

Efeitos epigenéticos do Beta-hidroxibutirato sobre oócitos, embriões e órgãos reprodutivos

Epigenetic effects of beta-hydroxybutyrate on oocytes, embryos, and reproductive organs

Edna de Fátima Elias Macule¹, Flávio Vieira Meirelles², Juliano Rodrigues Sangalli²

¹School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brazil

Resumo

O aumento da produção de leite nas vacas leiteiras modernas causou uma diminuição da fertilidade. Dentre as diversas situações consideradas como causadoras, o estresse metabólico é uma das mais importantes. O gasto energético para produzir o leite não é adequadamente suprido pela dieta fazendo com que estas entrem em balanço energético negativo e posteriormente cetose. A cetose é marcada pelo aumento do corpo cetônico beta-hidroxibutirato (BHB) no sangue. Recentemente o BHB foi descoberto como potente modificador epigenético, e seus efeitos sobre o epigenoma do oócito e do embrião começaram a ganhar atenção da comunidade científica, embora ainda de maneira incipiente. Desta maneira, nesta revisão, nós focamos em revisar a literatura corrente, com ênfase nos artigos que ilustram os papéis epigenéticos do BHB em ovário, oviduto e útero, os 3 órgãos cruciais para a reprodução em mamíferos, com o intuito de encontrar soluções para mitigar estes problemas. Os estudos revisados aqui mostram estes novos papéis epigenéticos causados pelo BHB e fornecem indicativo dos mecanismos pelos quais os oócitos e embriões são afetados. Como perspectiva futura, o uso de dietas que impeçam as vacas de entrar em cetose pós-parto ou suplementos nos laboratórios de produção *in vitro* ajudarão a reestabelecer a fertilidade.

Palavras-chave: Cetose, beta-hidroxibutirilização, epigenética, vacas de leite, embrião.

Abstract

*The increase in milk production in modern dairy cows has been associated with a decline in fertility. Among the various contributing factors, metabolic stress is one of the most important. The energy expenditure for milk production is not adequately met by the cow's diet, causing them to enter in a state of negative energy balance and subsequently ketosis. Ketosis is marked by an increase in the ketone body beta-hydroxybutyrate (BHB) in the blood. Recently, the BHB has been identified as a potent epigenetic modifier, and its effects on the epigenome of oocytes and embryos have begun to attract attention from the scientific community, although still in a relatively early stage. Therefore, in this review, we focus on the current literature, with an emphasis on studies that illustrate the epigenetic roles of BHB in the ovary, oviduct and uterus - the three crucial organs for the reproduction in mammals - with the aim of identifying strategies to mitigate these problems. The studies reviewed here highlight these emerging epigenetic roles of BHB and provide insight into the mechanisms by which oocytes and embryos are affected. As a future perspective, the use of diets that prevent cows from entering postpartum ketosis, as well as supplementation strategies in *in vitro* production systems, may help restore fertility.*

Key-words: Ketosis, beta-hydroxybutyrylation, epigenetics, dairy cows, embryo.

Introdução

O corpo cetônico beta-hidroxibutirato (BHB) é sintetizado no fígado a partir de ácidos graxos quando o organismo tem um déficit energético, tais como em períodos de privação de nutrientes, exercício intenso e em vacas leiteiras no pico da lactação (Foster, 1988; Puchalska; Crawford, 2017). Após a síntese hepática, o BHB é enviado para a corrente sanguínea para ser utilizado como fonte de energia em tecidos periféricos. Na mitocôndria dos tecidos extra-hepáticos, ele é oxidado para produzir ATP e suprir o organismo enquanto persiste esse déficit energético (Newman; Verdin, 2017).

Enquanto o BHB evoluiu para ser uma molécula protetora nesses estados de fome, a elevação sérica desta molécula tem sido implicada na redução da fertilidade em mamíferos (rutherford; oikonomou;

*Correspondência: julianors@usp.br

Recebido: 20/10/2024

Aceito: 05/05/2026

smith, 2016). Curiosamente, estudos recentes identificaram que o BHB, além destes papéis canônicos, também atua como um potente modificador epigenético (Ruan; Crawford, 2018). Ele foi primeiramente descoberto ser um potente inibidor das histonas desacetilases, enzimas que removem o radical acetil das histonas, deste modo causando hiperacetilação (Shimazu *et al.*, 2013). Posteriormente, foi descoberto causar diretamente uma marca epigenética, a beta-hidroxibutirilação, onde o BHB ao invés de ser convertido em energia, doa o radical para enzimas acil-transferases adicioná-lo nas histonas (Xie *et al.*, 2016). Este aumento nas marcas epigenéticas acetilação e beta-hidroxibutirilação regulam a expressão gênica e podem explicar alguns dos mecanismos pelos quais a fertilidade das vacas é comprometida na cetose. Desta maneira, nesta revisão, nós focamos em revisar a literatura corrente, com ênfase nos artigos que ilustram os papéis epigenéticos do BHB em ovário, oviduto e útero, os 3 órgãos cruciais para a reprodução em mamíferos, com o intuito de encontrar soluções para mitigar estes problemas.

A vaca de leite moderna e seus problemas de fertilidade

Nos últimos 50 anos tem sido observada uma dramática redução na fertilidade das vacas leiteiras. A seleção genética para o aumento da produção leiteira, fez com que as vacas passassem a sofrer cada vez mais com problemas metabólicos, que secundariamente afetam a reprodução (Lucy, 2001). Isso porque a enorme quantidade de energia que elas gastam para produzir o leite não é suprida pela ingestão da ração por estas. Sendo assim as vacas entram numa situação conhecida como balanço energético negativo (Herd, 2000). Nessa condição, elas mobilizam ácidos graxos do tecido adiposo, os quais são convertidos em ácidos graxos não esterificados e corpos cetônicos no fígado. Isto causa uma elevação sérica nos níveis de corpos cetônicos no sangue (predominantemente o BHB), e causa uma condição patológica conhecida como cetose (Foster, 1988). A cetose é implicada na redução da fertilidade das vacas, assim como também é associada com o surgimento de outras enfermidades, como torção de abomaso, metrite, retenção de placenta, entre outras (duffield, 2000; rajala-schultz; Gröhn; McCulloch, 1999; Wathes *et al.*, 2007).

Visto que o BHB é usado por todos os tecidos periféricos, a redução da taxa de concepção das vacas pode ser devido aos seus efeitos nos mais variados órgãos. Porém, aqui nós focaremos em órgãos diretamente envolvidos na reprodução como o oviduto, o ovário e o útero.

O ovário metabolicamente estressado e seu papel no desenvolvimento oocitário.

O ovário é um órgão que desempenha papel crucial na reprodução em mamíferos. Ele é responsável pela produção dos oócitos, assim como pela secreção dos hormônios sexuais, como o estrogênio e a progesterona.

Com estas mais diversas funções em mente, a cetose em vacas leiteiras pode afetar a fertilidade através da 1-) desregulação endócrina ovariana (Wathes *et al.*, 2007) ou 2-) diretamente influenciando o processo de produção dos oócitos (Leroy *et al.*, 2008a, 2008b).

De fato, vacas leiteiras apresentando cetose tem mais dificuldade em retomar a função ovariana (ciclo estral) após o parto em relação a vacas sadias (Rutherford; Oikonomou; Smith, 2016; Wathes *et al.*, 2007). Em um estudo visando investigar o efeito da hipercetonemia sobre os níveis de estrogênio e progesterona, observou-se que níveis elevados de BHB reduziram os níveis de beta-estradiol e a fertilidade (Pishvaei; Karimi Dehkordi; Nazem, 2021). Corroborando estes dados, outro estudo observou que, vacas cetóticas também apresentam menor taxa de concepção no primeiro serviço, quando comparadas a vacas com níveis basais de BHB (Walsh *et al.*, 2007). Outro mecanismo pelo qual o balanço energético negativo afeta a duração do período anovulatório pós-parto é por meio da atenuação dos pulsos de LH e dos baixos níveis de glicose, insulina e IGF-1 no sangue, que, em conjunto, limitam a produção de estrogênio pelos folículos dominantes (Butler, 2003). Isto sugere que o oócito desenvolvido neste ambiente cetótico está comprometido (Leroy *et al.*, 2008a), assim como também a receptividade uterina, visto que os hormônios se encontram alterados.

Apesar destas observações experimentais in vivo demonstrarem efeito adverso do BHB sobre a fertilidade, estes estudos são apenas baseados em correlações, e não demonstram um efeito direto do BHB na redução da competência oocitária. Isto porque na condição de balanço energético negativo, várias outras moléculas como a glicose e os ácidos graxos não-esterificados (NEFAs) são alterados nas vacas, e estes sabidamente comprometem o oócito (Van Hoeck *et al.*, 2011).

Suportando estas observações, estudos in vitro adicionando altas concentrações (mimetizando a cetose clínica severa – 6mM) de BHB durante a maturação oocitária não afetou a sua taxa de maturação, nem a capacidade destes oócitos se desenvolverem até o estágio de blastocisto (Sangalli *et al.*, 2018, 2022). Quando estes complexos cumulus-oócito foram corados para observar a modificação epigenética beta-

hidroxibutirilização, as células do cumulus apresentavam um grande aumento, enquanto nos oócitos, foi observado um sinal quase ausente, indicando que de certa maneira o cumulus tem um efeito de escudo, provavelmente consumindo o BHB ou impedindo que este se difunda até o oócito para protegê-lo (Sangalli *et al.*, 2022). Em um outro estudo *in vitro*, altas concentrações de BHB somente comprometeram o desenvolvimento oocitário, quando combinados com baixos níveis de glicose (Leroy *et al.*, 2006). Isto demonstra que várias moléculas precisam estar alteradas (como exemplos: baixa glicose, altos níveis de NEFAS, baixos níveis de hormônios) no microambiente que o oócito se desenvolve, para comprometer a qualidade do gameta, e não somente o BHB.

No entanto, estudos *in vitro* como estes mencionados, a exposição ao BHB é curta (~24 horas), enquanto que *in vivo* a exposição é crônica, podendo durar até meses. Sendo assim, modelos *in vitro* não claramente recapitulam o que acontece na vaca em cetose. Adicionalmente, folículos em crescimento, como exemplo os pré-antrais, são transcricionalmente ativos, tornando os mais suscetíveis a estressores ambientais que desregulam o epigenoma e a transcrição (Britt, 1992; Leroy *et al.*, 2015).

Outras questões importantes ainda a serem investigadas são os efeitos epigenéticos do BHB no ovário. Até o presente momento, poucos estudos têm efetivamente mostrado um efeito direto. Em um estudo foi demonstrado altos níveis da marca epigenética beta-hidroxibutirilização em ovários de vacas, mas sem relatar qualquer mecanismo molecular subjacente (Sangalli *et al.*, 2022). Em um segundo relato, foi observado que o tratamento de camundongos com a droga para o tratamento de diabetes metformina causou proliferação de células-tronco da linhagem germinativa feminina através da ativação do gene GATA2 em ovários de camundongos, mediada pela beta-hidroxibutirilização (Wang *et al.*, 2023). Estes dados evidenciam efeitos epigenéticos no ovário. Estes achados demonstram a necessidade de estudos futuros investigando os efeitos epigenéticos do BHB nos ovários para elucidar a problemática da cetose.

O oviduto metabolicamente estressado e seu papel no desenvolvimento embrionário

O oviduto é uma parte do sistema reprodutor feminino cuja função principal é transportar os oócitos dos ovários, e nas porções mais distais, nutrir e transportar os embriões iniciais para o útero (Avilés; Coy; Rizos, 2015). Em camundongos e em ovelhas, a privação de nutrientes leva a um aumento na concentração de BHB no fluido oviductal, secreção que nutre os embriões iniciais (Tripathi *et al.*, 2016; Whatley; Harvey; Gardner, 2024).

Desta maneira, os embriões iniciais, que possuem intensa atividade de enzimas remodeladoras de cromatina (Fleming *et al.*, 2018; Kwong *et al.*, 2000), podem ter o seu desenvolvimento afetado enquanto transitam e são nutridos por esta secreção com elevada concentração de BHB. De fato, ovelhas submetidas a subnutrição durante o período de superovulação e desenvolvimento embrionário inicial produziram um menor número total de embriões, e dentre estes recuperados, um maior número de embriões não viáveis quando comparadas com ovelhas bem nutridas (Abecia *et al.*, 2014). Estes efeitos podem ser atribuídos a perturbação da homeostase endócrina, do microambiente oviductal e também da qualidade oocitária.

De modo semelhante, camundongos submetidos a dieta cetogênica, apresentaram níveis alterados de nutrientes no oviduto, dentre eles, uma elevada concentração de BHB no oviduto. Após o flushing uterino foi observado retardo no desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Além disso, houve uma redução na marca epigenética H3K27ac nas células do trofotoderma, mostrando que o BHB é capaz de alterar marcas epigenéticas cruciais para o desenvolvimento adequado (Whatley; Harvey; Gardner, 2024).

Estes dados mostram que a elevação do BHB causada por privação de nutriente ou dieta cetogênica afeta o desenvolvimento embrionário inicial, e como vacas leiteiras sofrem de cetose no pós-parto, este pode ser um dos mecanismos que explica limitada competência em estabelecer gestações.

O útero metabolicamente estressado e seu papel no desenvolvimento embrionário.

O útero desempenha um papel essencial na reprodução, sendo o local onde o embrião se implanta após chegar do oviduto, e onde o feto se desenvolve durante a gestação até o momento do nascimento.

Os embriões iniciais quando chegam no útero são nutridos pelo fluido uterino (Hugentobler *et al.*, 2008; Jordan *et al.*, 1983). Em ovelhas submetidas a estresse metabólico, foi observado um aumento substancial nos níveis de BHB no fluido uterino (Tripathi *et al.*, 2016). Os embriões atingem o útero aproximadamente 5 dias após a fertilização. Neste momento os embriões estão passando por processos muito importantes, como a formação do blastocelo, especificação das linhagens celulares (massa celular interna e trofotoderma), e troca para a fosforilação oxidativa (Fleming *et al.*, 2018). Desta maneira, a composição alterada do fluido uterino pode comprometer o desenvolvimento embrionário (Velazquez *et*

al., 2023; Velazquez; Fleming; Watkins, 2019). De fato, vacas que possuem níveis sanguíneos elevados de BHB durante os 7 primeiros dias após a inseminação apresentam embriões com desenvolvimento retardado. Após a lavagem uterina, em vacas com elevados níveis de BHB embora sejam recuperados números semelhantes de embriões em relação a vacas com níveis fisiológicos de BHB, a proporção de mórulas/blastocistos é maior nas vacas com BHB alto, indicando um atraso no desenvolvimento embrionário (Chaput; Sirard, 2020). Além disso, estes embriões apresentam inúmeras alterações epigenéticas, como padrões anormais de metilação no DNA. Isto culminou com alterações transcricionais, como desregulações em genes mitocondriais, genes envolvidos no metabolismo da glicose e lipogênese, crescimento mais lento e ativação de mecanismos protetores como a autofagia. Estas alterações sugerem que embriões expostos a altos níveis de BHB no ambiente materno sofrem modificações na expressão gênica que provavelmente são adaptações ao déficit energético sinalizado pelo útero (Chaput; Sirard, 2020).

Modelos *in vitro* utilizando células endometriais também são úteis para mostrar os efeitos epigenéticos do BHB, e potencialmente fornecer mecanismos pelos quais o útero é alterado *in vivo*. Células epiteliais endometriais quando cultivadas na presença de BHB aumentaram os níveis globais de H3K9me3, uma marca epigenética repressiva presente na heterocromatina. Quando combinados com os ácidos graxos não esterificados, o tratamento com BHB também levou alteração nos níveis da enzima DNMT1 (DNA metiltransferases 1), que é essencial para manter os níveis de metilação do DNA após cada ciclo celular. Estes achados ilustram um potencial mecanismo pelo qual o BHB enriquecido no fluido uterino pode desregular o seu padrão de expressão gênica (Ferst *et al.*, 2021).

Modelos *in vitro* para estudar o efeito epigenético do BHB sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

Modelos *in vitro* são adequados pelo fato do efeito do BHB poder ser isolado dos demais compostos que são alterados em situações de cetose, como exemplos os ácidos graxos não-esterificados, insulina, glucagon, glicose, entre outros (Baird, 1982).

Experimentos *in vitro* mimetizando a cetose em camundongos mostraram que a adição de BHB durante o cultivo *in vitro* causou retardo no desenvolvimento embrionário começando já no processo de singamia (Whatley *et al.*, 2022, 2023). Além disso, comparado aos embriões controle, embriões tratados com BHB tinham redução no número total de células e também células do trofotoderma. Estes embriões também apresentaram várias anormalidades metabólicas, como aumento na produção de lactato e no fluxo glicolítico, e uma redução no consumo de glicose. Após a transferência destes embriões expostos ao BHB *in vitro* para camundongas receptoras foi observado nas taxas de implantação. Comparado aos embriões controle, houve uma redução de 50% na taxa de implantação. Após a coleta e mensuração, os fetos previamente expostos ao BHB tinham menor tamanho e suas placentas tinham menor diâmetros que as placentas controle (Whatley *et al.*, 2022). Estes dados mostram que o tratamento durante o cultivo *in vitro* levou a sequelas que perduraram durante todo o desenvolvimento embrionário.

Em bovinos, o tratamento de embriões com BHB em níveis mimetizando cetose clínica severa também causou retardo no desenvolvimento embrionário, menor número de células totais e produção de blastocistos após fertilização *in vitro*, alteração na marca epigenética derivada do BHB – beta-hidroxibutirilação –, assim como inúmeras alterações transcricionais, como desregulação de genes envolvidos na formação do epiblasto, do coração, implantação e proliferação (Sangalli *et al.*, 2025). Se este efeito também acontece em vacas leiteiras em cetose é objeto para estudos futuros. Porém estes dados mostram que embriões de mamíferos são sensíveis e tem seu desenvolvimento afetado na presença de BHB.

Com relação a outros modelos *in vitro*, eles são ainda incipientes e dependem principalmente da evolução e do desenvolvimento de organóides de ovário, oviduto e útero. Com relação a modelos *in vitro*, o ovário é um órgão complexo, heterogêneo, contendo células da granulosa, da teca, oócitos, folículos em crescimento, estroma, matriz extracelular e infiltrado de células imune. Reproduzir essa interação é difícil porque cada tipo celular responde a sinais distintos, precisa de um arcabouço 3D, alterações hormonais dinâmicas, entre outras coisas. Atualmente os organóides de ovário se resumem em grande parte a uma única população de células e principalmente utilizados nos estudos de câncer. O desenvolvimento de estruturas que recapitulam o ovário ajudará na criação de modelos para estudar o efeito do BHB sobre o desenvolvimento oocitário e alterações endócrinas (Gómez-Álvarez *et al.*, 2025).

O útero é um órgão mais simples de modelar comparado ao ovário, e existem vários modelos usando cultivo de células endometriais para estudar os efeitos do BHB e dos NEFAs *in vitro*, elucidando assim alterações moleculares causadas pelos metabólitos do balanço energético negativo (BEN). A suplementação de células epiteliais endometriais de vacas com BHB e NEFAs causou acúmulo de lipídeos,

aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e alteração na marca epigenética repressora H3K9me3, mostrando que os metabólitos do BEN podem afetar o metabolismo e epigenoma uterino (Ferst *et al.*, 2021). Os organóides uterinos estão sendo desenvolvidos, e cada vez mais complexos e recapitulando todas as características do útero (Fitzgerald *et al.*, 2019). O uso deles em pesquisas envolvendo nutrição e reprodução será de grande valia para os cientistas interessados nestes assuntos.

O oviduto também é um órgão relevante, pois o desenvolvimento embrionário inicial ocorre nesta estrutura. E é justamente esse um dos períodos onde os embriões são mais suscetíveis a qualquer tipo de estresse. Neste momento ocorre intensa reprogramação celular mediada pelas enzimas epigenéticas, sendo estas suscetíveis a variações nas concentrações de metabólitos. Um grande número de organóides e esferóides de oviduto têm sido gerados, e estão sendo utilizados para o estudo de comunicação materno-embriônica, assim como outros tipos de insultos, como o estresse térmico (Lawson *et al.*, 2023). Como a estrutura interna desse órgão é composto basicamente de células epiteliais ciliadas, o cultivo temporário e a execução de experimentos tornam-se exequíveis.

Estes dados apresentados acima mostram o potencial do uso dos organóides para investigar problemas que afetam a reprodução dos mamíferos e também para o uso combinado com as tecnologias de reprodução assistida, fornecendo ambientes mais próximos aos fisiológicos para gametas e embriões.

Considerações finais

A indústria leiteira moderna na busca pelo aumento na produção de leite causou distúrbios metabólicos cada vez mais frequentes nos rebanhos e isto diminui muito a fertilidade. O balanço energético negativo e a cetose resultante são implicados nesta redução e precisam ser estudados profundamente a nível molecular. Os estudos revisados aqui mostram estes novos papéis epigenéticos causados pelo BHB e fornecem indicativo dos mecanismos pelos quais os oócitos e embriões são afetados.

No entanto, o conhecimento ainda limitado das metodologias necessárias para estabelecer sistemas de cultura de organóides em animais domésticos tem atrasado o avanço e aplicação destas tecnologias nos animais de produção. Há ainda outros problemas que dificultam seu amplo uso, como o alto custo dos fatores de crescimento necessários para desenvolver os organóides, e também para analisar o epigenoma de gametas, embriões e tecidos reprodutivos, visto que estas análises exigem sequenciamento dos genomas com grande profundidade. Em relação a estas novas marcas epigenéticas, como a beta-hidroxibutirilacção, lactilacção, succinilacção, como são relativamente novas, poucos cientistas estão familiarizados com elas, e a literatura ainda é escassa em animais de produção. A medida que os anticorpos para investigar estas marcas sejam mais prontamente disponibilizados pelos fabricantes, mais literatura seja produzida, haverá uma maior atração e adesão dos pesquisadores a esta temática, e maior conhecimento científico será gerado.

Como perspectiva futura, o uso de dietas que impeçam as vacas de entrar em cetose pós-parto serão necessárias para mitigar estes efeitos in vivo. Nos laboratórios de produção de embriões por fertilização in vitro para transferir para vacas leiteiras, o uso de suplementação com antioxidantes, moléculas redutoras de estresse do retículo endoplasmático, moléculas que melhoram a função mitocondrial talvez seja necessário para reverter sequelas que os oócitos e os embriões resultantes possuam e gerar um embrião metabolicamente mais saudável para a transferência para as receptoras.

Referências

- Abecia, JÁ, Forcada, F, Palacín, I, Sánchez-Prieto, L, Sosa, C, Fernández-Foren, A, Meikle, A. Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote*, v.23, n.1, p.116–124, 2014.
- Avilés, M, Coy, P, Rizos, D. The oviduct: A key organ for the success of early reproductive events. *Animal Frontiers*, v.5, n.1, p.25–31, 2015.
- Baird, GD. Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook. *Journal of dairy science*, v.65, n.1, p.1–10, 1982.
- Britt, JH. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *American Association of Bovine Practitioners*, n.1991, p.39–43, 1992.
- Butler, WR. Energy balance relationships with follicular development ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, v.83, n.2–3, p.211–218, 2003.
- Chaput, C, Sirard, MA. Embryonic response to high beta-hydroxybutyrate (BHB) levels in postpartum dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v.72, n.106431, p.1–17, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106431>>.
- Duffield, T. Subclinical Ketosis in Lactating Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food*

- Animal Practice, v.16, n.2, p.231–253, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072015301031>>.
- Ferst, JG, Glanzner, WG, Gutierrez, K, De Macedo, MP, Ferreira, R, Gasperin, BG, Duggavathi, R, Gonçalves, PB, Bordignon, V.** Supplementation of oleic acid, stearic acid, palmitic acid and β -hydroxybutyrate increase H3K9me3 in endometrial epithelial cells of cattle cultured in vitro. *Animal Reproduction Science*, v.233, n. September, p.1–13, 2021.
- Fitzgerald, HC, Dhakal, P, Behura, SK, Schust, DJ, Spencer, TE.** Self-renewing endometrial epithelial organoids of the human uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.116, n.46, p.23132–23142, 2019.
- Fleming, TP, Watkins, AJ, Velazquez, MA, Mathers, JC, Prentice, AM, Stephenson, J, Barker, M, Saffery, R, Yajnik, CS, Eckert, JJ, Hanson, MA, Forrester, T, Gluckman, PD, Godfrey, kM.** Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. *The Lancet*, v.391, n.10132, p.1842–1852, 2018. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30312-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30312-X)>.
- Foster, LA.** Clinical Ketosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.4, n.2, p.253–267, 1988. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072015310471>>.
- Gómez-Álvarez, M, Agustina-Hernández, M, Francés-Herrero, E, Bueno-Fernandez, C, Alonso-Frías, P, Corpas, N, Faus, A, Pellicer, A, Cervelló, I.** Generation of healthy bovine ovarian organoids: a proof-of-concept derivation technique. *Journal of Ovarian Research*, v.18, n.106, p.1–13, 2025.
- Herd, TH.** Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, v.16, n.2, p.215–230, 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30102-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30102-X)>.
- Hugentobler, S, Humpherson, P, Leese, H, Sreenan, J, Morris, D.** Energy Substrates in Bovine Oviduct and Uterine Fluid and Blood Plasma During the Oestrous Cycle. *Molecular Reproduction and Development*, v.75, p.496–503, 2008.
- Jordan, ER, Chapman, TE, Holtan, DW, Swanson, LV.** Relationship of Dietary Crude Protein to Composition of Uterine Secretions and Blood in High-Producing Postpartum Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v.66, n.9, p.1854–1862, 1983.
- Kwong, WY, Wild, AE, Roberts, P, Willis, AC, Fleming, TP.** Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, v.127, p.4195–4202, 2000.
- Lawson, EF, Ghosh, A, Blanch, V, Grupen, CG, Aitken, RJ, Lim, R, Drury, HR, Baker, MA, Gibb, Z, Tanwar, PS.** Establishment and characterization of oviductal organoids from farm and companion animals†. *Biology of Reproduction*, v.108, n.6, p.854–865, 2023.
- Leroy, JLMR, Valckx, SDM, Jordaens, L, De Bie, J, Desmet, KLJ, Van Hoeck, V, Britt, JH, Marei, WF, Bols, PEJ.** Nutrition and maternal metabolic health in relation to oocyte and embryo quality: Critical views on what we learned from the dairy cow model. *Reproduction, Fertility and Development*, v.27, n.4, p.693–703, 2015.
- Leroy, JLMR, Van Soom, A, Opsomer, G, Bols, PEJ.** The consequences of metabolic changes in high-yielding dairy cows on oocyte and embryo quality. *Animal*, v.2, n.08, p.1120–1127, 2008a. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1751731108002383>.
- Leroy, JLMR, Van Soom, A, Opsomer, G, Goovaerts, IGF, Bols, PEJ.** Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, n.5, p.623–632, 2008b.
- Leroy, JLMR, Vanholder, T, Opsomer, G, Van Soom, A, De Kruif, A.** The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and β -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, n.2, p.119–123, 2006.
- Lucy, M.C.** Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science*, v.84, n.6, p.1277–1293, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70158-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0)><[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(01\)70158-0/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(01)70158-0/pdf)>.
- Newman, JC, Verdin, E.** β -Hydroxybutyrate: A Signaling Metabolite. *Annual Review of Nutrition*, v.37, p.51–76, 2017.
- Pishvaei, F, Karimi Dehkordi, M, Nazem, MR.** The effect of ketones on estrogen, progesterone, ovulatory follicle size, estrus and fertility in Holstein cows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v.45, n.4, p.642–648, 2021.
- Puchalska, P, Crawford, PA.** Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell Metabolism*, v.25, n.2, p.262–284, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>>.

Rajala-Schultz, PJ, Gröhn, YT, McCulloch, CE. Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.82, n.2, p.288–294, 1999.

Ruan, HB, Crawford, PA. Ketone bodies as epigenetic modifiers. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v.21, n.4, p.260–266, 2018.

Rutherford, AJ, Oikonomou, G, Smith, RF. The effect of subclinical ketosis on activity at estrus and reproductive performance in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.99, n.6, p.4808–4815, 2016.

Sangalli, JR, Nociti, RP, Chiaratti, MR, Bridi, A, Botigelli, RC, Ambrizi, DR, De Almeida Saraiva, HFR, Perecin, F, Da Silveira, JC, Ross, PJ, Meirelles, FV. Beta-hydroxybutyrate alters bovine preimplantation embryo development through transcriptional and epigenetic mechanisms. *Biology of Reproduction*, v.112, n.2, p.253–272, 2025.

Sangalli, JR, Nociti, RP, Del Collado, M, Sampaio, RV, Da Silveira, JC, Perecin, F, Smith, LC, Ross, PJ, Meirelles, FV. Characterization of histone lysine β -hydroxybutyrylation in bovine tissues, cells, and cumulus–oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*, v.89, n.9, p.375–398, 2022.

Sangalli, JR, Sampaio, RV, Del Collado, M, Da Silveira, JC, De Bem, THC, Perecin, F, Smith, LC, Meirelles, FV. Metabolic gene expression and epigenetic effects of the ketone body β -hydroxybutyrate on H3K9ac in bovine cells, oocytes and embryos. *Scientific Reports*, v.8, n.1, p.1–18, 2018.

Shimazu, T, Hirschey, M, Newman, J, HE, W, Shirakawa, K, Moan, NL, Grueter, CA, LIM, H, Saunders, LR, Stevens, RD, Newgard, CB, JR, RVF, Cabo, R De, Ulrich, S, Akassoglou, K, Verdin, E. Suppression of Oxidative Stress by β -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. *Science*, v.339(6116), n. January, p.211–214, 2013.

Tripathi, SK, Farman, M, Nandi, S, Girish Kumar, V, Gupta, PSP. Oviductal and uterine fluid analytes as biomarkers of metabolic stress in ewes (*Ovis aries*). *Small Ruminant Research*, v.144, p.225–228, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.09.022>>.

Van Hoeck, V, Sturmey, RG, Bermejo-Alvarez, P, Rizos, D, Gutierrez-Adan, A, Leese, HJ, Bols, PEJ, Leroy, JLMR. Elevated non-esterified fatty acid concentrations during bovine oocyte maturation compromise early embryo physiology. *PLoS ONE*, v.6, n.8, p.1–8, 2011.

Velazquez, MA, Fleming, TP, Watkins, AJ. Periconceptional environment and the developmental origins of disease. *Journal of Endocrinology*, v.242, n.1, p.T33–T49, 2019.

Velazquez, MA, Idriss, A, Chavatte-Palmer, P, Fleming, TP. The mammalian preimplantation embryo: Its role in the environmental programming of postnatal health and performance. *Animal Reproduction Science*, v.256, n.June, p.107321, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107321>>.

Walsh, RB, Walton, JS, Kelton, DF, Leblanc, SJ, Leslie, KE, Duffield, TF. The Effect of Subclinical Ketosis in Early Lactation on Reproductive Performance of Postpartum Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v.90, n.6, p.2788–2796, 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030207700905>>.

Wang, X, Tian, GG, Cheng, W, Yu, X, Li, X, WU, J. Metformin promotes female germline stem cell proliferation by upregulating Gata-binding protein 2 with histone β -hydroxybutyrylation. *Stem Cell Research and Therapy*, v.14, n.144, p.1–18, 2023.

Wathes, DC, Fenwick, M, Cheng, Z, Bourne, N, Llewellyn, S, Morris, DG, Kenny, D, Murphy, J, Fitzpatrick, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, v. 68, n. SUPPL. 1, p.232–241, 2007.

Whatley, EG, Harvey, AJ, Gardner, DK. A maternal ketogenic diet alters oviduct fluid nutrients and embryo histone acetylation in mice. *Reproduction*, v.167, p.e240026, 2024.

Whatley, EG, Truong, TT, Harvey, AJ, Gardner, DK. Acetoacetate and β -hydroxybutyrate reduce mouse embryo viability via differential metabolic and epigenetic mechanisms. *Reproductive BioMedicine Online*, v.46, n.1, p.20–33, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.09.018>>.

Whatley, EG, Truong, TT, Wilhelm, D, Harvey, AJ, Gardner, DK. β -Hydroxybutyrate Reduces Blastocyst Viability Via Trophectoderm-Mediated Metabolic Aberrations in Mice. *Human Reproduction*, v.37, n.9, p.1994–2011, 2022.

Xie, Z, Zhang, D, Chung, D, Tang, Z, Huang, H, Dai, L, Qi, S, Li, J, Colak, G, Chen, Y, Xia, C, Peng, C, Ruan, H, Kirkey, M, Wang, D, Jensen, LM, Kwon, OK, Lee, S, Pletcher, SD, Tan, M, Lombard, DB, White, KP, Zhao, H, Li, J, Roeder, RG, Yang, X, Zhao, Y. Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine β -Hydroxybutyrylation. *Molecular Cell*, v.62, n.2, p.194–206, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.036>>.