivou-se avaliar se tal concentração seria segura para não interferir na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 pelos oócitos e embriões, objetos de nosso estudo.

5.3.1 Experimento Piloto A

Conforme ilustrado na Figura 4, oócitos previamente selecionados foram divididos equitativamente para compor um dos dois grupos: Meio com 10% de SFB na MIV e 2,5% de SFB na CIV (**Grupo SFB MIV e CIV**; $n = 136$) ou Meio sem SFB na MIV e 2,5% de SFB na CIV (**Grupo SFB CIV**; $n = 135$). Os oócitos foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 μL do meio adicionado de SFB (Grupo SFB MIV e CIV) ou não (Grupo SFB CIV). Utilizou-se um poço por tratamento, contendo um número semelhante de oócitos (11 a 22 oócitos) por tratamento, em cada repetição. Foram realizadas um total de 8 repetições, assim o número de oócitos apresentados por grupo refere-se ao total, considerando todas as repetições. Durante a MIV os oócitos foram cultivados nos diferentes meios de tratamento durante 24 horas. Ao término da MIV os oócitos foram removidos do meio de cultivo para prosseguirem com a FIV, e imediatamente, todo o meio de cultivo contido em cada poço (aproximadamente 500 μL) foi removido, acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA. Após a FIV, em continuidade aos tratamentos, os prováveis zigotos de ambos os grupos receberam meio CIV suplementado com 2,5% de SFB. Os embriões foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 μL do meio correspondente a cada tratamento realizado durante a CIV, onde permaneceram ao longo de 9 dias. Ao término do cultivo no D9, os embriões foram removidos do meio CIV e todo o meio de cultivo de cada poço (aproximadamente 500 μL) foi removido do poço, acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise por

ELISA. Foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100) no D7 e D9 (D0= dia a fertilização).

Figura 4 - Delineamento do Experimento Piloto A. Oócitos foram selecionados para compor um dos dois grupos de tratamento: Meio MIV com 10% de SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (**Grupo SFB MIV e CIV**; n = 136); ou Meio MIV sem SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (**Grupo SFB CIV**; n = 135). O cultivo de oócitos e embriões foram realizados em placas de 4 poços (Nunc) contendo 500 µL do meio correspondente a cada tratamento. Ao término da MIV (24 horas após) e da CIV (9 dias após) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. No D7 e D9 (D0= dia a fertilização) foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Foram utilizados de 11 a 22 oócitos em cada tratamento para cada repetição, e no total foram realizadas 8 repetições, assim o número experimental de oócitos apresentado por grupo refere-se ao número total de oócitos considerando todas as repetições



Fonte: Elaborada pela autora.

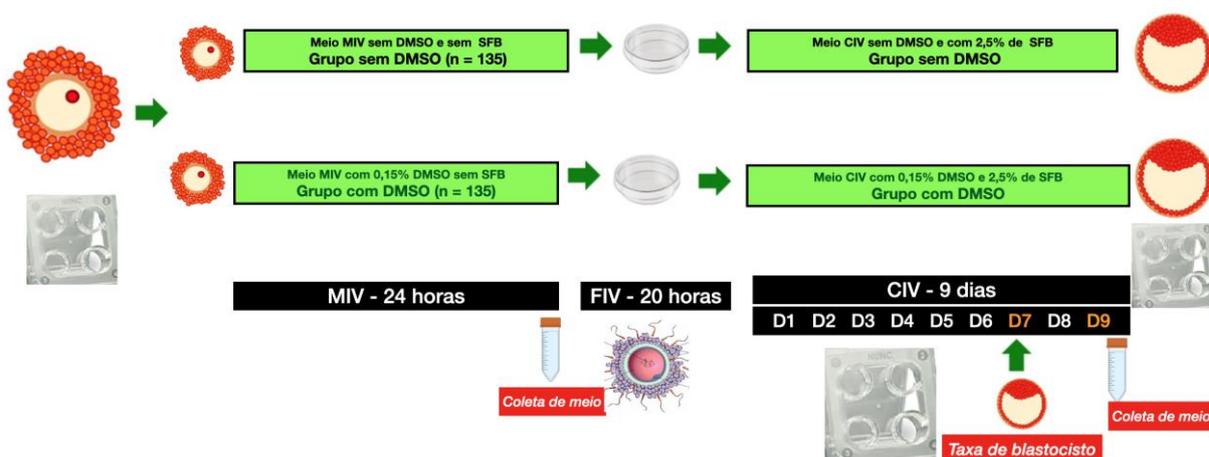
5.3.2 Experimento Piloto B

Conforme ilustrado na Figura 5, oócitos previamente selecionados foram divididos equitativamente para compor dois grupos: Meio MIV sem DMSO e sem SFB (**Grupo sem DMSO**; n = 135) ou Meio MIV com 0,15% de DMSO e sem SFB (**Grupo com DMSO**; n = 135). Os oócitos foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 µL do meio adicionado (Grupo com ou sem

DMSO). Utilizou-se um poço por tratamento, contendo um número semelhante de oócitos (11 a 22 oócitos) por tratamento em cada repetição. Foram realizadas 8 repetições, assim o número de oócitos apresentados por grupo refere-se ao total, considerando todas as repetições. Durante a MIV os oócitos foram cultivados nos diferentes meios de tratamento durante 24 horas. Ao término da MIV os oócitos foram removidos do meio de cultivo para prosseguirem com a FIV, e imediatamente, todo o meio de cultivo de cada poço (aproximadamente 500 μ L) foi removido do poço, acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA. Após a FIV, em continuidade aos tratamentos, os prováveis zigotos de ambos os grupos receberam meio CIV suplementado com 2,5% de SFB adicionado de 0,15% de DMSO (Grupo com DMSO) ou meio CIV suplementado com 2,5% de SFB sem a adição de DMSO (Grupo sem DMSO).

Os embriões foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 μ L do meio correspondente a cada tratamento realizado durante a CIV, onde permaneceram ao longo de 9 dias. Ao término do cultivo no D9, os embriões foram removidos do meio CIV e todo o meio de cultivo de cada poço (aproximadamente 500 μ L) foi removido, acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA. Foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100) no D7 e D9 (D0= dia a fertilização).

Figura 5 - Delineamento do Experimento Piloto B. Oócitos foram selecionados para compor um dos dois grupos de tratamento: Meio MIV sem DMSO e sem SFB + Meio CIV sem DMSO e com 2,5% de SFB (**Grupo sem DMSO**; n = 135); ou Meio MIV com 0,15% DMSO sem SFB + Meio CIV com 0,15% DMSO e 2,5% de SFB (**Grupo com DMSO**; n = 135). O cultivo de oócitos e embriões foram realizados em placas de 4 poços (Nunc) contendo 500 μ L do meio correspondente a cada tratamento. Ao término da MIV (24 horas após) e da CIV (9 dias após) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. No D7 e D9 (D0= dia a fertilização) foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Foram utilizados de 11 a 22 oócitos em cada tratamento para cada repetição, e no total foram realizadas 8 repetições, assim o número experimental de oócitos apresentado por grupo refere-se ao número total de oócitos considerando todas as repetições



Fonte: Elaborada pela autora.

5.3.3 Experimento 1: Efeito de Diferentes Concentrações de CLA na MIV e CIV

Diante dos resultados obtidos no Experimentos Pilotos A, preconizou-se que nos tratamentos com CLA, o meio MIV não seria suplementado com SFB e o meio CIV seria suplementado com 2,5% de SFB em todos os grupos. Diante dos resultados obtidos no Experimentos Pilotos B, preconizou-se que nos tratamentos com CLA, o meio MIV e CIV seria suplementado com CLA nas diferentes concentrações sempre diluído de forma que no meio final de cultivo fosse obtida a concentração de 0,15% de DMSO em todos os grupos de tratamento.

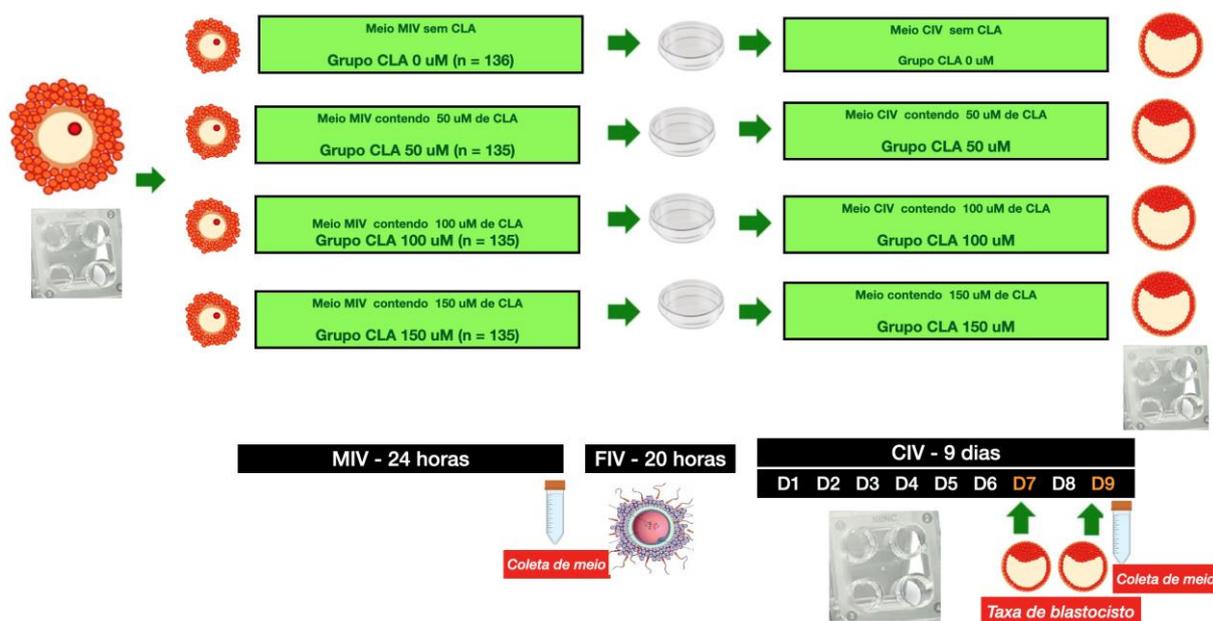
Conforme ilustrado na Figura 6, para a MIV oócitos previamente selecionados foram divididos equitativamente para compor um dos quatro grupos de tratamento: Meio MIV e CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (**Grupo CLA 0 μ M**; n = 136); Meio MIV e CIV

contendo 50 μM de CLA (**Grupo CLA 50 μM** ; n = 135); Meio MIV e CIV contendo 100 μM de CLA (**Grupo CLA 100 μM** ; n = 135) e Meio MIV e CIV contendo 150 μM de CLA (**Grupo CLA 150 μM** ; n = 135).

A concentração de DMSO em todos os meios acrescidos de CLA foi de 0,15%. Os oócitos foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 μL do meio sem SFB (Grupo SFB CIV) e com 0,15% de DMSO contendo CLA (50, 100 ou 150 μM) ou não (0 μM) em todos os grupos de tratamento. Utilizou-se um poço por tratamento, contendo um número semelhante de oócitos (11 a 22 oócitos) por tratamento em cada repetição. Foram realizadas 8 repetições, assim o número de oócitos apresentados por grupo refere-se ao total, considerando todas as repetições. Durante a MIV os oócitos foram cultivados nos diferentes meios de tratamento durante 24 horas. Ao término da MIV os oócitos foram removidos do meio de cultivo para prosseguirem com a FIV, e imediatamente, todo o meio de cultivo de cada poço (aproximadamente 500 μL) foi removido do poço, acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA.

Após a FIV, em continuidade aos tratamentos, os prováveis zigotos de ambos os grupos receberam meio CIV suplementado com 2,5% de SFB adicionado de 0,15% de DMSO contendo CLA (50, 100 ou 150 μM) ou não (0 μM) em todos os grupos de tratamento. Os embriões foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 μL do meio correspondente a cada tratamento realizado durante a CIV, onde permaneceram ao longo de 9 dias. Ao término do cultivo no D9, os embriões foram removidos do meio CIV e todo o meio de cultivo de cada poço (aproximadamente 500 μL), foi removido, acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA. Foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100) no D7 e D9 (D0= dia a fertilização).

Figura 6 - Delineamento do Experimento 1. Oócitos foram selecionados para compor quatro grupos de tratamento: Meio MIV sem CLA com 0,15% de DMSO + Meio CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (**Grupo CLA 0 μM** ; n = 136); Meio MIV contendo 50 μM de CLA + Meio CIV contendo 50 μM de CLA (**Grupo CLA 50 μM** ; n = 135); Meio MIV contendo 100 μM de CLA + Meio CIV contendo 100 μM de CLA (**Grupo CLA 100 μM** ; n = 135) e Meio MIV contendo 150 μM de CLA + Meio CIV contendo 150 μM de CLA (**Grupo CLA 150 μM** ; n = 135). O cultivo de oócitos e embriões foram realizados em placas de 4 poços (Nunc) contendo 500 μL do meio correspondente a cada tratamento. Ao término da MIV (24 horas após) e da CIV (9 dias após) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. No D7 e D9 (D0= dia a fertilização) foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Foram utilizados de 11 a 22 oócitos em cada tratamento para cada repetição, e no total foram realizadas 8 repetições, assim o número experimental de oócitos apresentado por grupo refere-se ao número total de oócitos considerando todas as repetições



Fonte: Elaborada pela autora.

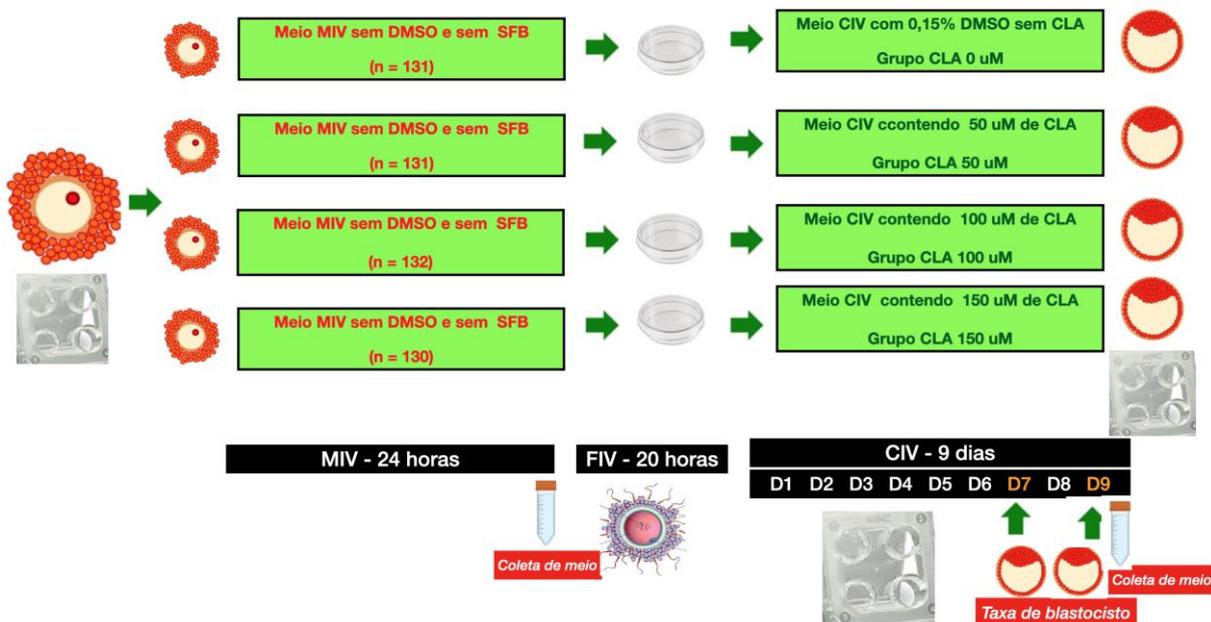
5.3.4 Experimento 2: Efeito de Diferentes Concentrações de CLA na CIV

No Experimento 2, preconizou-se que para todos os grupos de tratamento o meio MIV não seria suplementado com SFB e DMSO e o meio CIV seria suplementado com 2,5% de SFB em todos os grupos e conteria 0,15% de DMSO com as diferentes concentrações de CLA.

Conforme ilustrado na Figura 7, para a MIV oócitos previamente selecionados foram divididos equitativamente para compor um dos quatro grupos de tratamento e em todos os grupos utilizou-se meio MIV sem SFB e sem DMSO. Os oócitos foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 µL do meio sem SFB e sem DMSO. Utilizou-se um poço por tratamento, contendo um número semelhante de oócitos (12 a 28 oócitos) por tratamento em cada repetição. Foram realizadas 8 repetições, assim o número de oócitos apresentados por grupo refere-se ao total, considerando todas as repetições.

Durante a MIV os oócitos foram cultivados nos diferentes meios de tratamento durante 24 horas. Ao término da MIV os oócitos foram removidos do meio de cultivo para prosseguirem com a FIV, e imediatamente, todo o meio de cultivo de cada poço (aproximadamente 500 µL) foi removido do poço, acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA. Após a FIV, em continuidade aos tratamentos, os prováveis zigotos de ambos os grupos receberam meio CIV suplementado com 2,5% de SFB adicionado de 0,15% de DMSO contendo nenhum CLA (**Grupo CLA 0 µM**; n=131), 50 µM de CLA (**Grupo CLA 50 µM**; n=131), 100 µM de CLA (**Grupo CLA 100 µM**; n=132) ou 150 µM de CLA (**Grupo CLA 150 µM**; n=130). Os embriões foram cultivados em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 µL do meio correspondente a cada tratamento realizado durante a CIV, onde permaneceram ao longo de 9 dias. Ao término do cultivo no D9, os embriões foram removidos do meio CIV e todo o meio de cultivo de cada poço (aproximadamente 500 µL) foi acondicionado em criotubos e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA. Foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100) no D7 e D9 (D0= dia a fertilização).

Figura 7 - Delineamento do Experimento 2. Oócitos foram selecionados para compor quatro grupos de tratamento: Meio MIV sem CLA e sem DMSO + Meio CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (**Grupo CLA 0 μM** ; n = 131); Meio MIV sem CLA e sem DMSO + Meio CIV contendo 50 μM de CLA (**Grupo CLA 50 μM** ; n = 131); Meio MIV sem CLA e sem DMSO + Meio CIV contendo 100 μM de CLA (**Grupo CLA 100 μM** ; n = 132) e Meio MIV sem CLA e sem DMSO + Meio CIV contendo 150 μM de CLA (**Grupo CLA 150 μM** ; n = 130). O cultivo de oócitos e embriões foram realizados em placas de 4 poços (Nunc) contendo 500 μL do meio correspondente a cada tratamento. Ao término da MIV (24 horas após) e da CIV (9 dias após) o meio foi recuperado e armazenado em criotubos para posterior análise por ELISA. No D7 e D9 (D0= dia a fertilização) foi determinada a taxa de blastocisto (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100). Foram utilizados de 12 a 28 oócitos em cada tratamento para cada repetição, e no total foram realizadas 8 repetições, assim o n experimental apresentado por grupo refere-se ao número total de oócitos considerando todas as repetições



Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Maturação *In Vitro* dos Oócitos (MIV)

Os COCs selecionados foram lavados três vezes em gotas de 50 μL de meio de lavagem H-199, constituído por TCM-199 (Gibco BRL) suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 75 μg de Gentamicina/ml. Posteriormente foram lavados uma vez em meio de maturação B-199, constituído de TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 μg de Gentamicina/ml, 0,5 μg de FSH/ml (Pluset®, Hertape

Calier, Juatuba, MG, Brasil), 100 UI de hCG/ml (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) acrescido de 10% de SFB (Gibco BRL) acrescido ou não de 10% de SFB de acordo com o grupo de tratamento. Posteriormente, os COCs foram alocados aleatoriamente em placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500 µL de meio de maturação. A MIV foi realizada em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂, durante 24 horas. Todos os meios utilizados na MIV foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil).

5.5 Fertilização *In Vitro* (FIV)

Foi utilizado o sêmen criopreservado de um único touro Nelore e única partida (Rai da MN, CRV Lagoa, Partida 0601211OEI), sendo sua fertilidade *in vitro* previamente comprovada. A palheta de sêmen foi descongelada a 36°C por 30 segundos em um descongelador automático de semen (WTA, modelo INPI/D1710561-9, Cravinhos, São Paulo, Brasil) e em seguida foi avaliada a qualidade espermática. Ao sêmen foi adicionado o gradiente composto por meio Select Sperm acrescido de CAP. Em seguida esta mistura foi centrifugada a 5000 x g, durante 5 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sedimento contendo os espermatozóides foi avaliado quanto a motilidade e concentração espermática em câmara de Neubauer. Após a MIV, os COCs foram lavados três vezes em gotas de 50µL de meio FIV comercial.

Posteriormente, os COCs foram colocados no meio FIV em gotas de 100 µL de meio de fertilização dispostas em placas de petri de 35 mm cobertas com óleo siliconado para receberem o sêmen diluído. O semen foi diluído na concentração final fosse ajustada para 2×10^6 espermatozóides/mL. Os oócitos foram submetidos a FIV durante 20 horas em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Todos os meios utilizados na FIV foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil).

5.6 Cultivo *In Vitro* dos Embriões (CIV)

Após a FIV, os prováveis zigotos foram colocados em 30 µL do meio de lavagem, e submetidos a 30 a 40 segundos em vórtex (Phoenix Luferco AP56, Araraquara, São

Paulo, Brazil) para que fossem removidas às células do *cumulus*. Posteriormente, os prováveis zigotos foram lavados em 300 µL de meio de lavagem e posteriormente lavados três vezes sucessivamente em gotas de 50 µL de meio de cultivo. Após este processo, as estruturas foram alocadas nas placas de 4 poços (Nunc IVF Multidish, Ref. 179830) contendo 500µL de meio de cultivo CIV acrescido de 2,5% de SFB (Gibco BRL) em todos os tratamentos dos experimentos 1 e 2.

Os prováveis zigotos com os respectivos tratamentos foram mantidos em incubadora a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂ durante 9 dias. No final do período de cultivo (D7 e D9) foi avaliada a taxa de produção de embriões (número de blastocisto / número de oócitos cultivados x 100) quando os blastocistos foram classificados morfologicamente em blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido [26]. Todos os meios utilizados na FIV foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil). Todos os meios utilizados na FIV foram produzidos pelo Laboratório Botupharma Animal Biotechnology (Botucatu- SP, Brasil). Ao término do cultivo no D9, o meio foi coletado e armazenado a -20°C para posterior análise por ELISA.

5.7 Quantificação de PGF2 α e PGE2 por Ensaio Imunoenzimático

Após 24 horas da MIV (término da MIV) e no D9 da CIV (término da CIV), os meios de cultura de cada tratamento foram coletados e centrifugados a 12.000 x g durante 2 minutos para a remoção dos detritos celulares e armazenados a -20°C até a realização dos ensaios. As concentrações de PGF2 α e PGE2 no meio de cultura foram quantificadas usando kits de ELISA disponíveis comercialmente (Kit Prostaglandin F2 α ELISA, nº 516011 e Kit Prostaglandin E2 ELISA - Monoclonal, nº 514010; ambos da Cayman Chemical). As análises foram realizadas de acordo com as informações do fabricante.

5.8 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o PROC MIXED do SAS (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) considerando o poço como unidade experimental. A suposição de normalidade dos resíduos e homogeneidade

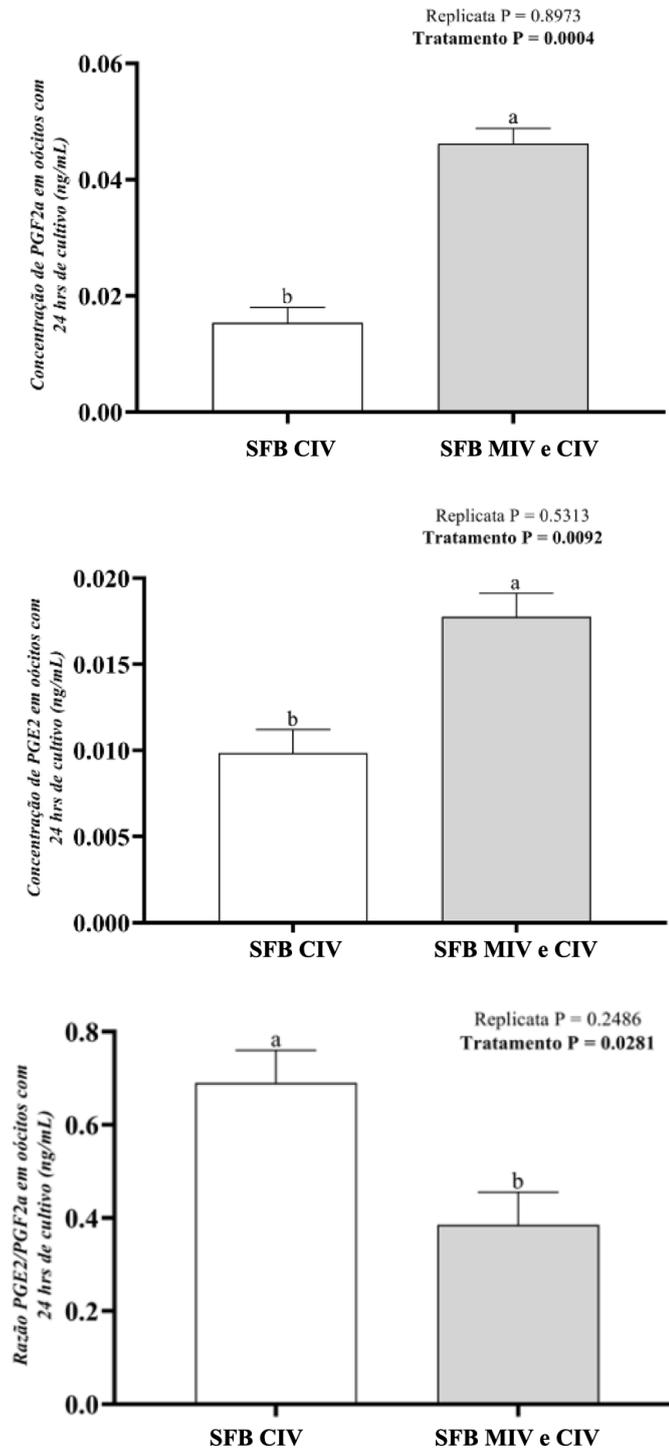
das variâncias foram verificadas para cada modelo por meio do teste de Shapiro-Wilk. Quando tais premissas não foram atendidas, transformações logarítmicas foram aplicadas nos dados brutos. Para as respostas de PGF2 α e PGE2, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) considerando o efeito principal do grupo de tratamento e o efeito aleatório das réplicas de cultura. Os resultados serão apresentados com médias \pm erro padrão da média (EPM) não transformados. Em todas as análises considerou-se um nível de significância de 5%, onde diferenças com probabilidades ($P \leq 0,05$) foram consideradas significativas.

6 RESULTADOS

6.1 Experimento Piloto A

Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Quanto às concentrações de PGF2 α e PGE2 observadas no meio de cultivo de oócitos após 24 horas de cultivo, conforme ilustrado na Figura 8, o Grupo SFB MIV e CIV comparado ao Grupo SFB CIV, verificou-se maiores concentrações de PGF2 α ($0,0461 \pm 0,0026$ vs. $0,0153 \pm 0,0026$ ng/mL respectivamente; $P = 0,0004$) e PGE2 ($0,0177 \pm 0,0013$ vs. $0,0098 \pm 0,0013$ ng/mL; $P = 0,0092$). Quando foi comparada a razão PGE2/PGF2 α , esta foi menor no Grupo SFB MIV e CIV comparada ao Grupo SFB CIV ($0,3852 \pm 0,0703$ vs. $0,6899 \pm 0,0703$ ng/mL respectivamente; $P = 0,0281$).

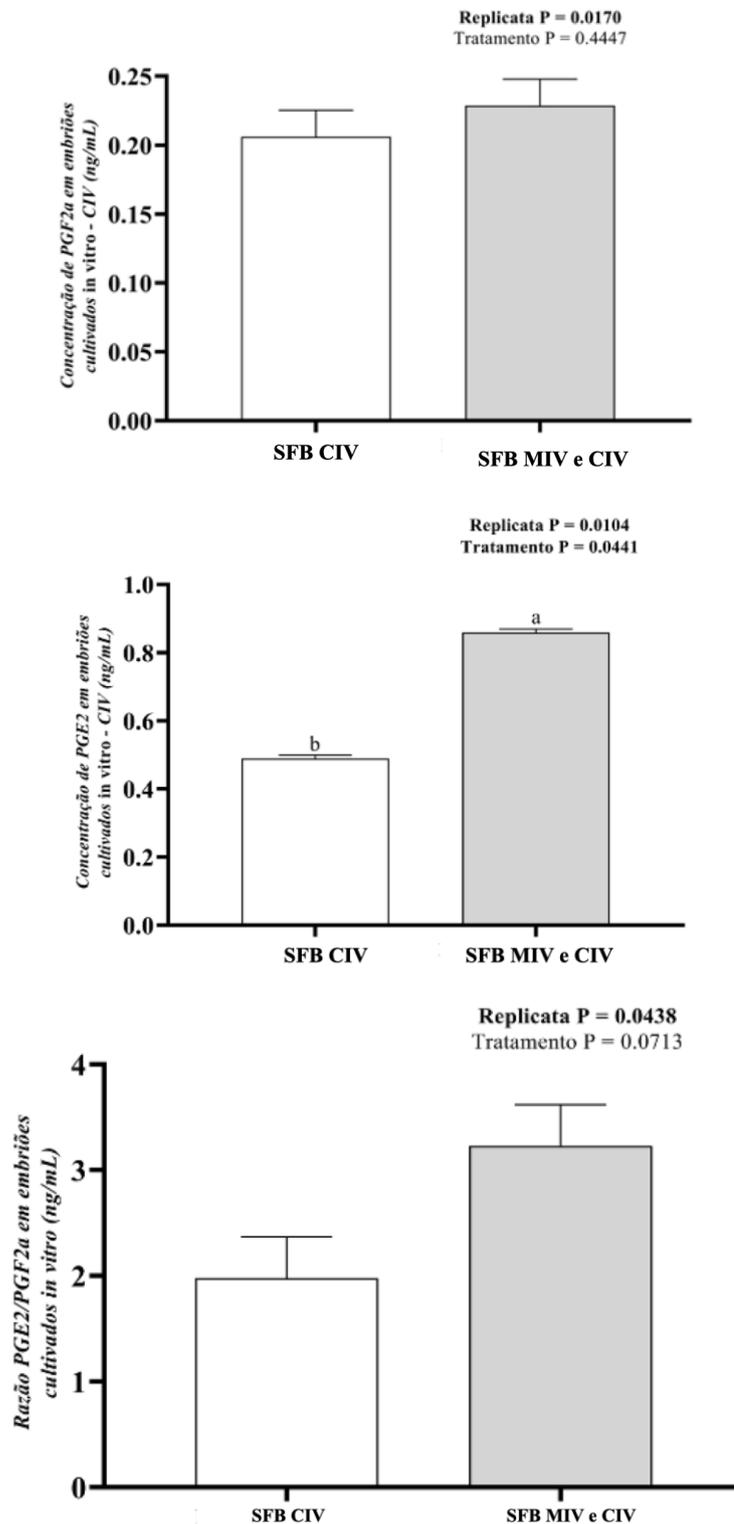
Figura 8 - Experimento Piloto A - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA, em meio de cultivo de oócitos bovinos cultivados por 24 horas em meio MIV sem SFB (**SFB CIV**; n=135) ou em meio MIV suplementado com 10% e SFB (**Grupo SFB MIV e CIV**; n=136)



Fonte: Elaborada pela autora.

Concentração de $PGF2\alpha$ e $PGE2$ no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Quanto às concentrações de $PGF2\alpha$ e $PGE2$ observadas no meio de cultivo de embriões após 9 dias de cultivo, conforme ilustrado na Figura 9, quando o Grupo SFB CIV foi comparado ao Grupo SFB MIV e CIV, não houve diferença para as concentrações de $PGF2\alpha$ ($0,2061 \pm 0,0192$ vs. $0,2286 \pm 0,0192$ ng/mL respectivamente; $P = 0,4447$). As concentrações de $PGE2$ foram maiores no Grupo SFB MIV e CIV comparado ao Grupo SFB CIV ($0,8593 \pm 0,0978$ vs. $0,4893 \pm 0,0978$ ng/mL respectivamente; $P = 0,0441$). Não houve diferença para a razão $PGE2/PGF2\alpha$ entre o Grupo SFB CIV e o Grupo SFB MIV e CIV ($1,9790 \pm 0,3874$ vs. $3,2297 \pm 0,3873$ ng/mL respectivamente; $P = 0,0713$), embora para a razão tenha sido observada uma tendência de ter sido maior no Grupo SFB MIV e CIV.

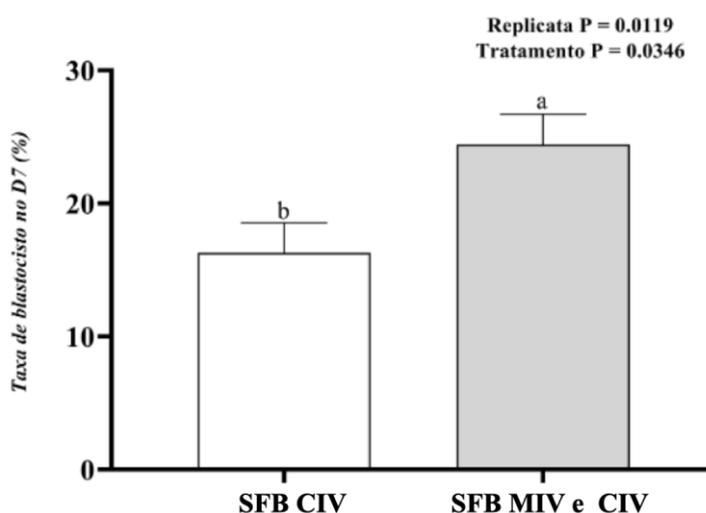
Figura 9 - Experimento Piloto A - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA em embriões com 9 dias de cultivo, produzidos com e Meio MIV com 10% de SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (**Grupo SFB MIV e CIV**) ou Meio MIV sem SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (**Grupo SFB CIV**)



Fonte: Elaborada pela autora.

Produção de blastocisto no D7. Conforme representado na Figura 10, a taxa de blastocisto no D7 foi maior no Grupo SFB MIV e CIV comparado ao Grupo SFB CIV ($24,4267 \pm 2,2659\%$ vs. $16,2778 \pm 2,2659\%$ respectivamente; $P = 0,0346$).

Figura 10 - Experimento Piloto A - Experimento Piloto A - Produção de blastocisto no D7. Média + erro padrão da taxa de blastocisto sete dias após a fertilização (D7) com e Meio MIV com 10% de SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (**Grupo SFB MIV e CIV**) ou Meio MIV sem SFB + Meio CIV com 2,5% de SFB (**Grupo SFB CIV**)

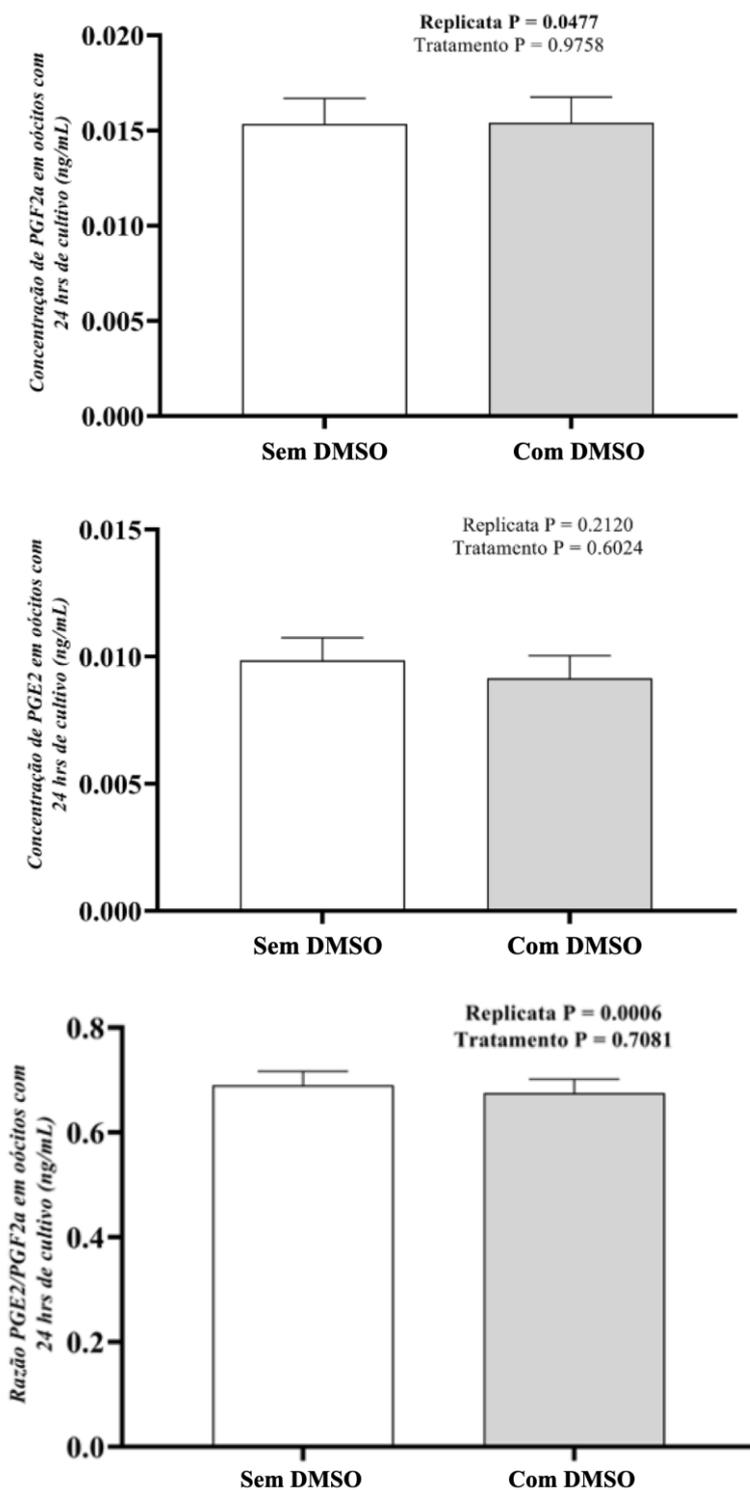


Fonte: Elaborada pela autora.

6.2 Experimento Piloto B

Concentração de $PGF2\alpha$ e $PGE2$ no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Quanto às concentrações de $PGF2\alpha$ e $PGE2$ observadas no meio de cultivo de oócitos após 24 horas, conforme ilustrado na Figura 11, quando o Grupo sem DMSO foi comparado ao Grupo com DMSO, não foi observada diferença para as concentrações de $PGF2\alpha$ ($0,0153 \pm 0,0013$ vs. $0,0154 \pm 0,0013$ ng/mL respectivamente; $P = 0,9758$), $PGE2$ ($0,0098 \pm 0,0008$ vs. $0,0091 \pm 0,0008$ ng/mL respectivamente; $P = 0,6024$) e razão $PGE2/PGF2$ ($0,6899 \pm 0,0268$ vs. $0,6748 \pm 0,0268$ ng/mL respectivamente; $P = 0,7081$).

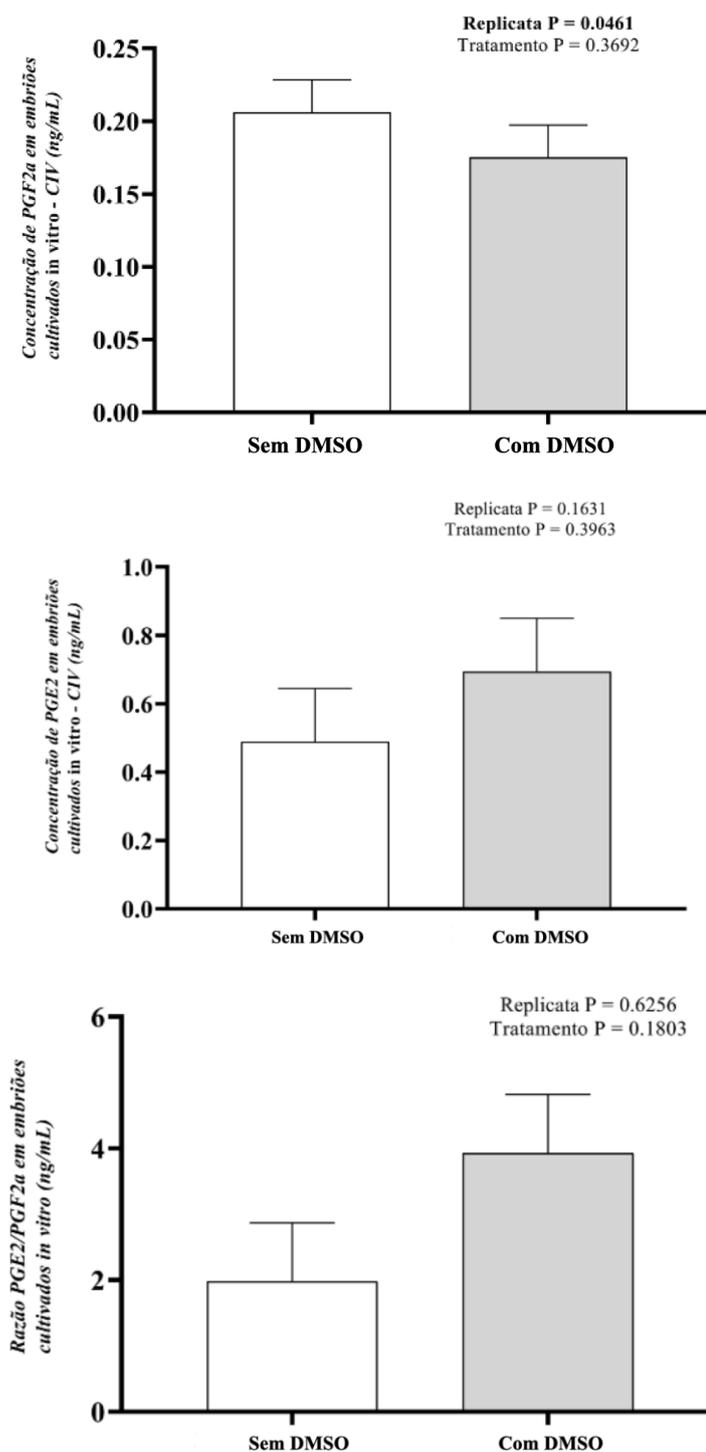
Figura 11 - Experimento Piloto B - Concentração de $PGF2\alpha$ e $PGE2$ no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Média \pm erro padrão das concentrações de $PGF2\alpha$, $PGE2$ e a razão $PGE2/PGF2\alpha$ em ng/mL; mensurada por ELISA, em meio de cultivo de oócitos bovinos cultivados por 24 horas em meio MIV sem DMSO (**Grupo sem DMSO**; n=135) ou com 0,15% de DMSO (**Grupo SFB com DMSO**; n=135)



Fonte: Elaborada pela autora.

CIV. Quanto às concentrações de PGF2 α e PGE2 observadas no meio de cultivo de embriões após 9 dias de cultivo, conforme ilustrado na Figura 12, quando o Grupo sem DMSO foi comparado ao Grupo com DMSO, não houve diferença para as concentrações de PGF2 α ($0,2061 \pm 0,0221$ vs. $0,1752 \pm 0,0221$ ng/mL respectivamente; P = 0,3692), PGE2 ($0,4893 \pm 0,1560$ vs. $0,6939 \pm 0,1560$ ng/mL respectivamente; P = 0,3963) e razão PGE2/PGF2 ($1,9790 \pm 0,8869$ vs. $3,9313 \pm 0,8869$ ng/mL respectivamente; P = 0,1803).

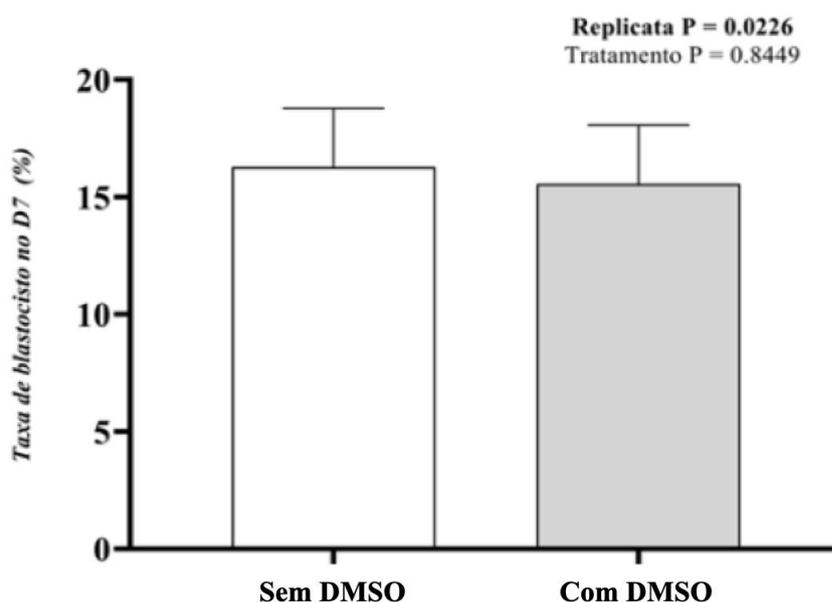
Figura 12 - Experimento Piloto B - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA em embriões com 9 dias de cultivo, produzidos em Meio MIV sem DMSO e sem SFB + Meio CIV sem DMSO e com 2,5% de SFB (**Grupo sem DMSO**); ou Meio MIV com 0,15% DMSO sem SFB + Meio CIV com 0,15% DMSO e 2,5% de SFB (**Grupo com DMSO**)



Fonte: Elaborada pela autora.

Produção de blastocisto no D7. Conforme representado na Figura 13, a taxa de blastocisto no D7 não diferiu entre o Grupo sem DMSO e Grupo com DMSO ($16,2778 \pm 2,4997\%$ vs. $16,2778 \pm 2,4997\%$ respectivamente; $P = 0,8449$).

Figura 13 - Experimento Piloto B - Produção de blastocisto no D7. Média \pm erro padrão da taxa de blastocisto sete dias após a fertilização (D7) produzidos em Meio MIV sem DMSO e sem SFB + Meio CIV sem DMSO e com 2,5% de SFB (**Grupo sem DMSO**); ou Meio MIV com 0,15% DMSO sem SFB + Meio CIV com 0,15% DMSO e 2,5% de SFB (**Grupo com DMSO**)

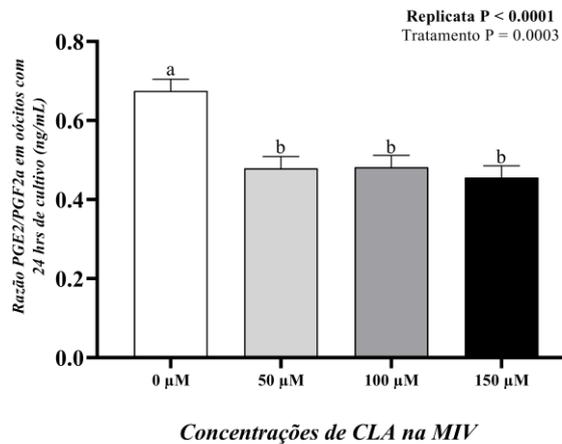
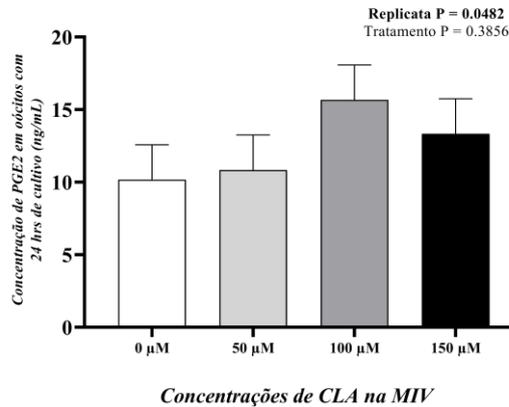
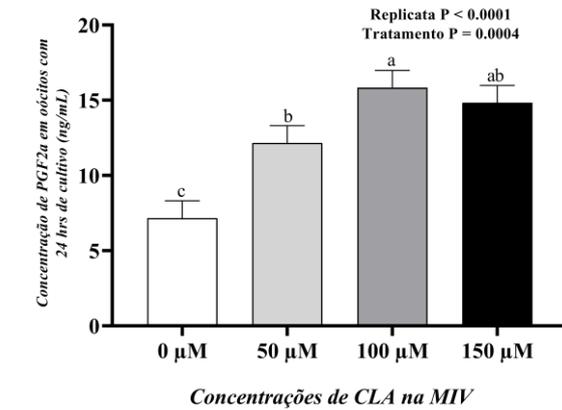


Fonte: Elaborada pela autora.

6.3 Experimento 1

Concentração de $PGF2\alpha$ e $PGE2$ no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Conforme ilustrado na Figura 14, as concentrações de $PGF2\alpha$ foram maiores ($P = 0,3856$) nos grupos $50 \mu\text{M}$ ($12,1667 \pm 1,1539 \text{ ng/mL}$), $100 \mu\text{M}$ ($15,8333 \pm 1,1539 \text{ ng/mL}$), $150 \mu\text{M}$ ($14,8333 \pm 1,1539 \text{ ng/mL}$) comparado ao Grupo $0 \mu\text{M}$ ($7,1667 \pm 1,1539 \text{ ng/mL}$). Não houve diferença entre os grupos para a $PGE2$ ($P = 0,3856$). A razão $PGE2/PGF2$ foi menor ($P = 0,0003$) nos grupos $50 \mu\text{M}$ ($0,4791 \pm 0,0298 \text{ ng/mL}$), $100 \mu\text{M}$ ($0,4821 \pm 0,0298 \text{ ng/mL}$), $150 \mu\text{M}$ ($0,4558 \pm 0,0298 \text{ ng/mL}$) comparado ao Grupo $0 \mu\text{M}$ ($0,6748 \pm 0,0298 \text{ ng/mL ng/mL}$).

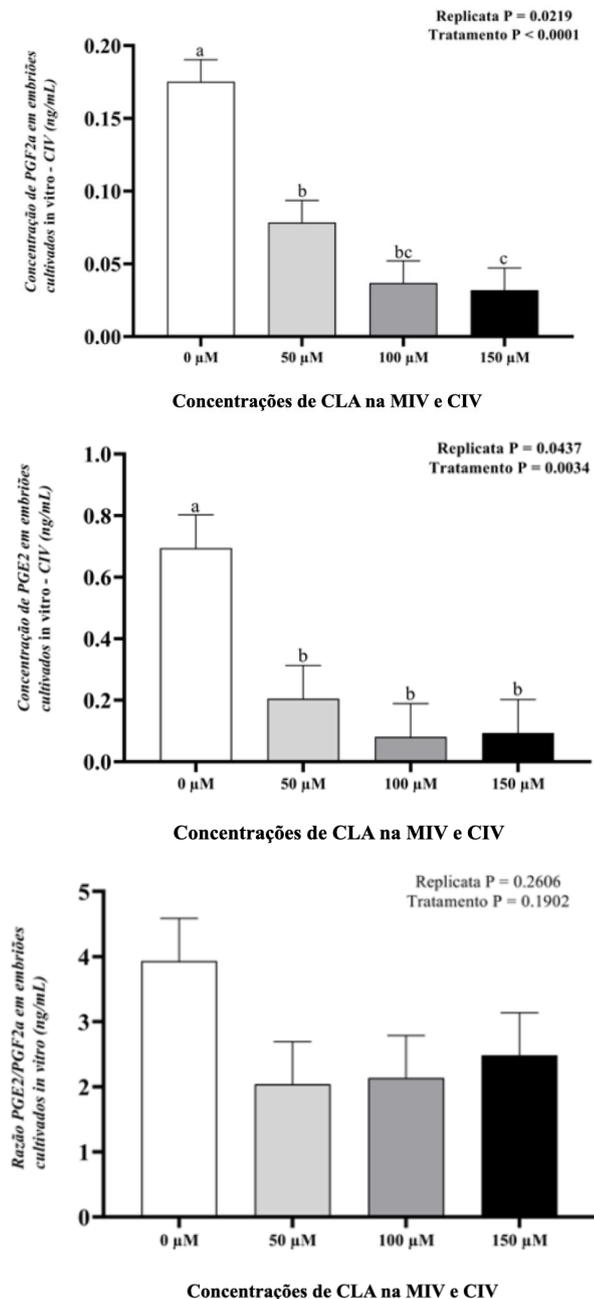
Figura 14 - Experimento 1 - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA no meio de oócitos cultivados por 24 horas em meio MIV sem CLA com 0,15% de DMSO (**Grupo CLA 0 μ M**; n = 136); Meio MIV contendo 50 μ M de CLA (**Grupo CLA 50 μ M**; n = 135); Meio MIV contendo 100 μ M de CLA (**Grupo CLA 100 μ M**; n = 135) e Meio MIV contendo 150 μ M de CLA (**Grupo CLA 150 μ M**; n = 135)



Fonte: Elaborada pela autora.

Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Quanto às concentrações de PGF2 α e PGE2 observadas no meio de cultivo de embriões após 9 dias de cultivo, conforme ilustrado na Figura 15, quando as concentrações de PGF2 α foram menores ($P < 0,0001$) nos grupos 50 μM ($0,0783 \pm 1,0152$ ng/mL), 100 μM ($0,03683 \pm 0,0152$ ng/mL), 150 μM ($0,03191 \pm 0,0152$ ng/mL) comparado ao grupo controle ($0,1752 \pm 0,01524$ ng/mL). A concentração de 150 μM exerceu maior inibição na síntese de PGF2 α quando comparada a dose de 50 μM . As concentrações de PGE2 foram menores ($P = 0,0034$) nos grupos 50 μM ($0,2046 \pm 0,1084$ ng/mL), 100 μM ($0,0806 \pm 0,1084$ ng/mL), 150 μM ($0,0938 \pm 0,1084$ ng/mL) comparado ao grupo controle ($0,6939 \pm 0,1084$ ng/mL). A razão PGE2/PGF2 não diferiu entre os grupos ($P = 0,1902$).

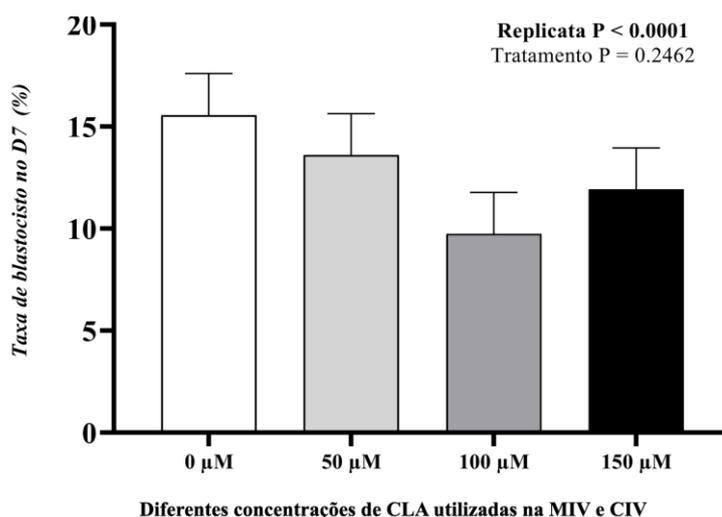
Figura 15 - Experimento 1 - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA no meio de embriões 9 dias após a fertilização (D9; término da CIV) provenientes de meio MIV sem CLA com 0,15% de DMSO + Meio CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (**Grupo CLA 0 μ M**); Meio MIV contendo 50 μ M de CLA + Meio CIV contendo 50 μ M de CLA (**Grupo CLA 50 μ M**); Meio MIV contendo 100 μ M de CLA + Meio CIV contendo 100 μ M de CLA (**Grupo CLA 100 μ M**) e Meio MIV contendo 150 μ M de CLA + Meio CIV contendo 150 μ M de CLA (**Grupo CLA 150 μ M**)



Fonte: Elaborada pela autora.

Produção de blastocisto no D7. Conforme representado na Figura 16, a taxa de blastocisto no D7 não diferiu entre os grupos 0, 50, 100 e 150 μM de CLA ($15,5633 \pm 2,0366\%$; $13,5978 \pm 2,0366\%$; $9,7411 \pm 2,0366\%$ e $11,9222 \pm 2,0366\%$ respectivamente; $P = 0,2462$).

Figura 16 - Experimento 1 - Produção de blastocisto no D7. Média \pm erro padrão da taxa de blastocisto 7 dias após a fertilização (D7) provenientes de meio MIV sem CLA com 0,15% de DMSO + Meio CIV sem CLA com 0,15% de DMSO (**Grupo CLA 0 μM**); Meio MIV contendo 50 μM de CLA + Meio CIV contendo 50 μM de CLA (**Grupo CLA 50 μM**); Meio MIV contendo 100 μM de CLA + Meio CIV contendo 100 μM de CLA (**Grupo CLA 100 μM**) e Meio MIV contendo 150 μM de CLA + Meio CIV contendo 150 μM de CLA (**Grupo CLA 150 μM**)

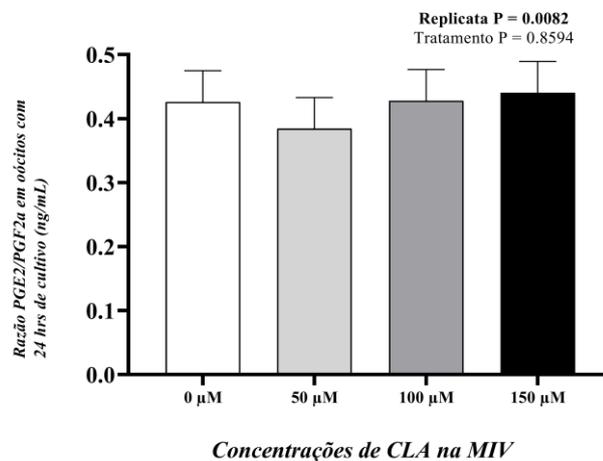
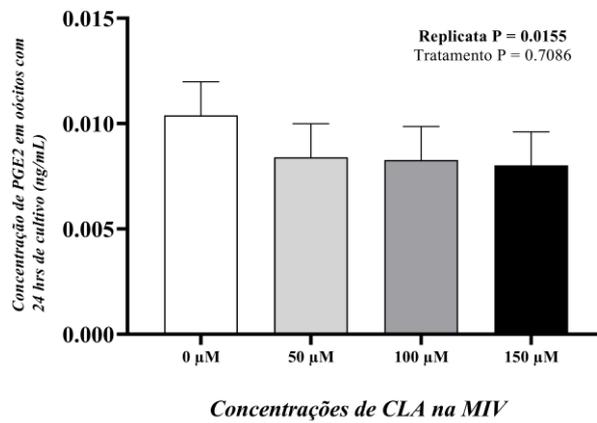
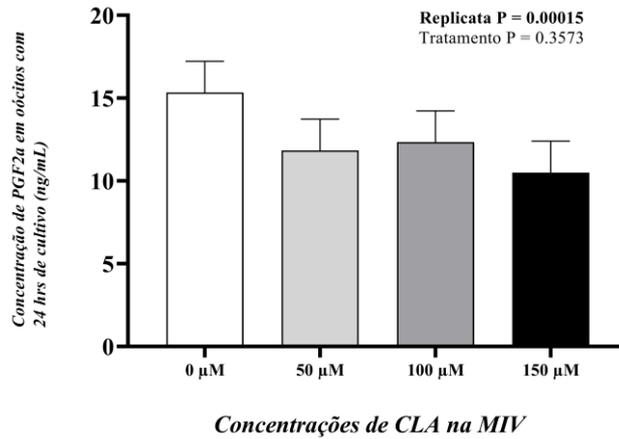


Fonte: Elaborada pela autora.

6.4 Experimento 2

Concentração de $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Conforme representado na Figura 17, considerando que os oócitos não foram tratados com CLA na MIV em todos os grupos, não houve diferença para os grupos para as concentrações de $\text{PGF2}\alpha$ ($P = 0,3573$), PGE2 ($P = 0,7086$) e razão $\text{PGE2}/\text{PGF2}$ ($P = 0,8594$).

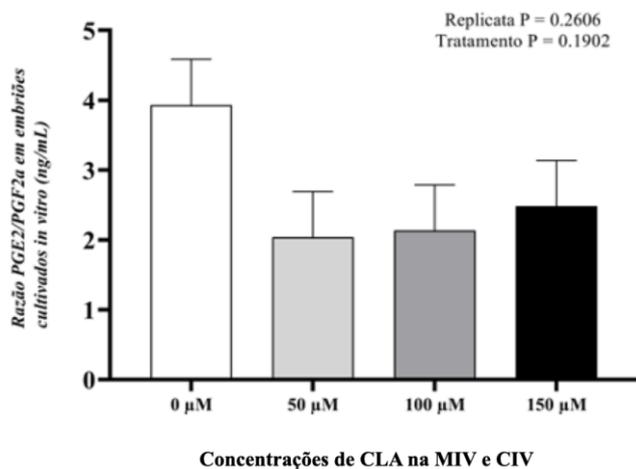
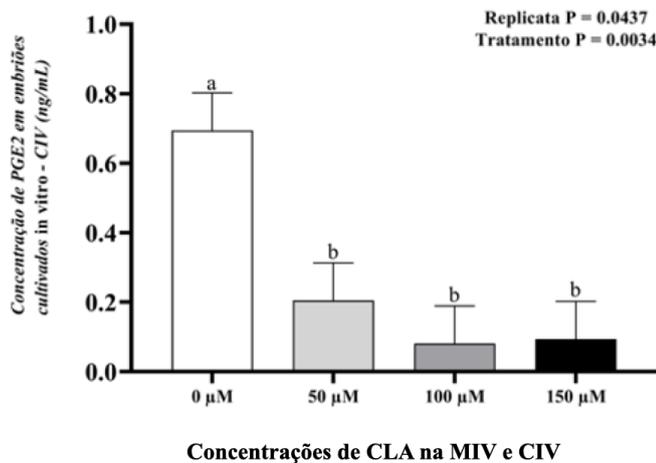
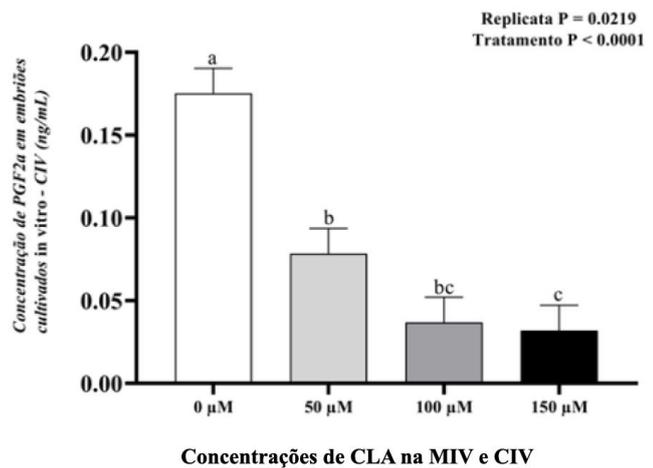
Figura 17 - Experimento 2 - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de oócitos durante a MIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA no meio de oócitos cultivados por 24 horas sem CLA mas que posteriormente foram tratados na CIV com as referidas concentrações (0, 50, 100 e 150 μ M)



Fonte: Elaborada pela autora.

Concentração de $PGF2\alpha$ e $PGE2$ no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Conforme representado na Figura 18, as concentrações de $PGF2\alpha$ foram menores ($P < 0,0001$) nos grupos 50 μM ($0,0783 \pm 1,0152$ ng/mL), 100 μM ($0,03683 \pm 0,0152$ ng/mL), 150 μM ($0,03191 \pm 0,0152$ ng/mL) comparado ao grupo 0 μM ($0,1752 \pm 0,01524$ ng/mL). A concentração de 150 μM exerceu maior inibição na síntese de $PGF2\alpha$ quando comparada a dose de 50 μM . As concentrações de $PGE2$ foram menores ($P = 0,0034$) nos grupos 50 μM ($0,2046 \pm 0,1084$ ng/mL), 100 μM ($0,0806 \pm 0,1084$ ng/mL), 150 μM ($0,0938 \pm 0,1084$ ng/mL) comparado ao grupo 0 μM ($0,6939 \pm 0,1084$ ng/mL). A razão $PGE2/PGF2$ não diferiu entre os grupos ($P = 0,1902$).

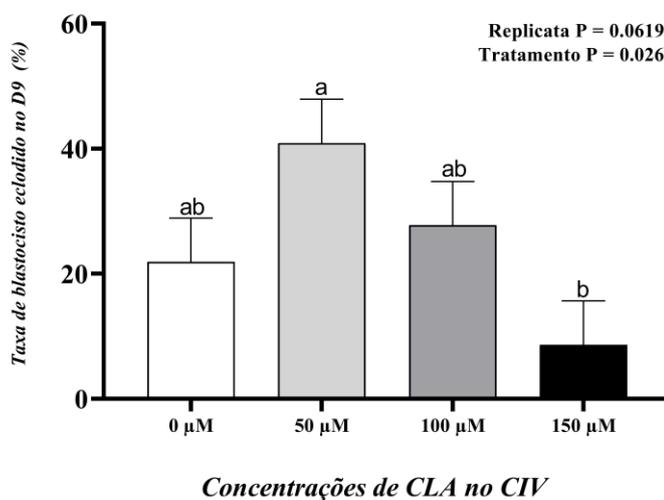
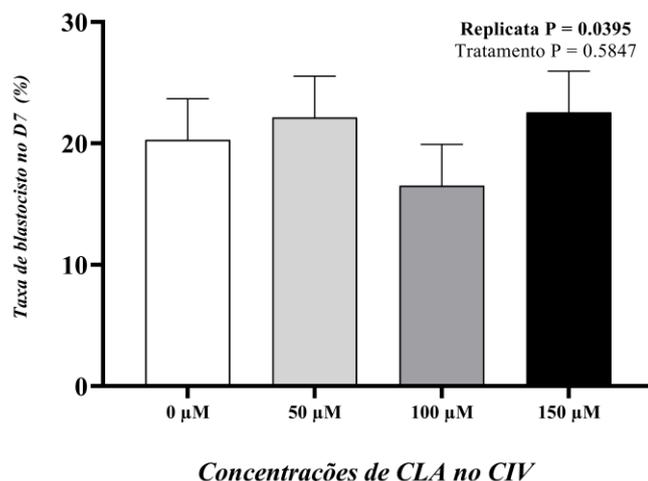
Figura 18 - Experimento 2 - Concentração de PGF2 α e PGE2 no meio de cultivo de embriões durante a CIV. Média \pm erro padrão das concentrações de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α em ng/mL; mensurada por ELISA no meio de embriões 9 dias após a fertilização (D9; término da CIV) provenientes de Meio MIV sem CLA + Meio CIV sem CLA (**Grupo CLA 0 μ M**); Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 50 μ M de CLA (**Grupo CLA 50 μ M**); Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 100 μ M de CLA (**Grupo CLA 100 μ M**) e Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 150 μ M de CLA (**Grupo CLA 150 μ M**)



Fonte: Elaborada pela autora.

Produção de blastocisto no D7 e D9. Conforme representado na Figura 19, entre os grupos não houve diferença para a taxa de blastocisto no D7 ($P = 0,5847$), contudo no D9 houve maior taxa de blastocisto no grupo tratado com 50 μM de coparado ao 150 μM ($40,8978 \pm 7,003\%$ vs. $8,6411 \pm 7,003\%$; $P = 0,4081$) embora ambos não tenham diferido do grupo 0 μM .

Figura 19 - Experimento 2 - Produção de blastocisto no D7 e D9. Média \pm erro padrão da taxa de blastocisto no D7 e taxa de blastocisto eclodido no D9 (D0 = dia da fertilização) provenientes de Meio MIV sem CLA + Meio CIV sem CLA (**Grupo CLA 0 μM**); Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 50 μM de CLA (**Grupo CLA 50 μM**); Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 100 μM de CLA (**Grupo CLA 100 μM**) e Meio MIV sem CLA + Meio CIV contendo 150 μM de CLA (**Grupo CLA 150 μM**)



Fonte: Elaborada pela autora.

7 DISCUSSÃO

No Experimento Piloto A, observou-se que oócitos cultivados por 24 horas na presença de 10% SFB (Grupo SFB MIV e CIV) quando comparados ao grupo que recebeu 2,5% de SFB apenas na CIV (Grupo SFB CIV) apresentaram maior secreção de PGF2 α (P = 0,0004), maior secreção de PGE2 (P = 0,0092) e menor razão PGE2/PGF2 α (P = 0,0281). Assim, verificou-se que oócitos cultivados com 10% de SFB durante a MIV apresentam uma maior secreção de PGF2 α e PGE2 comparado aos não tratados. No Experimento Piloto A, observou-se que embriões do grupo Grupo SFB MIV e CIV comparado ao Grupo SFB CIV, tiveram maior secreção de PGE2 (P = 0,0441), mas não foi observada diferença para a secreção de PGF2 α (P = 0,4447) e a razão PGE2/PGF2 α (P = 0,0713), embora para a razão tenha sido observada uma tendência de ter sido maior no Grupo SFB MIV e CIV. Considerando o efeito evidenciado no Grupo SFB MIV e CIV, aumento da secreção de PGF2 α e PGE2, houve a necessidade no modelo biológico de estudo, de remover os 10% de SFB rotineiramente empregado usualmente durante a MIV em produções comerciais de embriões *in vitro*. A maior produção de blastocistos no D7 observada no Grupo SFB MIV e CIV ilustra a suplementação usual em produções comerciais de embriões *in vitro* com 10% de SFB na MIV e 2,5% na CIV, por favorecer a produção de blastocistos no D7. Rios-Esteves e Resh (2013) observaram que embriões privados de SFB especialmente na MIV apresentaram um desenvolvimento celular mais lento além de maior nível de apoptose celular no D8. Mesmo tendo sido evidenciado efeito do SFB utilizado em 2,5% durante a CIV na secreção de PGE2, a produção de embriões na ausência total de SFB na CIV é bastante inviabilizada pelo baixo número de estruturas que se desenvolvem a blastocisto. Considerando que para as análises por RT-PCR que foram realizadas para um artigo complementar a este, precisaríamos ter um número suficiente de blastocistos ao final de cada repetição por grupo de tratamento, para que tivéssemos um número de estruturas que nos permitissem tal análise, não foi possível excluir totalmente o SFB durante a CIV, assim optamos pela concentração de 2,5% de SFB na CIV em todos os grupos de tratamento. Embora tal concentração tenha mostrado aumentar a síntese de PGE2, considerando que o mesmo soro foi utilizado na mesma concentração (2,5% na CIV) em todos os tratamentos, assume-se que tal efeito seria semelhante em todos os tratamentos.

No Experimento Piloto B, observou-se que quando oócitos e embriões foram cultivados com DMSO comparados aos cultivados sem DMSO, a síntese de PGF2 α , PGE2 e a razão PGE2/PGF2 α não foi alterada. Tais observações confirmam que o DMSO, diluente utilizado para o CLA, não exerce ações na secreção das prostaglandinas PGF2 α e PGE2, confirmando-se com um diluente adequado ao CLA, no modelo biológico de estudo aqui utilizado.

No Experimento 1, oócitos cultivados com as diferentes doses de CLA (50, 100 e 150 μ M) apresentaram 24 horas após o cultivo uma maior secreção de PGF2 α (P = 0,0004), menor razão PGE2/ PGF2 α (P = 0,0003) e não alterou a secreção de PGE2 (P = 0,3856). Quando os tratamentos com CLA foram aplicados na MIV e CIV, para todas às concentrações de CLA aqui testadas (50, 100 e 150 μ M), comparado ao controle (0 μ M), no meio de cultivo dos embriões no D9 observou-se uma menor secreção de PGF2 α (P < 0,0001) e PGE2 (P = 0,003), embora a razão PGE2/ PGF2 α não tenha sido (P = 0,1902).

No Experimento 2, quando os oócitos de todos os grupos de tratamento foram cultivados em meio sem SFB, 24 horas após o cultivo não diferiram a secreção de PGF2 α (P = 0,3573), PGE2 (P = 0,7086) e razão PGE2/ PGF2 α (P = 0,8594). No Experimento 2, quando o CLA foi utilizado apenas na CIV, o resultado foi semelhante, para todas às concentrações de CLA aqui testadas (50, 100 e 150 μ M), comparado ao controle (0 μ M) observou-se uma menor secreção de PGF2 α (P < 0,0005) e PGE2 (P = 0,0046), embora a razão PGE2/ PGF2 α não tenha sido (P = 0,9087).

De acordo com Moussavi *et al.* (2013), em meio de cultura de células epiteliais endometriais bovinas expostas ao cultivo com concentrações > 50 μ M de CLA por 24 horas, as concentrações de PGE2 e PGF2 α diminuíram significativamente. No presente estudo, os embriões tratados com CLA a partir da concentração de 50 μ M também apresentaram a secreção de PGE2 e PGF2 α diminuídas significativamente. Embora sejam aqui comparados dois modelos biológicos diferentes, considerando que ambos devem apresentar sinergismo no processo de RMF, tal observação mostra a similaridade de comportamento em ambos os tecidos. Em outro estudo (CHENG *et al.*, 2003), células endometriais de ovelhas foram tratadas com CLA, quando foi observado que o CLA diminuiu a síntese de PGF2 α , entretanto quando o CLA foi utilizado em concentrações menores que 20 μ M a síntese de PGE2 foi aumentada. No presente

estudo, a menor concentração utilizada foi 50 μM , onde de forma semelhante ao trabalho referenciado, observamos uma supressão na síntese de $\text{PGF2}\alpha$.

Na produção *in vitro* de embriões bovinos relatou-se que a suplementação do meio de cultivo com CLA (t10, c12 e c9, t11) não melhorou a produção de embriões, mas a inclusão de 100 μM de c9, t11 antes da vitrificação melhorou a qualidade dos mesmos após o descongelamento (ABSALÓN-MEDINA *et al.*, 2014). Em outro estudo (STINSHOFF *et al.*, 2014), observaram que a suplementação do meio de cultivo com 50 μM e 100 μM de c12, t10 não alterou a taxa de clivagem, mas reduziu a taxa de desenvolvimento dos embriões em comparação com um grupo não suplementado. Observamos no presente estudo, que as concentrações de 50 μM e 100 μM aqui testadas quando utilizadas na MIV e CIV, não alterou a produção de embriões no D7, entretanto quando o CLA foi utilizado em concentrações maiores que 100 μM , na concentração de 150 μM promoveu uma menor taxa de blastocisto eclodido no D9 quando comparado a concentração de 50 μM .

Em um estudo muito interessante (MEIER *et al.*, 2009), verificaram que quando o tecido trofoblástico foi incubado com a adição de EPA, DHA ou AL em uma concentração final de 10 μM idêntica para todos os ácidos. Após a cultura por 5 horas a 37°C não houve alteração na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 , no endométrio de fêmeas prenhes, e não prenhes no D16 e D17 e também em células trofoblásticas. No geral, tais tratamentos não tiveram efeito na liberação de PGE2 nos tecidos trofoblásticos, embora houvesse uma tendência dos ácidos graxos ômega 3 (EPA e DHA) reduzirem a liberação de PGE2 . Possivelmente, neste estudo aqui referenciado o AL não tenha promovido uma redução na síntese de prostaglandinas em decorrência do curto período de tratamento que os tecidos foram expostos, um período de tratamento de apenas 5 horas.

Recentemente um estudo do grupo (LOURENÇO, 2022), foi realizada 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). Foi observado que células trofoblásticas tratadas com CLA (10, 20, 50 e 100 μM) tiveram uma redução na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ com 24, 48 e 72 horas de cultivo comparado ao controle (0 μM). Também, observou-se que a razão $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$ 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 $\text{PGF2}\alpha$ e PGE2 . No presente estudo realizado com embriões, o CLA apresentou ação similar nos embriões e nas células trofoblásticas tratadas, onde reduziu a síntese de $\text{PGF2}\alpha$. Nos embriões a razão $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$ não foi aumentada, o que foi evidenciado nas células trofoblásticas.

Sabendo que o ácido linoléico é o ácido graxo mais abundante no fluido folicular bovino, Marei *et al.* (2010) investigaram o efeito da suplementação com AL na maturação oocitária bovina e no desenvolvimento inicial do embrião *in vitro*. O tratamento de complexos *cumulus*-oócitos (COCs) com diferentes concentrações de AL (50, 100 e 200 μM) por 24 horas, inibiu significativamente a expansão das células *cumulus* e retardou o desenvolvimento dos oócitos para o estágio de metáfase II (MII) de maneira dose-dependente. A suplementação do meio de maturação de oócitos com AL em todas as concentrações não teve nenhum efeito significativo na produção de $\text{PGF2}\alpha$ pelos COCs, porém na dosagem de 100 μM de AL resultou em um aumento significativo na concentração de PGE2 e na razão $\text{PGE2}/\text{PGF2}\alpha$. O tratamento de COCs com 100 μM de AL também resultou em uma porcentagem significativamente menor de embriões clivados e produção de blastocistos, enquanto que 50 μM de AL não tem conseguido um efeito estatisticamente significativo na taxa de clivagem, porém menor taxa de blastocisto foi observada em comparação com o controle. Esses dados fornecem evidências de efeitos adversos do AL no desenvolvimento do oócito, que podem estar associados ao aumento do nível dietético de AL no fluido folicular.

Suplementação de ácidos graxos na dieta de vacas *Bos indicus* e *Bos Taurus*, foi realizada por Cooke (2019), o qual investigou os impactos da suplementação de sais de Ca do óleo de soja (CSSO), fonte de ácidos graxos (AGs) ômega-6 no desempenho reprodutivo. Este trabalho demonstrou que a suplementação de CSSO pós-IA favorece a incorporação de ácidos graxos ômega-6 em tecidos maternos e embrionários, o que aumenta a síntese de interferon-tau pelo concepto, aumentando as taxas de prenhez na IATF. Enquanto que com o objetivo de estudar a comunicação embrião-materna e os fatores do fluido uterino (FU), Giller *et al.* (2018) suplementaram novilhas da raça Angus com óleo de peixe protegido no rúmen (ácido graxo ômega 3) ou óleo de girassol (ácido graxo ômega 6) por um período de 8 semanas. Após a sincronização do ciclo e IA, os úteros foram lavados *post mortem* para recuperar os embriões no 15º dia de

gestação, amostras de tecido de endométrio e corpo lúteo (CL). Surpreendentemente, o alongamento do embrião no grupo ômega 3 foi maior em comparação com o grupo ômega 6. Não foram observadas diferenças nas prostaglandinas uterinas, embora a concentração endometrial de seu precursor ácido araquidônico tenha sido reduzida em ômega 3 em comparação com ômega 6. Os ácidos graxos dietético não levou a expressão diferencial de genes-alvo no endométrio nem CL, nem a uma abundância diferencial de colesterol de lipoproteína de baixa densidade, cortisol ou aminoácidos no FU. Curiosamente, o grupo ômega 3 apresentou uma maior concentração plasmática de progesterona durante o crescimento lúteo do que o grupo ômega 6, possivelmente promovendo o alongamento do embrião.

Para a biossíntese de PGE₂, há a transformação sequencial de ácido araquidônico em PGH₂ por ciclooxigenases (COXs), depois a conversão de PGH₂ em PGE₂ por prostaglandinas E sintases (PGESs). Análises de RT-PCR quantitativo foi usado por Sainte-Dizer *et al.* (2011) para examinar a expressão de mRNAs de COX-1, COX-2, PGES-1 microssomal (mPGES-1), PGES-2 microssomal (mPGES-2) e PGES citosólico (cPGES) em embriões produzidos *in vitro* (PIV). Transcritos para COX-2 e mPGES-1 foram detectados em todos os embriões, enquanto transcritos para COX-1 e mPGES-2 não foram detectados e cPGESs estavam no limite de detecção em 40% dos embriões. Os níveis de mRNAs de COX-2 e mPGES-1 foram significativamente maiores em blastocistos e blastocistos expandidos do que em mórulas e blastocistos iniciais. Além disso, embriões de excelente qualidade (grau 1) apresentaram níveis mais altos de COX-2 e mPGES-1 do que embriões de qualidade boa e média (graus 2–3). Os resultados sugeriram que embriões bovinos PIV nos estágios de mórula e blastocisto usam exclusivamente a via COX-2/ mPGES-1 para a biossíntese de PGE₂, e que a PGE₂ está potencialmente envolvida na expansão do blastocisto e na competência de desenvolvimento.

A expressão de genes que demonstram potencial de desenvolvimento difere entre embriões clivados precoce ou tardiamente. Suwik *et al.* (2020) determinaram o perfil de expressão de mRNA de genes importantes para o desenvolvimento (IGF1R, IGF2R, PLAC8, OCT4, SOX2) em blastocistos iniciais, expandidos e eclodidos obtidos do grupo de embriões com clivagem precoce e tardia, bem como correlacionar os níveis de transcrição desses marcadores de genes embrionários com os níveis de transcrição de PGFS e PTGFR. As taxas de qualidade e desenvolvimento foram realizado de

acordo com o IETS. Dentro do grupo de clivagem precoce e tardia, dividiram em blastocistos precoces, blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos, onde cada estágio foi sub-divididos de acordo com a qualidade da seguinte forma: grau A - excelente; grau B - regular; grau C - ruim e grau D – degenerado. A expressão de mRNA de PGFS, PTGFR e fatores descritos como genes marcadores de capacidade de implantação embrionária e genes de competência de desenvolvimento foi determinada por PCR em tempo real. Observaram que a abundância de transcrição da maioria dos genes analisados tende a ser maior em embriões tardios, em vez de no grupo de embriões clivados precocemente, bem como em embriões de grau B e/ou C em vez de embriões de grau A. Por outro lado, para o grupo de clivagem precoce de blastocistos, detectaram maior expressão de mRNA para grau A, comparados com embriões grau C. Isso sugere que o nível de expressão do mRNA de genes depende da qualidade dos embriões, mas difere de acordo com vários fatores, incluindo o método de produção ou método de cultura. Anteriormente, demonstraram que a PGF2 α sintase (PGFS) e a expressão do receptor de PGF2 α (PTGFR) depende do estágio de desenvolvimento e da qualidade do embrião, além de que, numerosas correlações entre marcadores gênicos analisados e PGF2 α sintase e receptor PGF2 α sugerem que a PGF2 α desempenha um papel crucial nas etapas do desenvolvimento do embrião bovino.

Em complemento a este estudo, torna-se de nosso interesse, verificar o efeito do CLA na abundância dos transcritos envolvidos na síntese de PGE2 e PGF2 α por RT-PCR. Tais análises já finalizadas e analisadas estatisticamente irão ser inseridas no artigo que será publicado que contempla em parte esta dissertação.

8 CONCLUSÃO

A suplementação com CLA, em todas as doses testadas, durante a MIV e CIV ou exclusivamente na CIV diminui nos embriões a secreção de PGE2 e PGF2 α embora não tenha alterado a razão PGE2/PGF2 α . O uso de CLA na CIV na concentração de 150 μ M diminui a taxa de blastocisto eclodido no D9 comparado a concentração de 50 μ M.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARDEMA, H.; VOS, P. L. A. M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A. J.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biol. Reprod.**, [S.l.], v. 85, p. 62–9, 2011.
- ABSALÓN-MEDINA, V. A.; BEDFORD-GUAUS, S. J.; GILBERT, R. O.; SIQUEIRA, L. C.; ESPOSITO, G.; SCHNEIDER, A.; CHEONG, S. H.; BUTLER, W. R. The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 on *in vitro* bovine embryo production and cryopreservation. **J. Dairy Sci.**, [S.l.], v. 97, p. 6164–6176, 2014.
- AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M. H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, [S.l.], v. 93, p. 30–36, 2010.
- ANUALPEC 2021. São Paulo: Informa Economics FNP, 2021.
- AROSH, J. A.; BANU, S. K.; MCCRACKEN, J. A. Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. **J Dairy Sci.**, [S.l.], v. 99, p. 5926-5940, 2016.
- ASBIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Relatório INDEX ASBIA. 2021. Uberaba, MG.
- ASHWORTH, C. J.; BAZER, F. W. Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. **Biology of Reproduction**, [S.l.], v. 40, p. 425-433, 1989.
- ATELLA, G. C.; MAJEROWICZ, D.; GONDIM, K. C. **Metabolismo de lipídeos**. [S.l.]: Instituto de Bioquímica Médica, 2012.
- 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.
- BERTEVELLO, P. S.; TEIXEIRA-GOMES, A. P.; SEYER, A.; VITORINO CARVALHO, A. V.; LABAS, V.; BLACHE, M. C.; BANLIAT, C.; CORDEIRO, L. A. V.; DURANTHON, V.; PAPILLIER, P.; MAILLARD, V.; ELIS, S.; UZBEKOVA, S. Lipid identification and transcriptional analysis of controlling enzymes in bovine ovarian follicle. **Int. J. Mol. Sci.**, [S.l.], v. 19, p. 3261, 2018.
- 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.
- CARRO, M.; BUSCHIAZZO, J.; RIOS, G. L.; ORESTI, G. M.; ALBERIO, R. H. Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. **Theriogenology**, [S.l.], v. 79, p. 687-694, 2013.
- CHENG, Z.; ELMES, M.; ABAYASEKARA, D. R. E.; WATHES, D. C. Effects of conjugated linoleic acid on prostaglandins produced by cells isolated from maternal

intercotyledonary endometrium, fetal allantochorion and amnion in late pregnant ewes. **Biochim Biophys Acta**, [S.l.], v. 1633, p. 170–178, 2003.

COOKE, R. F. Early career achievement award: supplementing omega-6 fatty acids to enhance early embryonic development and pregnancy establishment in *Bos indicus* and *B. taurus* beef cows. **J. Anim. Sci.**, [S.l.], v. 97, p. 485–495, 2019. DOI 10.1093/jas/sky414

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.

COSTA, R. L. D.; FONTES, R. S. Ácidos graxos na nutrição e reprodução de ruminantes. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 24, ed. 129, art. 873, 2010.

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

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

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

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

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

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

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

GILLER, K.; DREWS, B.; BERARD, J.; KIENBERGER, H.; SCHMICKE, M.; FRANK, J.; SPANIER, B.; DANIEL, H.; GEISSLINGER, G.; ULBRICH, S. E. Bovine embryo

elongation is altered due to maternal fatty acid supplementation. **Biology of Reproduction**, [S.I.], v. 99, n. 3, p. 600–610, DOI 10.1093/biolre/iy084, 2018.

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

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

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

HILLMAN, N.; FLYNN, T. J. The metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation mouse embryos developing in vitro. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, [S.I.], v. 56, p. 157-168, 1980.

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

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

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

KARAŞAHİN, T.; ARIKAN, S. The effect of oleic and linoleic acids on *in vitro* bovine embryonic development and embryo quality. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, [S.I.], v. 39, p. 154–159, 2015.

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

KIRFEL, G.; KOMNICK, H. Differential absorption and esterification of dietary long-chain fatty acids by larvae of the dragonfly, *Aeshna cyanea*. **Physiol.**, [S.I.], v. 40, p. 183–193, 1999.

LEROY, J.L.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes *in vitro* **Reproduction**, [S.I.], v. 130, p. 485-495, 2005.

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

LEWIS, G. S.; WATERMAN, R. A. Effects of endometrium on metabolism of arachidonic acid by bovine blastocysts. **Prostaglandins**, [S.I.], v. 25, p. 881–889, 1983.

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

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

LOPES, C. N.; COOKE, R. F.; REIS, M. M.; PERES, R. F. G.; VASCONCELOS, J. L. Suplementação estratégica de ácidos graxos poliinsaturados protegidos no rúmen para melhorar o desempenho reprodutivo de vacas de corte *Bos indicus*. **J. Anim. Ciência**, [S./], v. 89, p. 3116–3124, 2011. DOI 10.2527/jas.2011–3909

LOPES, C. N.; SCARPA, A. B.; CAPPELLOZZA, B. I.; COOKE, R. F.; VASCONCELOS, J. L. Efeitos da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados protegidos no rúmen sobre o desempenho reprodutivo de vacas de corte *Bos indicus*. **J. Anim. Ciência**, [S./], v. 87, p. 3935–3943, 2009. DOI 10.2527/jas.2009-2201

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

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

MAREI, W. F.; WATHES, D. C.; LOULADI-NASHTA, A. A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, [S./], v. 139, p. 979–988, DOI 10.1530/REP-09-0503, 2010

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, [S./], v. 69, p. 780-787, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

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. 1072–1081, 2013.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Development, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, [S.l.], v. 62, p. 320-327, 2002.

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.

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.

SAINTE-DIZIER, M.; GRIMARD, B.; GUYADER-JOLY, C.; HUMMBLOT, P.; PONTER, A. A. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in bovine in vitro-produced embryos. **Zygote**, [S.l.], p. 277–283, 2011. DOI 10.1017/S0967199410000596. 2011.

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

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

SATORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MARTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, [S./], v. 85, n. 11, p. 2803-2812, 2002.

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./], v. 73, p. 215-226, 2004.

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

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal Animal Science**, [S./], 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./], 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./], v. 19, p. 65-78, 2007.

STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BOLLWEIN, H.; WRENZYCKI, C. Dimethylsulfoxide and conjugated linoleic acids affect bovine embryo development in vitro. **Reprod Fertil Dev**, [S./], v. 26, p. 502-510, 2014.

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

SUWIK, K.; BORUSZEWSKA, D.; SINDEREWICZ, E.; KOWALCZYK-ZIEBA, I.; STASZKIEWICZ-CHODOR, J.; WOCLAWEK-POTOCKA, I. Expression profile of developmental competence gene markers in comparison with prostaglandin F2α synthesis and action in the early- and late-cleaved pre-implantation bovine embryos. **Reprod. Dom. Anim.**, [S./], v. 56, p. 437–447, 2020. DOI 10.1111/rda.13880

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./], v. 78, p. 279-290, 2005.

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

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, [S. l.], v.56, p. 1435-1440, 2001.

TOMINAGA, K.; SHIMIZU, M.; OYOYAMA, S.; IZAIKE, Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16-cell embryos. **Theriogenology**, [S. l.], v. 53, p. 1669–80, 2000.

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

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

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.

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.

WHITE, H. M.; KOSER, S. L.; DONKIN, S. S. Gluconeogenic enzymes are differentially regulated by fatty acid cocktails in Madin-Darby bovine kidney cells. **J. Dairy Sci.**, v. 95, p. 1249-1256, 2012. DOI 10.3168/jds.2011-4644

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

YA, R.; DOWNS, S. M. Suppression of chemically induced and spontaneous mouse oocyte activation by AMP-activated protein kinase. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 88, p. 1-11, 2013.