

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA DIETA E DA EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE
TOUROS JOVENS NELORE SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA E ACÚMULO INTRACELULAR DE LIPÍDEOS EM
EMBRIÕES PRÉ-IMPLANTACIONAIS PRODUZIDOS *IN*
*VITRO***

Anelise Ribeiro Peres

Médica Veterinária

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA DIETA E DA EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE
TOUROS JOVENS NELORE SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA E ACÚMULO INTRACELULAR DE LIPÍDEOS EM
EMBRIÕES PRÉ-IMPLANTACIONAIS PRODUZIDOS *IN*
*VITRO***

Anelise Ribeiro Peres

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária, Área: Reprodução Animal.

2018

P437e Peres, Anelise Ribeiro
Efeitos da dieta e da eficiência alimentar de touros jovens Nelore sobre a expressão gênica e acúmulo intracelular de lipídeos em embriões pré-implantacionais produzidos *in vitro* / Anelise Ribeiro Peres. -- Jaboticabal, 2018
x, 99 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti

Banca examinadora: Felipe Perecin, Lindsay Unno Gimenes, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Joaquim Mansano Garcia

Bibliografia

1. AGs. 2. CAR. 3. Expressão Gênica. 4. Lipídio. 5. Sêmen. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DA DIETA E DA EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE TOUROS JOVENS NELORE SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA E ACÚMULO INTRACELULAR DE LIPÍDEOS EM EMBRIÕES PRÉ-IMPLANTACIONAIS PRODUZIDOS *in vitro*

AUTORA: ANELISE RIBEIRO PERES

ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:



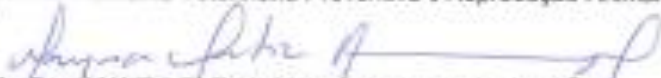
Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA/UNESP - Araçatuba/SP



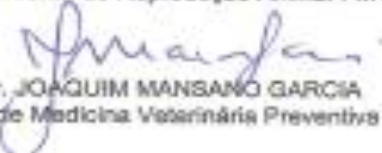
Prof. Dr. FELIPE PERES
Departamento de Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP



Profa. Dra. LINDSKY UNNO GIMENES
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MAYRA ELENA ORTIZ D'AVILA ASSUMPTÃO
Departamento de Reprodução Animal-FMVZ/USP / São Paulo/SP



Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 27 de julho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANELISE RIBEIRO PERES- nascida na cidade de Fernandópolis, SP, aos 16 dias do mês de julho do ano de 1987. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Camilo Castelo Branco em fevereiro de 2005. Concluiu o curso de graduação em dezembro de 2009 com menção honrosa de melhor aluna da turma. Em janeiro de 2010 ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional na Área de Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais (com bolsa) pela Universidade de Franca, concluiu o programa de aprimoramento em janeiro de 2012. Em março de 2012 iniciou o curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de mestrado, área de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, com bolsa da CAPES. Em agosto de 2014 iniciou o curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de doutorado, área de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti. Atuou profissionalmente na Top in Life Biotecnologia e Genética Animal durante outubro de 2014 a fevereiro de 2018. Desde março de 2018 até o momento é responsável pelo controle de qualidade da empresa Inpreha Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, proteção, vitórias, força, pela família que me deu e por sempre colocar em meu caminho pessoas especiais.

Aos meus pais Mario Antônio Peres e Reni de Lourdes Ribeiro Peres, por todo amor, aprendizado, dedicação, apoio, exemplo e por acreditarem nos meus sonhos.

À minha irmã Amanda Ribeiro Peres, pela amizade, companhia, companheirismo, apoio, ensinamento, cuidado e carinho sempre.

Aos meus avós, tios, primos, cunhado e ao meu amado sobrinho, enfim toda minha família por todo amor, incentivo, ensinamentos, apoio, dedicação.

Ao Aderson Maurício Ifran, pelo companheirismo, apoio, dedicação, aprendizado e carinho.

À minha orientadora Profa. Gisele Zoccal Mingoti, pela oportunidade, aprendizado, dedicação e todo esforço para a realização desse trabalho.

À Priscila Chediek Dall`Acqua, à Giovana Barros Nunes, à Luana Teixeira Rodrigues, à Natália Marins Bastos, ao Guilherme Fazan Rossi, à Patricia Fontes e ao Marcelo Nogueira, por todo auxílio na realização desse trabalho.

Aos membros da banca pelas correções, críticas e sugestões que muito contribuíram para a melhoria desse trabalho.

Aos funcionários, Roberta, Adão, Alexandre e Edson, por toda colaboração.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Consumo alimentar residual (CAR).....	4
2.2 Suplementação com ácidos graxos (AGs)	4
2.3 Efeito paterno transmitido à prole	5
2.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	8
2.5 Lipídios no Embrião.....	9
2.6 Expressão gênica.....	10
2.6.1 Apoptose.....	10
2.6.2 Diferenciação e implantação embrionária	11
2.6.3 Desenvolvimento embrionário.....	13
2.6.4 Estresse do retículo endoplasmático	14
2.6.5 Regulação epigenética.....	16
2.6.6 Metabolismo da glicose.....	16
2.6.7 Resposta ao choque térmico	17
2.6.8 Metabolismo lipídico.....	18
2.6.9 Metabolismo de carboidratos	29
2.6.10 Estresse oxidativo	29
2.6.11 Predição da qualidade embrionária.....	30

2.6.12 Resposta ao estresse	31
3. HIPÓTESES	33
4. OBJETIVOS	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1. Local e animais	34
5.2. Delineamento experimental	35
5.3. Avaliação e criopreservação do sêmen	38
5.4. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	38
5.5. Quantificação lipídica dos embriões.....	40
5.6. Extração do RNA e transcrição reversa	40
5.7. Expressão gênica.....	41
5.8. Análise estatística	48
6. RESULTADOS	49
6.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões	49
6.2 Conteúdo lipídico intracitoplasmático em embriões produzidos <i>in vitro</i>	51
6.3 Expressão gênica.....	52
7. DISCUSSÃO	63
7.1. Desenvolvimento e qualidade embrionária	63
7.2. Expressão gênica.....	65
8. CONCLUSÃO.....	75
9. REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS	95

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Efeito do consumo alimentar residual em touros nelores suplementados com ácidos graxos protegidos e seus efeitos no acúmulo de lipídio e expressão gênica em embriões", protocolo nº 004635/18, sob a responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Gisele Zoccal Mingoti, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de abril de 2018.

Vigência do Projeto	15/04/2018 a 20/07/2018
Espécie / Linhagem	Bovinos – <i>Bos indicus</i>
Nº de animais	24 Machos(Sêmen) e 40 Fêmeas (Ovário abatedouro)
Peso / Idade	390 Kg / 14 meses
Sexo	Macho
Origem	IZ – Instituto de Zootecnia / APTA/SAA

Jaboticabal, 19 de abril de 2018.


Prof.^a Dr.^a Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

EFEITOS DA DIETA E DA EFICIÊNCIA ALIMENTAR DE TOUROS JOVENS NELORE SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA E ACÚMULO INTRACELULAR DE LIPÍDEOS EM EMBRIÕES PRÉ-IMPLANTACIONAIS PRODUZIDOS *IN VITRO*

RESUMO – Na bovinocultura de corte, a alimentação corresponde ao maior custo associado à produção de carne. A avaliação do consumo alimentar residual (CAR) tem sido uma ferramenta importante para direcionar a seleção de bovinos de corte e otimizar economicamente esta atividade. No entanto, alguns estudos mostram uma diminuição da motilidade, do perímetro escrotal, uma menor taxa de prenhez e parto em animais eficientes para CAR. Uma estratégia para solucionar tais problemas é a suplementação ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) que não apenas aumentam a densidade energética da dieta, mas também atuam na melhoria do desempenho reprodutivo. No entanto, o ideal é que tais características de seleção para CAR e efeito da suplementação com AGPs sejam passadas à prole, assim o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito paterno da seleção para consumo alimentar residual (CAR) e da suplementação dos touros com AGs para a PIVE, o acúmulo de lipídio embrionário e a expressão de genes. Animais classificados em baixo CAR e alto CAR foram utilizados no experimento. O delineamento experimental obedeceu a um esquema fatorial 2 x 2 (CAR x Suplementação), a análise estatística foi realizada pelo programa JPM (versão 5.0.1, SAS Institute). Após a amostragem, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: com suplementação de AGs protegido e com suplementação controle (sem AGs protegido). O experimento foi composto por quatro tratamentos, o sêmen dos touros foi congelado (4 tratamentos), sendo 6 animais suplementados com AGs protegido (3 baixo CAR e 3 alto CAR) e 6 animais com suplementação controle, sem AGs (3 baixo CAR e 3 alto CAR). O sêmen foi utilizado para produção *in vitro* de embriões; os blastocistos foram reservados para análise da quantificação de lipídios e os blastocistos expandidos para análise da expressão gênica. A quantificação de lipídios foi avaliada utilizando o corante Sudan Black B 1% e as imagens foram analisadas pelo programa Image J (National Institutes of Health, USA). A análise de expressão gênica dos embriões foi feita pela técnica de qPCR utilizando o sistema de micro-fluídica Biomark HD (Fluidigm®, South San Francisco, CA, USA). Não houve diferença na produção *in vitro* de embriões oriundos de animais CAR- ou CAR+, nem entre os tratamentos suplementados com AGs. Embriões de touros CAR+ apresentaram maior conteúdo lipídico quando comparado com o grupo CAR-. Os genes que apresentaram diferença associados à dieta foram o HMOX1, SREBF1 e o GPX4. Os referentes ao perfil CAR que diferiram foram o PLAC8, PPARGC1A e o NFE2L2. Os relacionados com a interação entre dieta e CAR que apresentaram diferença foram o RPLP0, ATF4, H3F3A, HSF1, HMGCS1, SLC2A5, NANOG, REST e o GPX4. Conclui-se que a dieta e a seleção para CAR dos touros afetou a expressão gênica dos embriões produzidos *in vitro* utilizando o sêmen desses animais.

Palavras-chave: AGs, CAR, expressão gênica, lipídio, sêmen

EFFECTS OF DIET AND FEED EFFICIENCY OF YOUNG NELORE BULLS ON GENE EXPRESSION AND INTRACELLULAR ACCUMULATION OF LIPIDS IN PRE-IMPLANTATION EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO*

ABSTRACT – In beef cattle, feed corresponds to the highest cost associated with meat production. The evaluation of the selection for residual feed intake (RFI) has been an important tool to direct the selection of beef cattle and economically optimize this activity. However, some studies show a decrease in motility, scrotal perimeter, a lower pregnancy and calving rate in efficient animals for RFI. One strategy to solve such problems is polyunsaturated fatty acid (PUFA) supplementation that not only increases the energy density of the diet, but also improves reproductive performance. However, the ideal is that these characteristics of selection for RFI and effect of the supplementation with PUFA are passed to offspring, so the aim of this work was to evaluate the paternal effect of selection for residual feed intake and supplementation of bulls with fatty acids for *in vitro* produced embryos (IVPE), accumulation of embryonic lipid and gene expression. Animals classified under low RFI and high RFI were used in the experiment. The experimental design was based on a 2 x 2 factorial scheme (RFI x Supplementation), the statistical analysis was performed by the JPM program (version 5.0.1, SAS Institute). The animals were randomly divided into two groups: with protected fatty acids supplementation and with control supplementation (without protected fatty acids). The experiment was composed of four treatments, the semen of the bulls was frozen (4 treatments), 6 animals were supplemented with protected fatty acids (3 low RFI and 3 high RFI) and 6 animals with control supplementation, without protected fatty acids (3 low RFI and 3 high RFI). The semen was used for IVPE; blastocysts were reserved for analysis of lipid quantification and expanded blastocysts for analysis of gene expression. The quantification of lipids was evaluated using the Sudan Black B 1% dye and the images were analyzed by program Image J (National Institutes of Health, USA). The gene expression analysis of the embryos was done by the qPCR technique using the Biomark HD microfluidic system (Fluidigm®, South San Francisco, CA, USA). There was no difference in the *in vitro* production of embryos from RFI- or RFI+ animals, there was also no difference between treatments (supplementation). Embryos from RFI+ bulls presented higher intracytoplasmic lipid content than embryos from RFI- bulls. The genes that showed differences associated with the diet were HMOX1, SREBF1 and GPX4. The RFI associated genes that differed were PLAC8, PPARGC1A and NFE2L2. Those related to the interaction between diet and RFI that presented difference were RPLP0, ATF4, H3F3A, HSF1, HMGCS1, SLC2A5, NANOG, REST and GPX4. In conclusion, the diet and the selection for RFI of the bulls affected the gene expression of the embryos produced *in vitro* using the semen of these animals.

Key words: FA, RFI, gene expression, lipid, semen

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA- Ácido alfa-linolênico

AGs - Ácidos graxos

AGPs - Ácidos graxos poliinsaturados

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina sérica bovina

CA - Consumo alimentar

CAR - Consumo alimentar residual

CEUA - Comissão de Ética de Uso de Animais

CIV - Cultivo *in vitro*

CL - Corpo lúteo

CLA – Ácido linoleico conjugado

cm - Centímetro

cm² - Centímetro quadrado

CO₂ – Dióxido de carbono

CCOs - Complexo cumulus oophorus

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP- Desvio padrão

FIV - Fertilização *in vitro*

FORSK - Forskolin

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

g – Gauge

ha - Hectare

HEPES - N- (2-hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid); 4- (2 Hydroxyethyl) piperazine- 1-ethanesulfonic acid

IFN-t - Interferon tau

IZ - Instituto de Zootecnia

Kg - Quilograma

LA- Ácido linoleico

m - metros

m² - metros quadrados

MIV - Maturação *in vitro*
mL - Mililitro
mm – Milímetro
MS - Matéria seca
nº - Número
nm - Nanômetro
O₂ - Oxigênio
pH - Potencial Hidrogeniônico
PIVE - Produção *in vitro* de embrião
RE - Retículo endoplasmático
ROS - “Reactive oxygen species”
RPM - Rotações por minuto
SAS - Statistical Analysis Software Institute
SFB - Soro fetal bovino
SOF - Meio fluído sintético de oviduto
TALP-FIV – Tyrode’s albumin lactate piruvate
TCM 199 – Tissue culture medium 199
TE – Transferência de embriões
UI – Unidades internacionais
Vs - Versus
µM – micromolar
µL – Microlitro
x - Vezes
% - Porcentagem
°C - Grau Celsius
> - Maior
≥ - Maior ou igual
< - Menor
≤ - Menor ou igual

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da oxidação de ácidos graxos.....	19
Figura 2. Regulação da síntese e degradação de ácidos graxos.....	20
Figura 3. Figura esquemática sobre a regulação da expressão de ELOVL.....	23
Figura 4. O papel da FAS no metabolismo hepático de triglicérides.....	24
Figura 5. Integração metabólica pelos PPAR.....	25
Figura 6. Regulação da síntese de colesterol pela SREBP.....	27
Figura 7. Atuação do dímero RXR-RHX sob a expressão de genes do metabolismo lipídico e da glicose.....	28
Figura 8. Esquema ilustrativo do delineamento experimental: animais suplementados ou não com dieta enriquecida com ácidos graxos (Megalac) e classificados de acordo com o consumo alimentar residual (CAR) nas categorias CAR+ e CAR-.....	36
Figura 9. Clivagem e desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões produzidos com sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR).....	50
Figura 10. Clivagem e desenvolvimento <i>in vitro</i> de embriões produzidos com sêmen de touros jovens Nelore suplementados ou não com fonte de ácidos graxos.....	50
Figura 11. Conteúdo lipídico intracelular de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> com sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual.....	51
Figura 12. Conteúdo lipídico intracelular de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> com sêmen de touros jovens Nelore suplementados ou não com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....	52

- Figura 13.** Efeitos paternos sobre a expressão do gene *PLAC8* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR).....53
- Figura 14.** Efeitos paternos sobre a expressão do gene *PPARGC1A* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR).....54
- Figura 15.** Efeitos paternos sobre a expressão do gene *NFE2L2* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR).....55
- Figura 16.** Efeitos paternos sobre a expressão do gene *HMOX1* de embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....56
- Figura 17.** Efeitos paternos sobre a expressão do gene *SREBF1* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....57
- Figura 18.** Efeitos paternos sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....58
- Figura 19.** Efeitos paternos sobre a expressão do gene *RPLP0* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....59
- Figura 20.** Efeitos paternos sobre a expressão de genes associados à predição da qualidade de embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....60

Figura 21. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *H3F3A* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....61

Figura 22. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *ATF4* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....61

Figura 23. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *HSF1* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....62

Figura 24. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *GPX4* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac).....63

1. INTRODUÇÃO

Na bovinocultura de corte, a alimentação corresponde ao maior custo associado à produção de carne (Alberta Agriculture and Rural Development, 2005). Visando otimizar economicamente esta atividade, tem havido um esforço no que diz respeito ao melhoramento e à seleção de animais que apresentem melhor eficiência alimentar, em que há diminuição da quantidade de alimento consumido para cada quilo de carne produzida, sem comprometer o produto final (Lancaster et al., 2009; Ferreira et al., 2015). Devido a isso, a avaliação do consumo alimentar residual (CAR) tem sido uma ferramenta importante para direcionar a seleção de bovinos de corte. O CAR é calculado como a diferença entre o consumo individual observado e o consumo estimado, através de ajustes para peso médio metabólico e do ganho médio diário (Koch et al., 1963), que no entanto não acarreta em aumento do peso adulto (Ferreira et al., 2015). Dessa forma, os animais são classificados como mais eficientes (consumo observado menor do que o predito para o ganho observado: CAR negativo) ou menos menos eficientes (maior consumo: CAR positivo) (Almeida, 2005).

Todavia, estudos anteriores demonstraram um comprometimento de alguns indicadores de fertilidade em animais com maior eficiência alimentar, tanto em machos (diminuição da motilidade e viabilidade espermática e diminuição do perímetro escrotal em tourinhos de corte com maior eficiência alimentar; Awda et al., 2013;) quanto em fêmeas (menores taxas de prenhez em novilhas de corte mais eficientes; Basarab et al., 2011). Nesse sentido, faz-se necessário avaliar a efetividade de possíveis intervenções no manejo que sejam capazes de atenuar o impacto negativo da seleção de animais com maior eficiência alimentar sobre a fertilidade. Uma estratégia de manejo que tem recebido especial atenção nos últimos anos é a suplementação nutricional com gordura para ruminantes, especialmente fontes ricas em ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) que não apenas aumentam a densidade energética da dieta (Santos et al., 2008), mas também atuam na melhoria do desempenho reprodutivo (Costa e Fontes, 2010), seja em fêmeas (Cerri et al., 2009; Kojima et al., 1997; Lopes et al., 2009) ou em machos (Esmaeilil et al., 2014; Khoshvaght et al., 2016). Os AGPs, que englobam os ácidos graxos das famílias

ômega 3 (n3), ômega 6 (n6) e ômega 9 (n9), não são sintetizados *de novo* pelos animais, de forma que precisam ser fornecidos na dieta e, por essa razão, são denominados como ácidos graxos essenciais (Wathes et al., 2007). AGPs do tipo n6, como o ácido linoleico, e do tipo n3, como o ácido alfa-linolênico, estão envolvidos em vários processos biológicos, incluindo crescimento e reprodução (Gurr et al., 2002). Deste modo, a suplementação nutricional com AGPs para animais que apresentam comprometimento da fertilidade pode ser uma estratégia interessante para melhorar o desempenho reprodutivo.

Apesar de toda a intervenção humana no sentido de melhorar a qualidade e tornar mais lucrativa a produção de carne bovina (como a seleção dos animais e modificações da dieta), pouca atenção tem sido dada à influência do estado nutricional parental sobre os descendentes, embora experimentos com ratos, camundongos e seres humanos tenham demonstrado que o perfil epigenético e a saúde dos descendentes são influenciados pela nutrição paterna no momento peri-concepção (Anderson et al., 2006; Ng et al., 2010; Wathes et al., 2007). Experimentos com ratos mostraram que fatores ambientais, incluindo a dieta parental, afetam a prole mesmo se a exposição ocorrer antes do desenvolvimento intrauterino (revisado por Soubry et al., 2014). Uma dieta parental rica em gordura antes e durante o acasalamento resulta em descendentes com maior acúmulo de gordura e aumento do peso corporal, expressão alterada de lipase lipoprotéica e leptina nos tecidos adiposos (Wu e Suzuki, 2006), e em menor metilação do DNA em uma suposta região reguladora do gene alfa 2 do receptor da interleucina 13, associada à diminuição da tolerância à glicose (Ng et al., 2010). No sentido oposto, já foi também demonstrado que a privação de alimento paterno em camundongos machos, antes da concepção, leva à alterações no metabolismo de glicose da prole (Anderson et al., 2006). Assim, a influência da nutrição paterna durante a espermatogênese e seu impacto na saúde da prole são importantes pontos biológicos a serem investigados.

Diante da importância da seleção para CAR na pecuária de corte, dos benefícios da suplementação nutricional com ácidos graxos sobre a reprodução e sabendo-se que os efeitos paternos são passados à prole, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos paternos de CAR e da suplementação a longo prazo com

dietas enriquecidas com AGs para touros da raça Nelore, sobre o metabolismo lipídico e expressão gênica dos descendentes, mais especificamente sobre os embriões produzidos *in vitro*, na fase pré-implantacional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Consumo alimentar residual (CAR)

O CAR é uma característica que apresenta herdabilidade moderada a alta (Arthur et al., 2001a; Arthur et al., 2001b; Rolfe et al, 2011), o que torna possível a sua utilização em programas de melhoramento genético de bovinos de corte, já que tem potencial para aumentar a eficiência da produção de carne bovina (Herd e Bishop, 2000). Isso foi anteriormente demonstrado por Arthur et al. (2001a), que acasalaram fêmeas de baixo CAR com touros de baixo CAR e fêmeas de alto CAR com touros de alto CAR e compararam o desempenho das progênies após cinco anos de seleção. As progênies de pais com baixo CAR apresentaram ganho de peso semelhante às progênies resultantes de alto CAR (1,44 e 1,40 kg/dia, respectivamente) e semelhante peso final (384 e 381 kg, respectivamente). No entanto, as progênies oriundas de pais com baixo CAR também apresentaram o CAR mais baixo (-0,54 vs. +0,70 Kg/dia), consumiram menos alimento (9,4 vs.10,6 Kg MS) e apresentaram menor conversão alimentar (6,6 vs. 7,8) do que filhos de alto CAR (Arthur et al., 2001a).

2.2 Suplementação com ácidos graxos (AGs)

A nutrição adequada é fundamental para o sucesso da reprodução (Funston, 2004). A suplementação de gordura na dieta de ruminantes é uma prática comum para aumentar a densidade de energia da dieta e, conseqüentemente, melhorar os índices reprodutivos (Costa e Fontes, 2010).

No rúmen, os lipídios sofrem transformações decorrentes da lipólise e biohidrogenação, que alteram sua composição e o perfil de ácidos graxos que chega ao duodeno (Costa, 2007). Pesquisas relacionadas ao metabolismo de lipídios têm como objetivo principal manipular os eventos físico-químicos do rúmen para que a gordura possa fazer parte da alimentação de ruminantes sem interromper a fermentação ruminal e a digestão, bem como regular a biohidrogenação microbiana de certos ácidos graxos (Jenkins, 1993). Para que a gordura passe inerte pelo

rúmen, sem sofrer biohidrogenação, pode-se utilizar sais ou sabões de cálcio, de forma que haja a disponibilização de ácidos graxos insaturados no intestino delgado (Sartori e Mollo, 2007; Costa, 2007).

Em estudos prévios, a suplementação de vacas Nelore em lactação com ácidos graxos poliinsaturados protegidos no rúmen, desde o início da sincronização do estro até 28 dias após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), fez com que aumentasse a taxa de prenhez. Adicionalmente, foi também observado aumento da taxa de gestação em vacas cruzadas *B. indicus* suplementadas com ácidos graxos poliinsaturados protegidos no rúmen desde o fim do protocolo de sincronização do estro até 21 dias após a transferência de embrião (Lopes et al., 2009). Assim, os estudos demonstraram que utilização de ácidos graxos poliinsaturados na alimentação de fêmeas melhora a fertilização, o desenvolvimento embrionário (Cerri et al., 2009), a taxa de ovulação e a qualidade embrionária (Kojima et al., 1997).

Além dos benefícios observados em fêmeas, os ácidos graxos poliinsaturados são utilizados também para melhorar o desempenho reprodutivo masculino (Tran et al., 2017). Esmaeili et al. (2014) observaram que animais suplementados com óleo de peixe tiveram maior concentração total de testosterona, melhor qualidade do sêmen fresco e maior capacidade de congelamento em comparação animais alimentados com óleo de palma e óleo de girassol. Da mesma forma, Khoshvaght et al. (2016) também observaram aumento do volume, da concentração, da motilidade progressiva e da viabilidade do sêmen fresco de animais suplementados por 5 a 7 semanas com ácidos graxos poliinsaturados. Além disso, esses mesmos autores observaram aumento na motilidade progressiva e na viabilidade dos espermatozoides após o processo de criopreservação durante as semanas 9 e 11 no grupo suplementado com óleo de peixe em comparação com o grupo controle.

2.3 Efeito paterno transmitido à prole

A epigenética engloba mudanças nas marcas no genoma que são copiadas de uma geração de células para a próxima, mas que não envolvem mudanças na sequência primária de DNA. Estes mecanismos, incluindo metilação do DNA, modificações de histonas e microRNAs não codificantes, são responsáveis por

regular a expressão gênica durante a diferenciação celular e o desenvolvimento embrionário como também ao longo da vida (Mckay e Mathers, 2011).

Uma implicação dos sistemas de herança epigenética é que eles fornecem um mecanismo potencial pelo qual os pais poderiam transferir informações para seus filhos sobre o ambiente que vivenciaram. A informação epigenética pode ser herdada através da linha germinativa dos mamíferos e representa um transportador transgeracional plausível de informação ambiental (Carone et al., 2010).

O ambiente em que vive um indivíduo não influencia apenas seu próprio metabolismo, mas em alguns casos, o risco de doença metabólica pode ser decorrente do ambiente vivido por seus pais. Cada vez mais é comprovado que a nutrição paterna influencia o metabolismo da prole em mamíferos (Rando e Simmons, 2015). A dieta paterna pode influenciar o fenótipo da prole através da informação nos espermatozoides, via alteração no nível de pequenos RNAs, incluindo fragmentos de tRNA, em todo o trato reprodutivo masculino e em espermatozoides maduros. Os fragmentos de tRNA podem regular a expressão de transcrições conduzidas por retro elementos endógenos (Sharma et al., 2016).

Os espermatozoides passam por mudanças em sua carga de pequenos RNAs que ocorre durante o processo de espermatogênese até a maturação no epidídimo. Assim, ocorre a transição de um estágio de espermatogênese testicular dominado por piRNA para uma carga útil dominada por tRF de espermatozoides epididimários. Esses pequenos RNAs sintetizados no epitélio do epidídimo são traficados para espermatozoides em maturação por pequenas vesículas extracelulares, conhecidos coletivamente como epididimosomos. As populações de células germinativas testiculares, incluindo espermatozoides testiculares maduros, carregam níveis extremamente baixos de fragmentos de tRNA (tRFs), e que tRFs se tornam altamente abundantes somente depois que os espermatozoides entraram no epidídimo. Essa informação fornece um indício para compreender o processo de transferência de informação somato-germinal em mamíferos (Sharma et al., 2018).

A carga de pequenos RNAs do espermatozoide de mamíferos sofre remodelação dramática durante o desenvolvimento. Várias ondas de microRNAs e fragmentos de tRNA são enviados para o espermatozoide durante a maturação pós-

testicular no epidídimo e são essenciais para o desenvolvimento normal do zigoto pré-implantação (Shrama et al., 2018; Conine et al., 2018). Embriões gerados a partir de espermatozoides retirados da cabeça do epidídimo superexpressaram significativamente múltiplos fatores regulatórios ao longo do desenvolvimento embrionário pré-implantação, causando implantação ineficiente e morte embrionária. No entanto, a microinjeção de RNAs purificados específicos da cauda do epidídimo em embriões gerados a partir de espermatozoides obtidos da cabeça do epidídimo restaurou as alterações moleculares pré-implantação e suprimiu o fenótipo de letalidade embrionária pós-implantação. Esses achados revelam o papel dos pequenos RNAs durante a maturação pós-testicular de espermatozoides de mamíferos e sua importância para o desenvolvimento embrionário normal no período de pré-implantação (Conine et al., 2018).

Apesar de diversas pesquisas documentarem os efeitos paternos transmitidos para a prole (Anderson et al., 2006; Carone et al., 2010; Ng et al., 2010; Soubry et al., 2013), pouco se estuda sobre tal efeito em bovinos. Carone et al. (2010) observaram que a progênie de camundongos machos alimentados com dieta baixa em proteína exibiu elevada expressão hepática de muitos genes envolvidos no metabolismo de lipídios e colesterol e atribuíram este fato a alterações epigenéticas. De forma complementar, Soubry et al. (2013) observaram que a obesidade do pai está associada à hipometilação nas regiões diferencialmente metiladas (DMR) do gene Imprinted Insulin-Like Growth Factor 2 (IGF2) na prole, o que fornece evidências de que os efeitos transgeracionais da obesidade paterna podem influenciar o futuro estado de saúde da prole.

Adicionalmente, em um estudo com camundongos foi relatado que a privação de alimento paterno antes do acasalamento resultou em uma diminuição consistente de glicose sérica em seus descendentes, indicando um efeito transgeracional mediado pelo macho (Anderson et al., 2006). Ng et al. (2010) observaram que o consumo crônico de uma dieta hiperlipídica paterna em ratos promoveu a disfunção das células do pâncreas, aumento do peso corporal, adiposidade, intolerância à glicose e sensibilidade à insulina, além de alterar a expressão de genes do pâncreas em seus descendentes.

2.4 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica amplamente utilizada. A PIVE envolve três etapas, maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo (CIV) *in vitro* (Gonçalves et al., 2008) que ocorrem no laboratório utilizando-se meios específicos, atmosfera, temperatura e umidade controlada (Miyachi, 2011).

Além de suas vantagens, a PIVE pode, e é utilizada em várias linhas de pesquisa como, por exemplo, é utilizada na análise da expressão gênica, pois o embrião produzido por essa técnica é utilizado para quantificação de determinados genes expressos (Bertolini et al., 2002; Lonergan et al., 2003). Lonergan et al. (2003) utilizaram a técnica de PIVE em seu experimento que avaliou a expressão gênica de embriões cultivados *in vitro* e *in vivo* nos estágios de zigoto a blastocisto e os resultados demonstraram que a abundância relativa dos transcritos varia ao longo do período de pré-implantação e é fortemente influenciado pelo ambiente do cultivo.

A PIVE também pode ser utilizada para a avaliação dos efeitos da suplementação de ácidos graxos na alimentação de fêmeas bovinas (Fouladi-Nashta et al., 2007; Fouladi-Nashta et al., 2009). Fouladi-Nashta et al. (2007) avaliaram, por meio da PIVE, os efeitos do nível de ácidos graxos inertes do rúmen sobre o desenvolvimento embrionário em vacas leiteiras em lactação e observaram maior produção de blastocistos e maior número de células totais (massa celular interna e trofotoderma) em blastocistos do grupo alimentado com alto teor de gordura. Entretanto, Fouladi-Nashta et al. (2009), ao comparar diferentes fontes de ácidos graxos na alimentação de vacas leiteiras em lactação, observaram que o grupo alimentado com gordura inerte no rúmen obteve maior proporção de embriões clivados do que animais alimentados com soja ou linhaça, mas o rendimento de blastocistos e a qualidade do embrião não foram afetados.

2.5 Lipídios no Embrião

O sistema de produção *in vitro* dos embriões não apresenta a mesma eficiência quando comparado com *in vivo*, pois as condições do cultivo embrionário têm um papel crucial na determinação da qualidade do blastocisto (Rizos et al., 2002).

A maioria dos meios utilizados para o desenvolvimento *in vitro* de embriões contém soro ou albumina de soro bovino (BSA) como fonte proteica. Vários autores demonstraram os efeitos favoráveis desses produtos no desenvolvimento embrionário (Mucci et al 2006; Carolan et al.,1995; Leivas et al., 2011), no entanto, a suplementação de soro no meio de cultivo *in vitro* de embriões está associada ao acúmulo anormal de gotículas lipídicas em embriões, maior tempo de gestação e maior peso ao nascer (Abe et al., 1999; Thompson et al., 1995).

Além disso, sabe-se que o acúmulo de lipídios no citoplasma de embriões afeta negativamente a criotolerância dos mesmos, acarretando menor taxa de sobrevivência após a descongelação, como observado quando se utiliza soro fetal bovino nos meios de cultivo embrionário (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006). Tal efeito pode ser atribuído ao fato de que o acúmulo lipídico em excesso nos embriões pode causar alterações na fluidez e função da membrana plasmática, já que sua composição determina as propriedades físico-químicas da membrana, incluindo fluidez, permeabilidade e comportamento térmico (Mcevoy et al., 2000; Sturmey et al., 2009; Kim et al., 2001) que podem afetar negativamente a sobrevivência embrionária nos processos de criopreservação (Mucci et al., 2006). Adicionalmente, a importância do alto acúmulo de lipídios é que tais embriões são mais suscetíveis ao dano oxidativo (Mcevoy et al., 2000).

A criopreservação de embriões bovinos é uma importante técnica, pois auxilia na logística referente à transferência de grandes números de embriões frescos e também para expandir a comercialização de embriões entre países. Dessa forma, inúmeras pesquisas são desenvolvidas com o objetivo de reduzir a quantidade de lipídio intracelular em embriões, como a técnica de delipidação mecânica por centrifugação (Ushijima et al., 1999), a micromanipulação (Diez et al., 2001) e aplicação de laser na zona pelúcida dos embriões (Pryor et al., 2011). Pode-se

utilizar também a delipidação química com reguladores do metabolismo lipídico, que é menos agressiva e não provoca lesão na zona pelúcida; para tanto, são utilizados agentes lipolíticos, tais como o forskolin (Meneghel et al., 2017) ou agentes inibidores da lipogênese, como o ácido linoleico (Pereira et al., 2008) e L-carnitina (Baldoxeda et al., 2016).

Apesar da alta quantidade de lipídios afetar negativamente o processo de criopreservação, o lipídio é uma fonte importante de energia utilizada pelos oócitos e embriões no período de pré-implantação (Sturmey et al., 2009).

2.6 Expressão gênica

2.6.1 Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo fundamental para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, este processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e é importante em certas condições patológicas, sendo importante para eliminar células defeituosas. Várias moléculas estão envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases (Grivicich et al, 2007; Anazetti e Melo, 2007).

As caspases são ativadas sequencialmente formando uma cascata que começa com a ativação das caspases indutoras (caspase 8, 9 e 10) que ativa a caspase 1 e por sua vez ativa as caspases 3, 6 e 7 que são as efetoras. Após serem ativadas, as caspases efetoras degradam, através de proteólise, as proteínas celulares vitais, levando a morte celular. (Gastman et al., 1999; Chowdhury et al., 2008; Thornberry e Lazebnik, 1998). As caspases por sua vez são ativadas por 2 vias, por meio dos receptores de morte (FAS e TNF) ou pela via mitocondrial (família BCL2) (Yuan, 1997; Wallach et al., 1999; Bagci et al. 2006).

A via apoptótica mitocondrial é amplamente mediada através das proteínas da família Bcl-2, as quais podem promover sobrevivência (BCL2, BCLXL, MCL1, A1) ou apoptose (BAX, BAK, BAD, BCLXS, BIK, BID) (Johnson, 1998; Suen et al., 2008; Wang et al., 1996; Yang e Korsmeyer, 1996).

Inúmeras pesquisas utilizam a expressão gênica da família Bcl-2 para avaliar a apoptose de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (Leidenfrost et al., 2011; Yang e Rajamahendran, 2002; Lin et al., 2017).

Ao investigar a ocorrência temporal da morte celular de embriões bovinos, Leidenfrost et al. (2011) avaliaram os perfis de abundância de transcrição para genes relacionados à apoptose e observaram que houve pouca ou nenhuma detecção de transcrições para CASP3 e CASP9. No entanto, encontraram diferença na transcrição de BAX e CASP9 entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, em que os níveis de transcrição nos blastocistos produzidos *in vivo* foram maiores, enquanto que os níveis de mRNA para CASP3 foram maiores nos produzidos *in vitro*.

Yang e Rajamahendran (2002), observaram que a expressão de Bcl-2 foi alta em embriões de boa qualidade e baixa em embriões fragmentados. Já a expressão de Bax foi encontrada em todas classificações embrionárias. Isto implica que a proporção de Bcl-2 para Bax pode ser usada para avaliar a tendência para a sobrevivência ou apoptose de embriões. As interações entre a família de proteínas Bcl-2 podem desempenhar um papel crítico no desenvolvimento do embrião pré-implantação (Yang e Rajamahendran, 2002).

2.6.2 Diferenciação e implantação embrionária

A embriogênese é a habilidade de auto-organização; os destinos das células são determinados pela interação de células que compõem o embrião. O zigoto sofre clivagem e aumenta seu número de célula seguido pelo estabelecimento das duas primeiras linhagens celulares: a massa celular interna e o trofotoderma, que aparecem durante o estágio do blastocisto nas posições interna e externa do embrião, respectivamente. O trofotoderma contribuirá para a formação da placenta enquanto as células da massa celular interna dão origem ao feto (Bou et al., 2016).

O processo de implantação envolve mudanças na expressão de genes que são coordenados com trofotoderma embrionário ao epitélio uterino, modificando o ambiente uterino, causando silenciamento de receptores de progesterona e estrógeno, supressão de genes para reconhecimento imune, alterações na

permeabilidade da membrana para melhorar o intercâmbio de fatores concepto-materno, angiogênese e vasculogênese, aumento da vascularização do endométrio, ativação de genes para o transporte de nutrientes para o lúmen uterino e sinalização aprimorada para o reconhecimento da prenhez. Sendo assim, a expressão diferencial dos genes podem influenciar a receptividade uterina à implantação (Bazer et al., 2010).

A CDX2 desempenha um papel essencial na formação do trofotoderma durante o desenvolvimento embrionário (Sritanaudomchai et al., 2009). E sua expressão é aumentada em embriões que se desenvolveu até o nascimento quando comparado com embriões que sofreram absorção (El-Sayed et al., 2006). Na avaliação da qualidade do embrião bovino, o PLAC8 é um biomarcador que é usado para prever o resultado de prenhez (El-Sayed et al., 2006; Rekik et al., 2011), sendo responsável pelo desenvolvimento de placenta e a interação materna embrionária (Ghanem et al., 2011). Foi demonstrado que o PLAC8 está altamente expresso em células de embriões que foram capazes de se desenvolver em bezerros, tanto em embriões produzidos *in vitro* (El-Sayed et al., 2006) como *in vivo* (Ghanem et al., 2011).

O interferon tau (IFNt) é sintetizado pelas células trofoblásticas do blastocisto e é responsável pelo reconhecimento da prenhez em ruminantes, o efeito anti-luteolítico do IFNt permite bloquear ciclicidade ovariana, suprimindo a transcrição do receptor do estrógeno e de ocitocina estendendo a vida útil do corpo lúteo, mantendo a secreção de progesterona necessária para preparar o ambiente uterino (Spencer e Bazer, 1996). Estudos relataram que IFNt pode ser detectado com o estágio de 16 células em embriões fertilizados *in vitro* (dia 4), aumentando a concentração no estágio morula (dia 5) e no blastocisto (dia 7), e permanecendo continuamente expressado nos dias 9 a 24 (Farin et al., 1990; Yao et al., 2009).

2.6.3 Desenvolvimento embrionário

Durante o desenvolvimento embrionário, várias transcrições gênicas são produzidas para que haja uma placentação bem sucedida, a expressão de genes específicos durante o desenvolvimento e pré-implantação, tem fundamental importância para o metabolismo em diferentes etapas, como as clivagens iniciais, a ativação genômica, que ocorre no estágio entre 8 e 16 células na espécie bovina, a compactação da mórula, a diferenciação celular e a formação do blastocisto. Assim, alterações na expressão gênica podem afetar a viabilidade de embriões (Razza, 2017; Lonergan et al., 2003; Bertolini et al. 2002).

O gene GSK3 regula uma diversidade de funções celulares através de diferentes caminhos de sinalização, incluindo a síntese de proteínas, proliferação celular, diferenciação celular, apoptose e dinâmica de microtúbulos; em resposta à insulina e aos fatores de crescimento GSK3 é fosforilado e inativado (Uzbekova et al., 2009). Aparicio et al, (2010) demonstraram que os embriões bovinos expressam isoformas GSK3A no estágio de duas células para o estágio de blastocisto e que a fosforilação de GSK3A aumentou à medida que o desenvolvimento avançou, sugerindo que a inibição da GSK3 e a via de sinalização mediada por esta proteína estão associadas ao desenvolvimento embrionário normal.

O HMOX1 atua como um crítico fator para promover a formação da vasculatura e a homeostase imune através da inibição de reações excessivas em vários tecidos no corpo (Chora et al., 2007; Watanabe et al., 2004). Fêmeas gestantes submetidas ao estresse exibiram níveis reduzidos de progesterona e expressão de HMOX1 e aumento da metilação em regiões distintas do promotor placentário HMOX1 (Solano et al., 2015).

O gene OTX2 faz parte de uma família de genes de homeobox, que atuam durante o desenvolvimento embrionário precoce para controlar a formação de muitas estruturas corporais. O gene OTX2 desempenha um papel crítico no desenvolvimento dos olhos e estruturas relacionadas, como o nervos ópticos. Também está envolvido no desenvolvimento do cérebro, incluindo a formação da glândula pituitária na base do cérebro (Ou et al., 2008; Martinez-Morales et al., 2001).

O POU5F1, também denominado OCT4, é expresso somente em células pluripotentes, esse gene foi detectado no embrioblasto, trofoblasto e cultivos de embrioblasto, no entanto embrioblasto apresentou maiores níveis de expressão que o trofoblasto, esses resultados sugerem que o POU5F1 pode controlar o processo de diferenciação do embrião. Este gene também foi detectado no conceito até o dia 21 de gestação de ovinos e sua expressão foi inversamente proporcional a do interferon-tau (Zeineddine et al., 2014; Sanna et al., 2010; Kim et al., 2013; Wang et al., 2013).

Para a proteção contra o estresse oxidativo, o embrião possui diversos sistemas antioxidantes, entre eles o antioxidante enzimático peroxiredoxinas (PRDXs), o padrão de expressão da PRDX1 é contínuo durante o desenvolvimento embrionário e sua expressão é regulada em resposta a vários tipos de estresse. (Leyens et al., 2004; Abbas et al., 2008).

Em relação à proteína ribossomal RPLP0, foi observado que os níveis de expressão de RPLP0 permanece estável durante a gestação (Jeyasuria et al., 2009). Foi observado também que a gestação que resultou em nascimento do bezerro a sua expressão estava aumentada (Tesfaye et al., 2009). No mesmo experimento Tesfaye et al. (2009), avaliaram através de biópsias de blastocistos derivados de embriões produzidos *in vivo*, que embriões que foram absorvidos foram enriquecidos com transcritos que regulam a proteína de ligação ao cálcio tanto a S100A10 como a S100A14.

2.6.4 Estresse do retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático é a organela responsável pelo processo de enovelamento da proteína, fenômeno em que a proteína dobra-se sobre si mesma e torna-se ativa. Também, responde pela síntese de lipídios e esteroides, e está envolvido no sistema de controle de alta qualidade que garante o correto processo de enovelamento de proteínas, as quais serão transportadas para o complexo de Golgi. No entanto, estados fisiológicos ou patofisiológicos, que aumentam a demanda do processo enovelamento de proteínas ou que estimulam a ruptura nas reações proteicas, geram desequilíbrio entre preparar o processo de enovelamento

e a capacidade do retículo endoplasmático. Em consequência, causa o acúmulo e desordem no processo de enovelamento proteico no lúmen do retículo endoplasmático que é chamado de estresse do retículo endoplasmático, tal estresse aciona o processo de desativação proteica (Moreira, 2015; Csordás e Hajnóczky, 2009; Berridge, 2002). Quando a homeostase do retículo endoplasmático é perturbada ou o mecanismo de controle sobrecarregado, o estresse prolongado causa apoptose. O gene ATF4 é conhecido por regular a resposta ao estresse para proteger a célula de vários fatores de estresse e indutor de apoptose. Assim, o estresse oxidativo induz a expressão de ATF4 que pode estar envolvido no mecanismo de proteção de embriões no período de pré-implantação contra as lesões oxidativas (Na et al., 2006).

O gene DDIT3 (DNA damage-inducible transcript 3 protein), faz parte das vias de apoptose mediada pelo estresse do retículo endoplasmático, o aumento na expressão do gene é específica para uma das vias sensíveis ao estresse e indica que pode ser um marcador inicial de células comprometidas com a apoptose (Fontanier-Razzaq et al., 1999; Silva, 2013).

Os ácidos graxos representam uma importante fonte de energia para embriões no período pré-implantação. A oxidação de ácidos graxos está correlacionada com o consumo de oxigênio embrionário que permanece relativamente constante até o estágio de 8 células, mas aumenta subitamente até o estágio de mórula. A degradação dos ácidos graxos ocorre nas mitocôndrias e é catalisada por várias carnitina acil transferases, incluindo duas carnitina palmitoyl transferases, a CPT-I e CPT-II. Foi realizado um trabalho para determinar o número relativo de transcrições de genes Cpt1b e Cpt2 que codificam as enzimas m-CPT-I e CPT-II, durante o desenvolvimento de pré-implantação. Foi relatado que as transcrições de Cpt1b são detectadas primeiro e no estágio de 2 células e reaparecem no estágio de mórula e blastocisto. As transcrições de Cpt2 diminuem após a fertilização para níveis indetectáveis e estão presentes novamente mais tarde no estágio de mórula. Estes resultados demonstraram que a transcrição de Cpt1b e Cpt2 é desencadeada no estágio mórula, concomitantemente com perfis crescentes conhecidos de absorção de oxigênio e oxidação de ácidos graxos (Gentile et al., 2004).

2.6.5 Regulação epigenética

A epigenética compreende um conjunto de mecanismos que promovem a regulação da expressão gênica a nível transcricional por modificações químicas no DNA e na cromatina, como metilação, acetilação e fosforilação, que resultam na conseqüente mudança fenotípica do indivíduo sem, no entanto, ocorrer nenhuma alteração na seqüência do DNA (Costa e Pacheco, 2013).

A variante Histona H3.3 é codificada por dois genes distintos, H3F3A e H3F3B, que estão intimamente associados a genes ativamente transcritos. Após a fertilização, H3.3 é incorporada à cromatina parental, e é necessária para a formação de blastocistos e desenvolvimento embrionário precoce em bovino. A abundância de RNAm de H3F3A é estável, enquanto que o RNAm de H3F3B é relativamente dinâmico durante o desenvolvimento embrionário precoce. A quantidade de mRNA de H3F3B também é consideravelmente maior do que H3F3A (Zhang et al., 2017).

As histona desacetilases (HDAC) 1 e 2 são enzimas altamente similares que ajudam a regular a estrutura da cromatina. Embora a deleção de tecido específico de HDAC1 e HDAC2 tenha demonstrado redundância funcional, a deleção de HDAC1 causa letalidade embrionária precoce, enquanto o HDAC2 não. HDAC1, controla a diferenciação de células tronco embrionárias no entanto, o mesmo não ocorre com HDAC2. (Dovey et al., 2010). Blastocistos bovinos produzidos *in vitro* sob alta pressão de oxigênio possuem abundância elevada de ROS e esses embriões submetidos ao estresse oxidativo também apresentaram expressão alterada dos transcritos associados à epigenética H2AFZ, H3F3B, HDAC2 (Bomfim et al., 2017).

2.6.6 Metabolismo da glicose

A glicose desempenha um papel fundamental durante a oogênese e embriogênese, satisfazendo as demandas metabólicas de oócitos e embriões, fornecendo reservas de energia armazenadas sob a forma de glicogênio e apoiando a biossíntese de nucleotídeos através da via do fosfato de pentose. A glicose

também contribui para a produção de aminoácidos, proteínas glicosiladas e componentes extracelulares (Zheng et al., 2007).

AKR1B1 é uma enzima que ativa o metabolismo da glicose e apresenta relação importante com a produção de PGF2 α . Está presente na placenta e é altamente expressa no endométrio durante a luteólise, sugerindo que a expressão deste gene pode estar relacionada com falhas na gestação (Madore et al., 2003). Foi demonstrado através de biópsias que os embriões com expressão de AKR1B1, resultaram em reabsorção fetal (El-Sayed et al., 2006). As biópsias de embriões que resultam em reabsorção e nenhuma prenhez foram enriquecidas com transcrições envolvendo metabolismo da glicose (PGK1 e AKR1B1). Ao avaliar o comportamento de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* no dia 7 (D7) cultivados no sistema de cultivo pós-eclosão até o dia 14 (D14), verificou-se que os *in vitro* eram menores, mas a expressão do gene PGK-1 foi semelhante entre os grupos (Machado, 2012).

2.6.7 Resposta ao choque térmico

As proteínas do choque térmico (HSPs) são expressas em todas as células em resposta a estressores ambientais e servem para protegê-las do aquecimento e substâncias tóxicas, o que pode ocorrer durante o cultivo embrionário. O Fator de choque térmico 1 (HSF1), enquanto reconhecido como o principal regulador da resposta de transcrição de choque térmico, também exerce funções importantes durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos e gametogênese (Le Masson et al., 2011). As HSPs são componentes críticos de um mecanismo de defesa complexo e altamente conservado, também desempenham papel fundamental tanto durante a síntese, montagem, dobramento e degradação de proteínas, quanto na preservação da sobrevivência celular sob condições ambientais adversas (Gupta et al., 2007). Em condições adversas, os níveis de HSPs são aumentados, auxiliando, desta forma, a síntese e maturação de novas proteínas que irão substituir aquelas afetadas pelo estresse metabólico (Bukau e Horwich, 1998).

Hensen et al. (2012) observaram que a privação de aminoácidos no cultivo de células resulta na inativação do HSF1. Nas células privadas de aminoácidos, o HSF1 ativo perde sua atividade de ligação e ocorre uma diminuição acentuada no

nível de transcrição de genes alvo de HSF1 tais como HSPA1A (Hsp70), DNAJB1 (Hsp40) e HSP90AA1, além disso o mRNA HSPA1A, também foi desestabilizado.

Silva et al. (2013) observaram diminuição na porcentagem de oócitos submetidos ao estresse que se tornaram blastocisto em animais da raça Jersey, mas o estresse térmico não teve o mesmo efeito nos embriões da raça Nelore, foi observado também que a expressão de HSF1 diminuiu ($P < 0,05$) em ambas as raças, com maior efeito em embriões da raça Nelore. Segundo descrito por Li et al. (2011) e Bulman e Nelson (2005), após a detecção do estresse, o HSF1 adquire um alto nível de atividade transcricional, que depois é gradualmente perdido após a remoção do estresse.

2.6.8 Metabolismo lipídico

Os lipídeos são essenciais para qualquer célula, pois estes fornecem a energia necessária para o metabolismo celular, além de suprir as necessidades energéticas requeridas durante os processos de desenvolvimento embrionário inicial, através da oxidação dos ácidos graxos para produção de ATP. Porém, durante a β -oxidação dos lipídeos são liberadas espécies reativas de oxigênio (ROS), que em alta concentração podem lesionar as mitocôndrias, comprometendo seu funcionamento (Sturmeijer et al., 2009; Duvnjak et al., 2007). A concentração de triacilgliceróis contidos nos embriões produzidos *in vivo* permanece estável desde o estágio de duas células até blastocisto, todavia, em embriões produzidos *in vitro*, as reservas de triacilgliceróis podem dobrar desde o estágio de quatro células até blastocisto (Fergusson e Leese, 1999).

Os ácidos graxos representam uma importante fonte de energia para embriões no período pré-implantação (Gentile et al., 2004). Na mitocôndria, a oxidação completa dos ácidos graxos ocorre em três etapas, sumarizadas na Figura 1: a primeira, chamada de β -oxidação, é a oxidação de ácidos graxos a dois fragmentos de carbono, na forma de acetil-CoA; a segunda etapa é a oxidação de acetil-CoA a CO_2 no ciclo do ácido cítrico; e a terceira é a transferência de elétrons dos transportadores de elétrons reduzidos à cadeia respiratória mitocondrial, em que os elétrons derivados das oxidações 1 e 2 passam ao O_2 por meio da cadeia

respiratória mitocondrial, fornecendo a energia para a síntese de ATP por fosforilação oxidativa (Nelson e Cox, 2014).

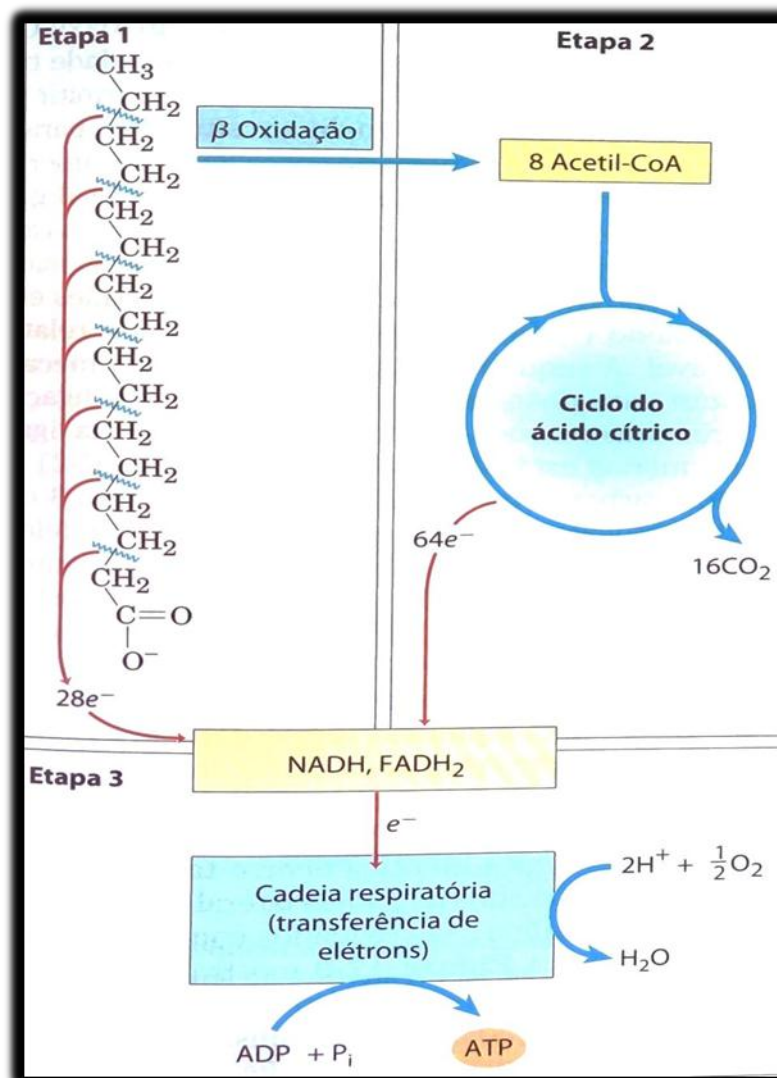


Figura 1. Etapas da oxidação de ácidos graxos (Nelson e Cox, 2014).

Quando a dieta disponibiliza uma fonte imediata de carboidratos, a β -oxidação dos ácidos graxos é desnecessária, sendo assim desativada. Duas enzimas são essenciais no metabolismo dos ácidos graxos: a acetil-CoA-carboxilase (ACC) primeira enzima na síntese de ácidos graxos e a carnitina-aciltransferase-I, que limita o transporte dos ácidos graxos para dentro da matriz mitocondrial para a β -oxidação. A ingestão de uma dieta rica em carboidrato aumenta a glicose sanguínea e ativa

a liberação de insulina, que ativa a proteína-fosfatase dependente de insulina que, por sua vez, desfosforila a ACC, ativando-a. A ACC catalisa a formação de malonil-CoA que inibe a carnitina-aciltransferase-I, impedindo assim a entrada ácidos graxos na matriz mitocondrial. Quando baixam os níveis de glicose sanguínea, a liberação de glucagon ativa a proteína-quinase dependente de cAMP (PKA) que fosforila e inativa a ACC e, com a baixa concentração de malonil-CoA, os ácidos graxos entram na matriz mitocondrial e tornam-se o principal combustível (Neson e Cox, 2014). Estas etapas estão sumarizadas na Figura 2.

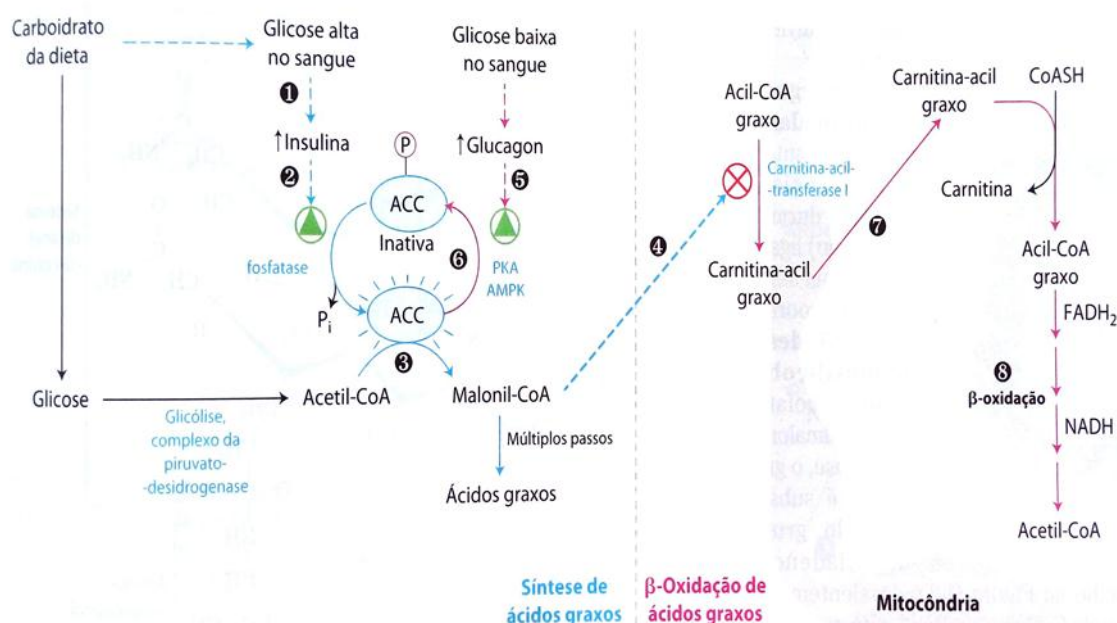


Figura 2. Regulação da síntese e degradação de ácidos graxos (Neson e Cox, 2014).

Para controlar as quantidades de ácidos graxos, as células são dotadas de dois sistemas de acetil-coenzima A carboxilase (ACC). O ACC-alfa é a enzima limitante da taxa na biogênese de ácidos graxos de cadeia longa; e a ACC-beta acredita-se que controle a oxidação do ácido graxo mitocondrial. Essas duas isoformas do ACC controlam a quantidade de ácidos graxos nas células (Kim, 1997). A FAS, que catalisa a síntese de palmitato a partir da condensação de malonil-CoA e acetil-CoA, também participa da homeostase de energia, convertendo o excesso de carbono em ácidos graxos para armazenamento (Baron et al., 2004). A Malonil-

CoA pode ser formada dentro da mitocôndria, peroxissomos e citosol de células de mamíferos. Além de ser um intermediário nas vias de biossíntese de ácidos graxos *de novo* e alongamento de ácidos graxos, a malonil-CoA possui importante função sinalizadora através de sua inibição da carnitina–palmitoil transferase 1 (CPT-1), que é responsável pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a mitocôndria (Abu-Elheiga et al., 2000). Assim, CPT-1 exerce controle de fluxo sobre a beta-oxidação mitocondrial e produção de energia (Saggerson, 2008).

O excesso de colesterol celular é armazenado na forma esterificada, como ésteres de colesterol. A conversão de colesterol em ésteres de colesterol é catalisada pela enzima ACAT. Na maioria dos tipos de células, os ésteres de colesterol estão presentes apenas em baixos níveis, principalmente como gotículas lipídicas citoplasmáticas. No plasma, os ésteres de colesterol fazem parte da carga lipídica neutra presente os quilomícrons intestinais e nas lipoproteínas hepáticas de densidade muito baixa (VLDL). Em tecidos esteroideogênicos, como adrenais, funcionam como reservatório de colesterol para a produção de hormônios esteroides (Chang et al., 2009).

Depois que os ácidos graxos de cadeia longa entram nas células, as sintetases acil-CoA de cadeia longa (ACSLs) as convertem em acil-CoAs. Os acil-CoAs resultantes têm vários destinos metabólicos dentro das células, incluindo incorporação em triacilglicerol (TAG) e fosfolipídios de membrana, além de serem usados como substratos para β -oxidação (Mashek et al., 2006). O tecido adiposo é um alvo do receptor ativado por proliferador de peroxissomo γ (PPAR γ), que aumenta a expressão dos genes envolvidos na síntese de TAG (Martin et al., 1997). No entanto, o ACSL1 no fígado é um alvo do PPAR α , o que aumenta a expressão de genes envolvidos na β -oxidação (Schoonjans et al., 1996).

Nas células de mamíferos, as elongases (ELOVL) e as dessaturases (SCD) desempenham papéis críticos na regulação do comprimento e do grau de insaturação dos ácidos graxos, portanto, regulam as funções e os destinos metabólicos (Guillou et al. 2010). Uma quantidade significativa de ácidos graxos sintetizados pelo complexo enzimático citosólico ácido graxo sintase (FAS) ou absorvidos pela dieta são ainda mais alongados em ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) em um ciclo de reação de quatro etapas por enzimas ligadas à

membrana predominantemente localizada no retículo endoplasmático. Os membros da família ELOVL codificam para enzimas (elongases). De forma generalizada, as elongases de ácidos graxos podem ser divididas em dois grandes grupos: (a) enzimas que se sugere estarem envolvidas no alongamento de enzimas VLCFA saturadas e monoinsaturadas (ELOVL1, 3 e 6) e (b) elongases de ácidos graxos poliinsaturados (ELOVL2, 4 e 5) (Jakobsson et al., 2006).

Jakobson et al. (2006), fizeram um quadro esquemático sobre a regulação da expressão de ELOVL e descreveram que a expressão de Elov11 e Elov16 é controlada de maneira lipogênica similar à sintase de ácidos graxos (Fas) por fatores como o receptor X do fígado (LXR) e a proteína 1 de ligação ao elemento regulador do esterol (SREBP-1). Em contraste, a expressão de Elov13 é induzida por fatores que estimulam a oxidação de ácidos graxos, como norepinefrina (NE), enquanto é inibido por LXR. Elov12 e Elov15 controlam o alongamento de ácidos graxos poliinsaturados, que por sua vez regulam a atividade PPAR α . Sob certas condições, como fome, ácidos graxos poliinsaturados específicos via PPAR α promovem a síntese de enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos, enquanto inibem a lipogênese via forma nuclear do SREBP-1 (nSREBP-1). A estimulação do PPAR α também demonstrou promover a expressão de Elov11, Elov13, Elov15 e Elov16, mas não Elov12, numa perspectiva de mais longo prazo. Glicocorticóides (GC) são necessários apenas para expressão de ELOVL3 induzida (Figura 3).

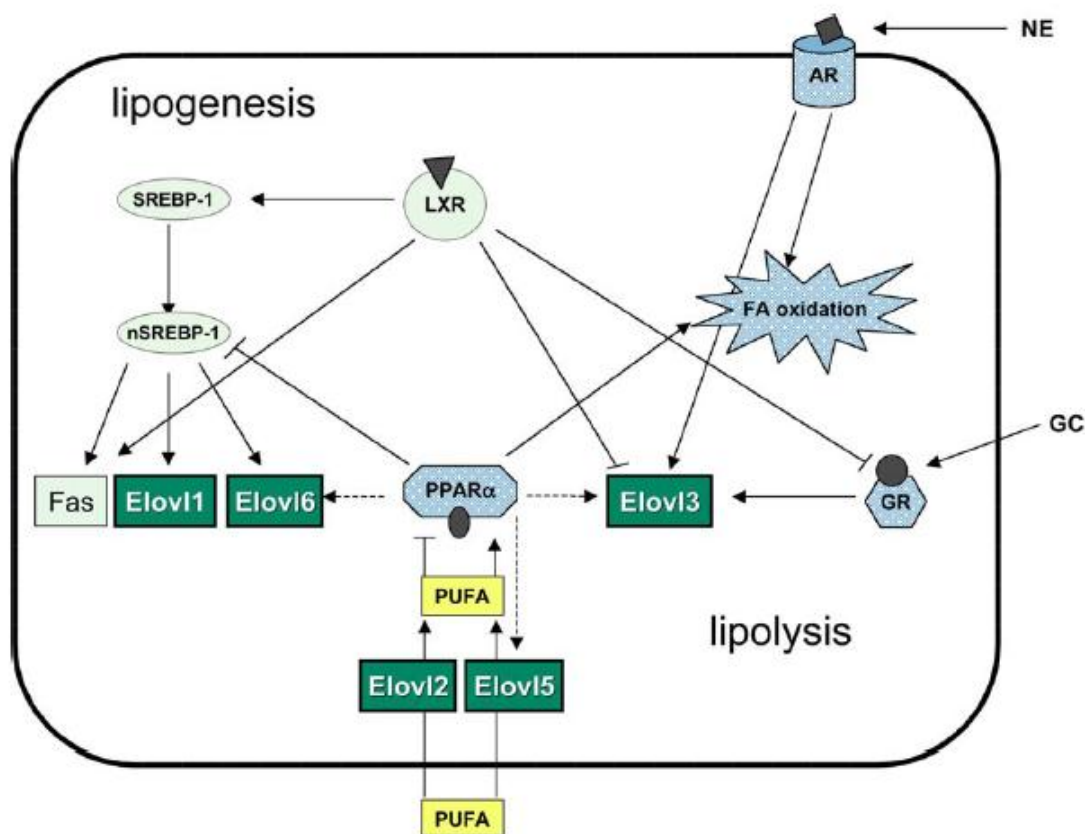


Figura 3. Figura esquemática sobre a regulação da expressão de ELOVL (Jakobsson et al., 2006).

A ácido graxo sintase (FAS) catalisa a síntese *de novo* de ácidos graxos. No fígado, a FAS é categorizada como uma proteína de limpeza, produzindo gordura para armazenamento de energia quando os nutrientes estão presentes em excesso (Smith et al., 2003). Smith et al. (2003) esquematizaram o papel da FAS no metabolismo hepático de triglicérides. A FAS controla o catabolismo dos ácidos graxos através da síntese de um ligante para o PPAR α , que ativa os genes de oxidação dos ácidos graxos (Figura 4).

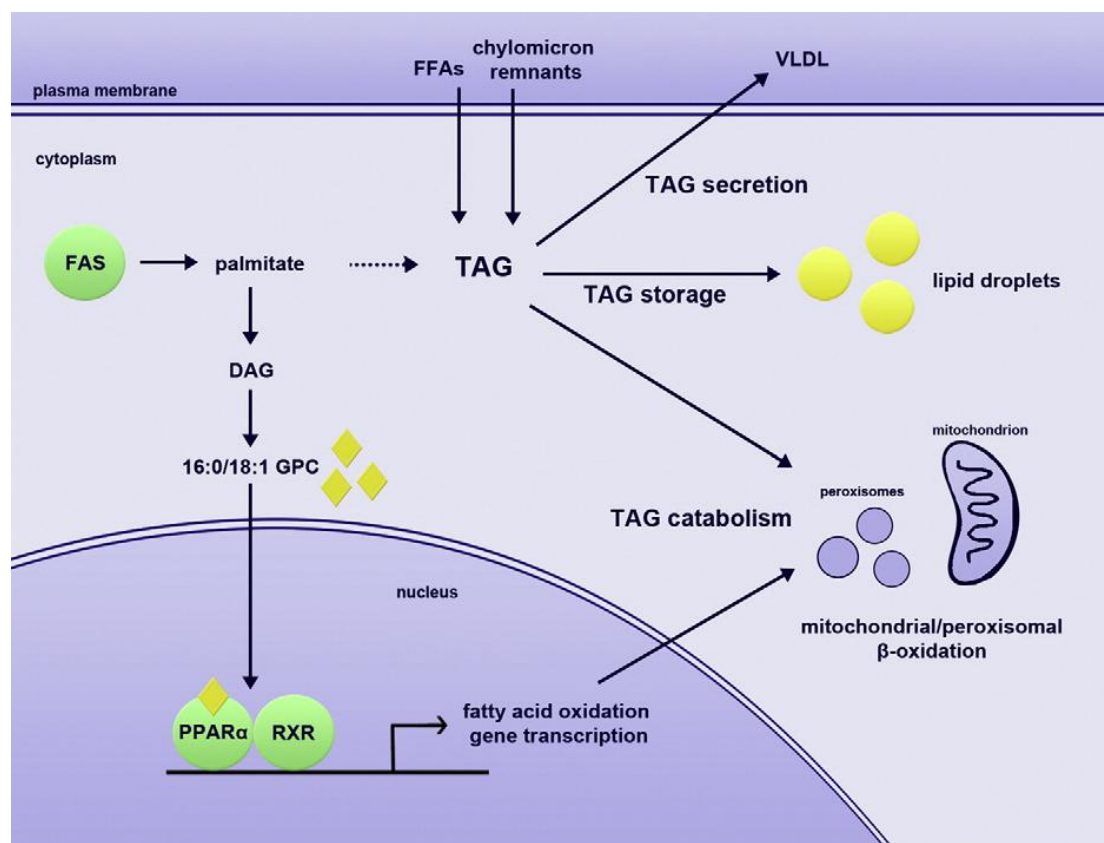


Figura 4. O papel da FAS no metabolismo hepático de triglicérides. GPC, 1-glicerofosfocolina; DAG, diacilglicerol; FAS, ácido graxo sintase; FFA, ácido graxo livre; PPAR α , receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa; RXR, receptor de retinóide X; TAG, triacilglicerol (triglicerídeo); VLDL, lipoproteína de densidade muito baixa (Smith et al., 2003).

A família PPAR de receptores nucleares são fatores de transcrição que afetam muitos processos metabólicos em resposta a uma variedade de ligantes semelhantes aos ácidos graxos (Nelson; Cox, 2014). Três proteínas, codificadas por genes distintos, já foram identificadas: PPAR α , PPAR β e PPAR γ (Figura 5). Os PPARs são fatores de transcrição ligantes dependentes que regulam a expressão do gene-alvo pela ligação a PPRES (elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma) específicos, situados em sítios regulatórios de cada gene. O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator proteico adicional, o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcripcionais, resultando em aumento na transcrição gênica (Tavares et al., 2007).

O PPAR α age no músculo, tecido adiposo e fígado para ativar um grupo de genes essenciais para a oxidação de ácidos graxos, incluindo os transportadores de ácidos graxos carnitina-aciltransferases I e II, acil-graxo-CoA-desidrogenases de cadeias acila curta, média longa e muito longa, além de enzimas relacionadas. Essa resposta é iniciada quando uma célula ou organismo aumenta a demanda por energia do catabolismo de gordura. Nos hepatócitos, ativa os genes necessários para a captação e β -oxidação dos ácidos graxos e a formação de corpos cetônicos durante o jejum (Nelson e Cox, 2014).

O PPAR γ é um regulador da oxidação de gorduras, age detectando alterações nas dietas lipídicas, atua no fígado e no músculo estimulando a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na β -oxidação e na dissipação de energia através do desacoplamento das mitocôndrias (Nelson e Cox, 2014).

O PPAR γ regula a expressão de numerosos genes nos adipócitos, envolvidos no metabolismo de lipídeos, e também controla a expressão da proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP-1) e CD36, ambos envolvidos na captação de lipídeos pelos adipócitos (Sfeir et al., 1997).

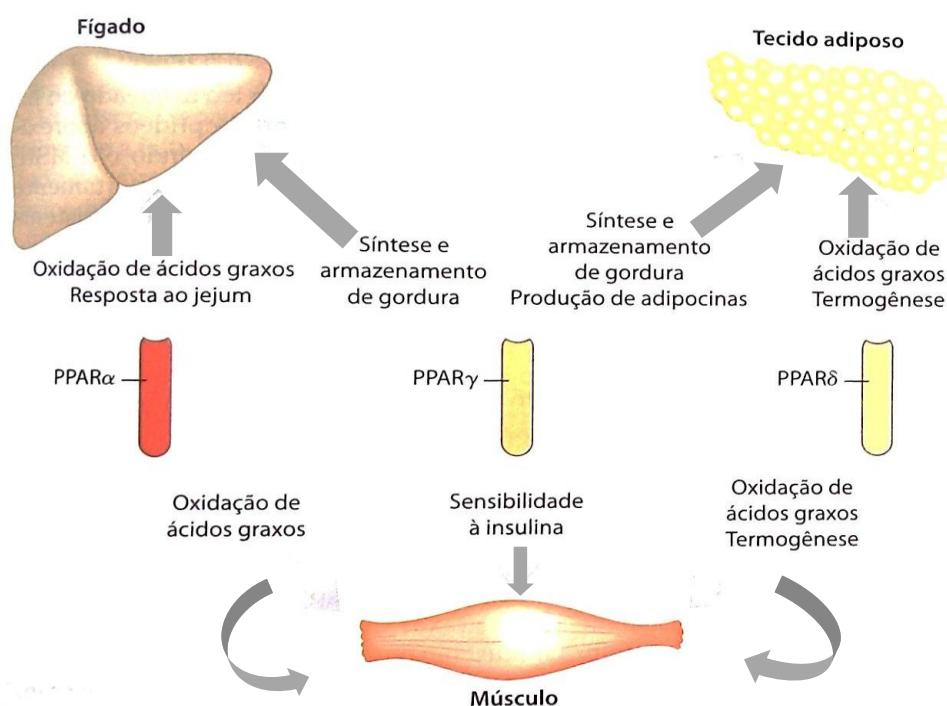


Figura 5. Integração metabólica pelos PPAR (Nelson e Cox, 2014).

O gene PPARGC1A codifica a proteína PGC-1 α que está envolvida na biogênese mitocondrial (Austin e St-Pierre, 2012). Também está envolvida na ativação transcricional de genes do metabolismo de glicose e lipídios (Puigserver et al., 1998) e na β -oxidação de ácidos graxos (Estall et al., 2009), garantindo a produção de ATP. Quando há falta de energia no organismo, ocorre um aumento na expressão de PGC-1, que, por sua vez, estimula a gliconeogênese e o metabolismo oxidativo de ácidos graxos (Yoon et al., 2001). Ainda, a PGC-1 α atua no controle de espécies reativas de oxigênio, ativando mecanismos de controle de estresse oxidativo (Austin e St-Pierre, 2012; Finkei, 2006).

As proteínas de ligação de elemento responsivo de esteroide (SREBPs) são fatores de transcrição codificados pelos genes SREBF1 e SREBF2. Essas proteínas funcionam como os eixos centrais no metabolismo lipídico (Bommer e Macdougald, 2011). O gene SREBF1 pertence à família SREBP, que atua na homeostase energética, glicólise, lipogênese e adipogênese (Eberle et al., 2004). Este gene expressa a proteína SREBP-1c, que age em genes relacionados à síntese de ácidos graxos (Shimano et al., 1997). O fator de transcrição SREBP-1c, um membro da família SREBP, ativa a síntese da piruvato-cinase, hexocinase IV, lipase lipoproteica, acetil-CoA-carboxilase e do complexo da ácido graxo-sintase que converte a acetil-CoA, produzida a partir do piruvato, em ácidos graxos para o armazenamento nos adipócitos. A SREBP-1c também reprime a expressão de várias enzimas gliconeogênicas como a glicose-6-fosfatase, PEP-carboxicinas e FBPase-1 (Nelson e Cox, 2014).

As SREBP estão inseridas no retículo endoplasmático (RE) quando recém sintetizadas. São mantidas no RE e complexadas à proteína SCAP, que por sua vez está ancorada à membrana do RE pela proteína Insig quando os níveis de colesterol e oxisterol estão altos. Quando os níveis de colesterol declinam, o complexo SCAP-SREBP é escoltado para o aparelho de Golgi, onde duas proteases liberam o domínio regulatório de SREBP; esse domínio entra no núcleo e ativa a transcrição dos seus genes-alvo e outras proteínas necessárias para a síntese de colesterol (Nelson e Cox, 2014). Estas etapas estão sumarizadas na Figura 6.

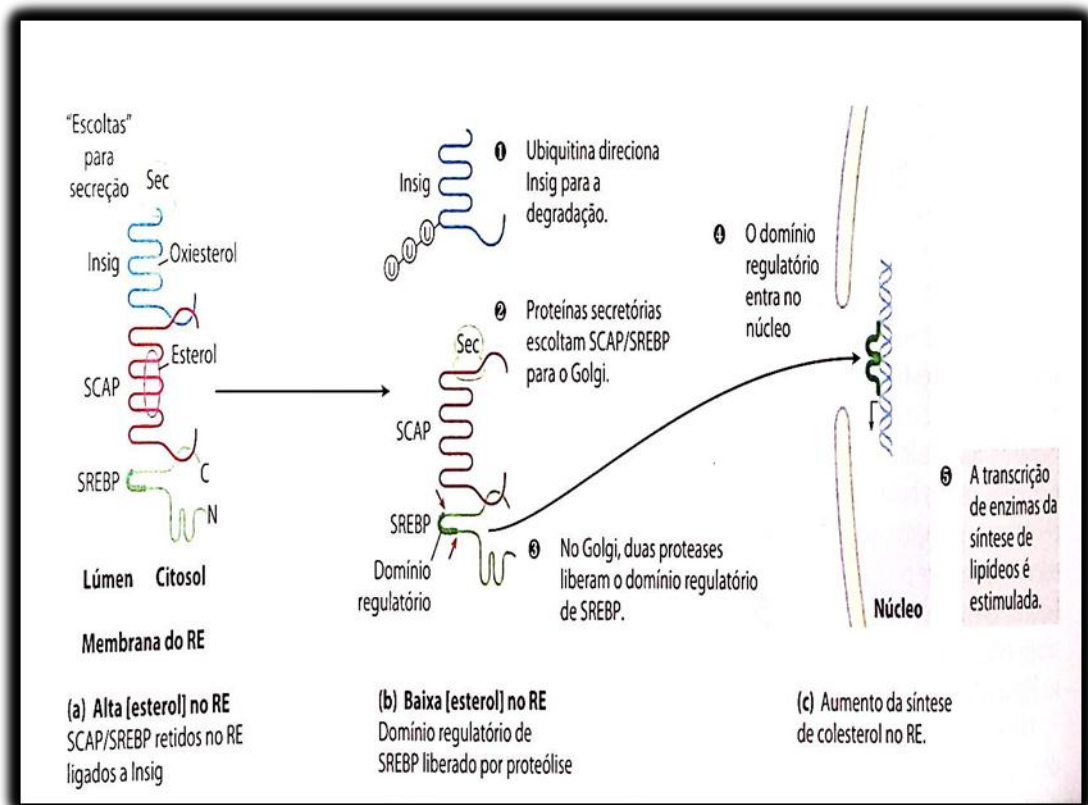


Figura 6. Regulação da síntese de colesterol pela SREBP (Nelson e Cox, 2014).

O receptor hepático X (RXH) é um fator de transcrição ativado por ligantes de oxiesteróis, que integra o metabolismo dos ácidos graxos e da glicose. Quando ligado a um oxiesterol, os RXH formam heterodímeros com um segundo tipo de receptor nuclear, os receptores X retinoides (RXR). Esse dímero (RXH-RXR) ativa a transcrição de genes (ACC, FAS, CYP7A1, ABCA, ABCG1, GLUT4, SREBP). Os reguladores transcricionais RXH e SREBP trabalham juntos para manter a homeostasia do colesterol (Nelson e Cox, 2014), como representado na Figura 7.

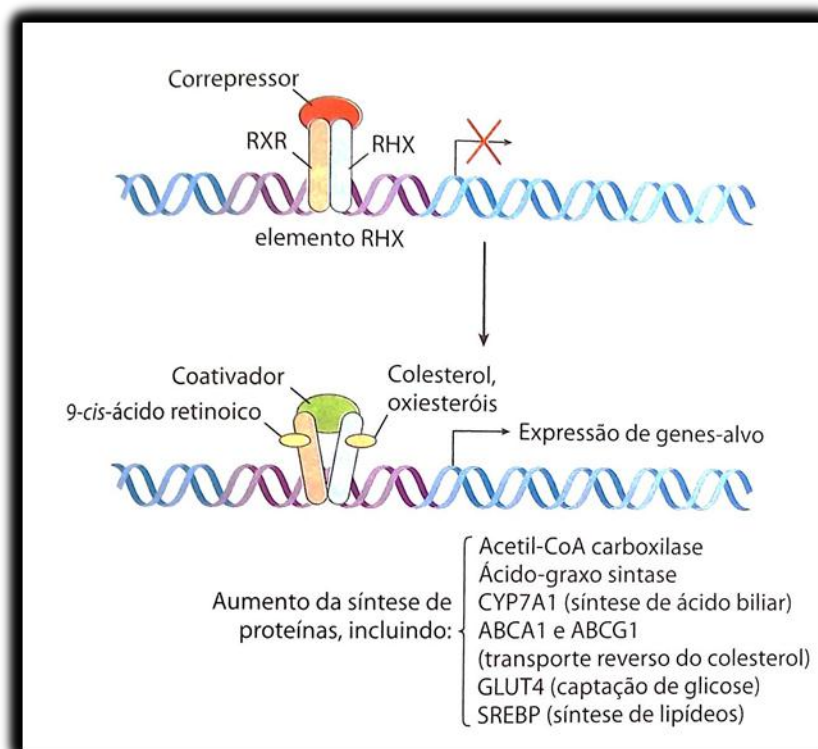


Figura 7. Atuação do dímero RXR-RHX sob a expressão de genes do metabolismo lipídico e da glicose (Nelson e Cox, 2014).

O gene HMGCS1 codifica uma enzima que está envolvida no metabolismo de colesterol. A utilização de soro fetal bovino no meio de cultura durante a produção *in vitro* está relacionada ao acúmulo de lipídeos, compostos por triglicerídeos e éster de colesterol, e com uma menor capacidade de criopreservação (Abe et al., 1999; Seidel jr, 2006). Um estudo verificou que os genes HMGCS1 e LDLR apresentaram menor expressão em blastocistos bovinos quando o meio de cultura continha soro fetal bovino, levando a um acúmulo de colesterol nos blastocistos (Cagnone e Sirard, 2014). Acredita-se que a presença de colesterol no meio altere a expressão gênica do embrião, tolerando concentrações de colesterol semelhantes às encontradas no meio de cultura, o que leva ao acúmulo destes lipídeos nos embriões (Sata et al., 1999).

2.6.9 Metabolismo de carboidratos

O gene SLC2A5 faz parte da via de transporte de glicose e expressa a proteína GLUT5 que esta relacionada exclusivamente com o transporte de frutose (Ostrowska et al., 2015; Burant et al., 1992). A glicose apresenta grande importância na oogênese e maturação do oócito (Herrick et al., 2006; Zheng et al., 2001). Também é necessária para embriões em cultura como substrato para vias regulatórias e biossintéticas (Leese et al., 1993; Martin e Leese, 1995; Martin e Leese, 1999). A proteína GLUT5 é expressa em bovinos no intestino delgado, rim, músculos, cérebro e tecido adiposo (Davidson et al., 1992). Ela também é encontrada no sêmen de muitas espécies conferindo a habilidade de utilizar a frutose como fonte de energia ou como ativadora do processo de fertilização (Douard e Ferraris, 2008). A regulação da expressão de GLUT5 é feita pela frutose, apresentando aumento de expressão na presença deste açúcar (David et al., 1995). Weijden et al. (2017) relatou que SLC2A5, um gene do metabolismo de frutose é mais expresso em embriões produzidos *in vivo* do que *in vitro*. No entanto, ao comparar o desenvolvimento de blastocistos produzidos pela fertilização *in vitro* ou ativação partenogenética, Gómez et al. (2009) não observaram diferença para a expressão de SLC2A5 nos blastocistos.

2.6.10 Estresse oxidativo

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os antioxidantes encontram-se em uma situação de equilíbrio. Quando este equilíbrio é quebrado e uma quantidade excessiva de ROS é liberada e ocorre o estresse oxidativo. Amin et al. (2014), examinaram a capacidade dos embriões para ativar a resposta ao estresse oxidativo mediado pelo nuclear factor, erythroid 2 like 2 (NRF2) sob um ambiente de estresse oxidativo. Os embriões oriundos da PIVE de 2, 4, 8, 16 células e blastocistos foram cultivados em baixa tensão de oxigênio (5%) ou alta tensão de oxigênio (20%). A expressão de NRF2, KEAP1 (inibidor de NRF2), foram analisados entre os grupos embrionários. Os níveis de expressão de NRF2 foram maiores em estágios de 8 células, 16 células e de blastocistos sob alta tensão de

oxigênio, enquanto que a expressão de KEAP1 foi regulada para baixo nas mesmas condições. Assim, a sobrevivência e a competência do desenvolvimento de embriões cultivados sob estresse oxidativo estão associados à atividade da via de resposta ao estresse oxidativo mediada por NRF2 durante o desenvolvimento embrionário no período de pré-implantação bovino.

Os fatores de transcrição FOXO são reguladores importantes da sobrevivência celular em resposta a uma variedade de estímulos de estresse, entre os quais o estresse oxidativo, o dano do DNA e a privação de nutrientes. Em resposta à hipoxia, os níveis de transcrição FOXO3a se acumulam de forma dependente de HIF1, resultando em atividade FOXO3a aprimorada. A transcrição de CITED2, um cofator de transcrição que funciona como um feedback negativo para controlar a atividade HIF1, é induzida por FOXO3a durante a hipoxia. Nos fibroblastos, bem como nas células de câncer de mama, FOXO3a inibe a apoptose induzida por HIF1, estimulando a transcrição de CITED2 assim, ao ajustar a atividade HIF1, FOXO3a desempenha um papel importante na resposta de sobrevivência de células normais e cancerosas em resposta ao estresse hipóxico (Bakker et al., 2007).

2.6.11 Predição da qualidade embrionária

Para uma fêmea se tornar gestante através da técnica de produção *in vitro* é necessário que o embrião seja de boa qualidade (Wdowiak et al., 2016). Pregl et al. (2013) mostraram uma correlação negativa entre a intensificação da fragmentação do DNA dos espermatozoides com a gestação e com a qualidade dos embriões na FIV convencional.

Após a fertilização, os fatores maternos hereditários dos oócitos inicialmente suportam e direcionam o desenvolvimento precoce do genoma embrionário quiescente na transcrição. Esses fatores maternos também são responsáveis pela reprogramação dos genomas das células somáticas ao estado embrionário após a transferência nuclear das células somáticas. O NANOG é um fator de transcrição crítico para a formação e manutenção da linhagem pluripotente da massa celular interna e das células tronco embrionárias. Nos blastocistos, a expressão de NANOG

é restrita a massa celular interna e ausente no trofocotoderma (Tachibana et al., 2009). As flutuações da transcrição na expressão de NANOG é um elemento essencial do estado pluripotente, a função de SOX2, OCT4 e NANOG é atuar como uma rede que promove e mantém o sinal transcricional para interferir nos sinais de diferenciação (Kalmar et al., 2009).

A manutenção da pluripotência e a especificação das linhagens celulares durante o desenvolvimento embrionário são controladas por redes reguladoras de transcrição, que coordenam conjuntos específicos de genes através da ativação e da repressão. O repressor transcricional REST desempenha papel regulador importante, mas distinto, nas células-tronco embrionárias e neurais. O perfil de recrutamento REST tem componentes duplos: um núcleo independente do desenvolvimento que é comum nas células-tronco embrionárias, neurais e células diferenciadas; e um grande conjunto de genes alvo nas células tronco embrionárias específicos. Nas células tronco embrionárias, a rede reguladora REST está altamente integrada aos fatores de pluripotência OCT4-SOX2-NANOG. (Johnson et al., 2008). Ambos os genes NANOG e REST são considerados marcadores de pluripotência sendo considerados marcadores de qualidade do embrião (Rodriguez-Alvarez e Velasquez, 2015; Khan et al., 2012; Kagalwala et al., 2008; Ding et al., 2008; Kong et al., 2016).

2.6.12 Resposta ao estresse

Visto que a produção *in vitro* esta relacionada a maiores índices de estresse oxidativo no embrião, o aumento da expressão de genes que auxiliam no combate a este estado contribui para a qualidade do mesmo. Um estudo realizado por Amin et al. (2014) relatou que embriões sob estresse oxidativo com maior expressão do gene NFE2L2 apresentaram maior taxa de sobrevivência.

Um dos principais fatores prejudiciais para a técnica de criopreservação de embriões é o dano causado pelo estresse oxidativo. Mehaisen et al. (2015) avaliaram o efeito da adição de melatonina no meio de cultivo fresco e no meio de vitrificação na produção de blastocistos em coelhos. A melatonina é conhecida como um antioxidante para neutralizar o estresse oxidativo. A adição de melatonina

aumentou a produção de blastocisto tanto em meio fresco como em meio de vitrificação em comparação com o grupo controle. A atividade das enzimas antioxidantes glutatona-s-transferase e superóxido dismutase aumentou significativamente pelo tratamento de melatonina em embriões frescos ou vitrificados, enquanto que os níveis dos substratos oxidativos peroxidação lipídica e óxido nítrico diminuíram. Além disso, a melatonina estimulou consideravelmente a expressão genes relacionados à resposta ao estresse oxidativo (GJA1, NFE2L2 e SOD1) em embriões comparados ao controle.

A proteína GPX4 é uma selenoproteína expressa em diversos tecidos que apresenta expressão elevada nas mitocôndrias das células germinativas masculinas de camundongos (Kryukov et al., 2003; Maiorino et al., 1998). A GPX4 é essencial para a embriogênese, função do tecido adulto e espermatogênese, sua função é prevenir a oxidação de fosfolípidos. A forma citosólica de GPX4 foi identificada como um regulador de uma nova forma de morte celular não apoptótica, enquanto que a isoforma mitocondrial de GPX4 (mGPX4) mostrou ser crucial para a fertilidade masculina (Ingold et al., 2015). Estudos mostram que a baixa expressão do gene GPX4 resulta em infertilidade em camundongos relacionada a anormalidades estruturais no espermatozoide e também a infertilidade em humanos (Imai et al., 2001; Imai et al., 2009; Schneider et al., 2009).

3. HIPÓTESES

A utilização de sêmen de touros da raça Nelore suplementados com AGs protegidos para finalidades de produção *in vitro* de embriões resulta em maiores taxas de produção de embriões.

Embriões produzidos a partir do sêmen de touros suplementados com AGs protegidos apresentam maior expressão de genes relacionados à qualidade embrionária e ao metabolismo de lipídios.

Embriões produzidos a partir do sêmen de touros de maior eficiência alimentar (baixo CAR) apresentam maior acúmulo de lipídio intracelular e maior expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios.

4. OBJETIVOS

Avaliar a produção *in vitro* de embriões com a utilização do sêmen de touros da raça Nelore, classificados para CAR e suplementados com AGs protegidos.

Avaliar o acúmulo de lipídios intracelulares e a expressão de genes relacionados à qualidade e ao metabolismo em embriões produzidos a partir do sêmen de touros da raça Nelore, classificados para CAR e suplementados ou não com AGs protegidos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local e animais

O experimento de campo foi realizado no Centro Avançado de Pesquisa em Bovinos de Corte de Sertãozinho/SP, que pertence ao Instituto de Zootecnia/APTA/SAA. Os procedimentos de cuidado e manuseio dos animais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus Jaboticabal (Protocolo nº 004635/18).

Os touros utilizados no experimento (*Bos taurus indicus*, da raça Nelore) foram selecionados pelo Instituto de Zootecnia (IZ), com base em maiores pesos aos 378 dias de idade e de acordo com o CAR, que foram obtidos ao final da prova de desempenho em confinamento, em um esquema denominado de seleção direcional. Para tanto, os animais foram desmamados aos 7 meses de idade e permaneceram em confinamento até o 378º dia de idade. Durante esse período, os animais foram alimentados em baias coletivas com cochos eletrônicos para registro do consumo alimentar (GrowSafe® Systems Ltd., Airdrie, Alberta, Canadá) durante 21 dias para adaptação e, na sequência, por mais 100 dias para registros do consumo alimentar individual e cálculo do CAR, seguido de mais 47 dias para obtenção do peso aos 378 dias. Os animais foram pesados, sem jejum, a cada 28 dias. O CAR foi calculado como o termo de erro da equação, conforme modelo proposto por Koch et al. (1963).

Ao final do teste de desempenho, os touros foram classificados em baixo CAR [$< \text{média} - 0,5 \text{ DP}$ (desvio padrão)], médio CAR ($\pm 0,5 \text{ DP}$) e alto CAR ($> \text{média} + 0,5 \text{ DP}$). Os 12 machos utilizados neste experimento foram selecionados dentro das classes extremas de CAR, sendo 6 animais baixo CAR (CAR-) e 6 alto CAR (CAR+), os quais apresentaram valores médios de $-0,86 \pm 0,08$ e $0,73 \pm 0,08$ respectivamente.

5.2. Delineamento experimental

Após a seleção dos animais de acordo com o CAR, os mesmos foram aleatoriamente subdivididos em dois grupos experimentais, de acordo com o suplemento nutricional que receberam: (1) animais alimentados com 1,25 kg/animal/dia de suplemento controle (grupo Controle: recebeu dieta base); e (2) animais suplementados com 1 kg/animal/dia de uma dieta enriquecida com ácidos graxos protegidos [grupo Megalac: dieta base enriquecida com 200 g de Megalac-E® (Química Geral do Nordeste, Rio de Janeiro, Brazil), que consiste principalmente de gordura bypass derivada de óleo de soja rico em ácido linoleico]. Desta forma, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 2 (2 categorias de CAR x 2 suplementações dietéticas), sendo composto por quatro tratamentos: CAR+ suplementado com dieta Controle (n=3); CAR+ suplementado com Megalac (n=3); CAR- suplementado com dieta Controle (n=3); CAR- suplementado com Megalac (n=3). O esquema ilustrativo dos grupos experimentais pode ser visualizado na Figura 8.

A idade média e o peso médio dos touros no início do experimento foram, respectivamente, $14,3 \pm 0,13$ meses e $348,67 \pm 5,43$ kg. A média do peso inicial e final dos animais CAR+ foi de 380,95 Kg e 508,08 Kg, respectivamente; a média do peso inicial e final dos animais CAR- foi de 398,08 Kg e 534,29, respectivamente. As avaliações de ECC foram pontuadas em escala de 0 a 9 para animais extremamente magros e gordos, respectivamente (Wagner et al., 1988), sendo que a média do ECC foi de 6,15 para animais CAR+ e 6,19 para animais CAR-.

Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv Marandu, com lotação contínua e taxa de lotação fixa, distribuídos em duas pastagens de 6 hectares (ha), cada uma com taxa de lotação inicial de 1,7 unidade animal (AU) / ha (2,0 animais/ha). Os piquetes foram equipados com calha coletiva coberta (comprimento 180 cm x largura 60 cm) para fornecer o suplemento pela manhã. Os animais tinham livre acesso à água potável e à suplementação mineral (Raçaphós 80 FE STZ, Brasil Química Indústria e Com. Ltda, Batatais, Brazil).

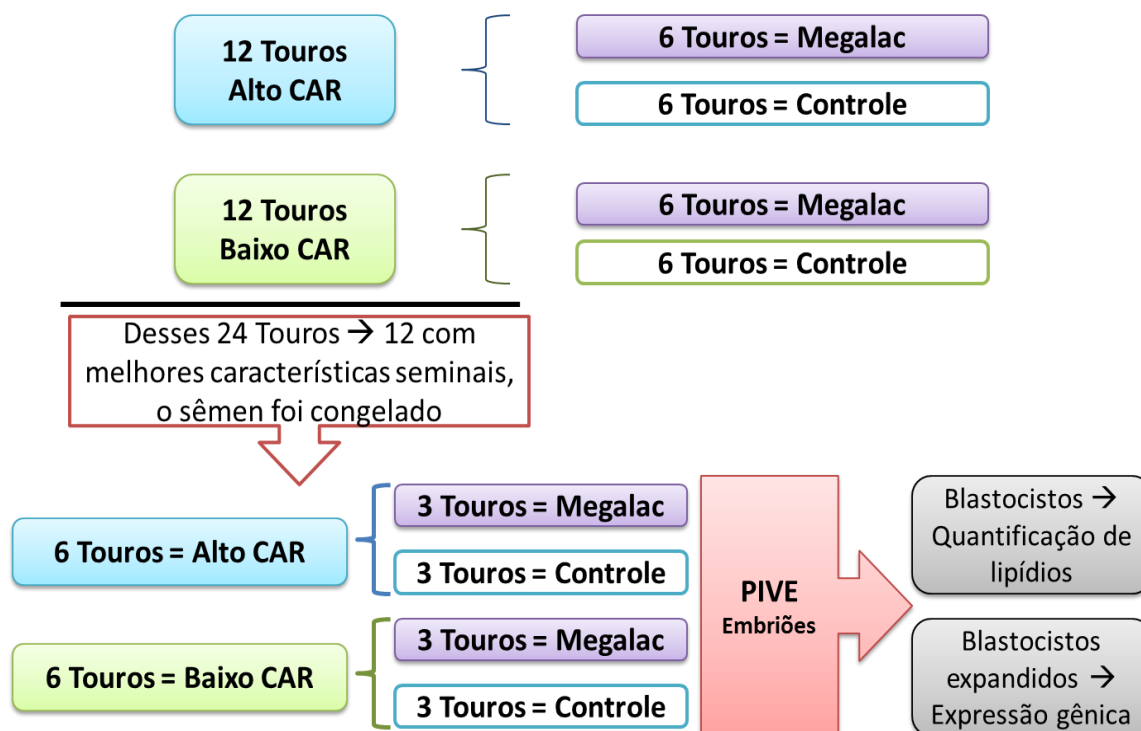


Figura 8. Esquema ilustrativo do delineamento experimental: animais suplementados ou não com dieta enriquecida com ácidos graxos (Megalac) e classificados de acordo com o consumo alimentar residual (CAR) nas categorias CAR+ e CAR-.

Os concentrados experimentais foram formulados para atender às exigências de machos em crescimento e serem isoproteicos e isoenergéticos, de modo que os animais do grupo controle receberam 0,25 kg a mais de suplemento por dia do que os animais tratados com Megalac. Os suplementos foram fornecidos na mesma quantidade ao longo do ano. A composição dos suplementos das dietas está apresentada na Tabela 1.

Os animais foram suplementados com as dietas experimentais por um período de 10 meses (dos $14,3 \pm 0,13$ aos $24,6 \pm 0,13$ meses de idade). Ao final do experimento de campo, o sêmen dos animais foi colhido e congelado para ser posteriormente utilizado para os procedimentos de produção *in vitro* dos embriões.

Tabela 1. Percentual dos ingredientes e composição química dos suplementos fornecidos para os animais, de acordo com os tratamentos

Ingredientes (%)	Suplementos*	
	Megalac	Controle
Farelo de milho	43	78
Farelo de soja	34	19
Mineral ¹	3	3
Megalac-E ²	20	0
Composição Química³		
MS (%)	87,76	85,37
MM (%MS)	4,95	1,97
PB (%MS)	21,90	18,32
EE (%MS)	19,81	4,49
FDN (%MS)	10,72	12,45
FDA (%MS)	4,44	4,75
Lignina (%MS)	0,68	0,78
FDNi (%MS)	14,50	6,86
NDT (%MS)	99,08	77,83

* Foram fornecidos 250 g a mais de suplemento/animal/dia ao grupo Controle com objetivo de fornecer dietas isoprotéicas para ambos os tratamentos (NRC, 2000; nível 2). ¹ Composição/kg: Fósforo (min), 8%; Cálcio (min e máx), 15% a 17%; Sódio (min), 14,5%; Enxofre (min), 1,2%; Cobalto (min), 0,0021%; Cobre (min), 0,016%; Iodo (min), 0,0018%; Manganês (min), 0,014%; Selênio (min), 0,00027%; Zinco (min), 0,045%; Níquel (min), 0,00011%; Flúor (min), 0,008%. ² Composição Megalac (Nível de garantia) = Extrato Etéreo, min 850 g/kg; Cálcio, min 75 g/kg - máx 125 g/kg; Umidade, máx 50 g/kg; Matéria Mineral, máx 200 g/kg; Energia Metabólica (Baseada no NRC, 2001), mín 6300 kcal/kg; Ácido Linoleico (n6), min 350 g/kg; Ácido Linolênico (n3), min 20 g/kg. ³ MS = Matéria seca; MM = matéria mineral; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; FDA = fibra insolúvel em detergente ácido; Lignina; FDNi = fibra insolúvel em detergente neutro indigestível; NDT = nutrientes digestíveis totais, estimado de acordo com Detmann, Valadares Filho e Paulino (2010).

5.3. Avaliação e criopreservação do sêmen

O sêmen dos animais foi colhido com auxílio de eletroejaculador Autojac (Neovet, Uberaba, Brasil) a intervalos regulares de 28 dias durante o período de suplementação nutricional (dados não demonstrados). O objetivo das colheitas seriadas foi avaliar as características físicas do ejaculado (motilidade, concentração, vigor e porcentagem de defeitos), de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Cbra, 2013). Na última colheita (aos $24,6 \pm 0,13$ meses de idade), o sêmen de todos os animais foi considerado apto para a criopreservação (Cbra, 2013), apresentando motilidade total $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 , defeitos maiores $\leq 10\%$, defeitos totais $\leq 30\%$ e concentração $\geq 350 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

Para criopreservação, as amostras de sêmen foram diluídas para uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides/mL em BotuBov (BotuPharma, Botucatu, SP) contendo 7% de glicerol como crioprotetor e então foram envazadas em palhetas de 0,5 mL à temperatura ambiente. Os procedimentos para refrigeração e congelamento foram realizados conforme descrito por Campanholi et al. (2017). Todas as palhetas dos grupos experimentais foram submetidas concomitantemente à criopreservação.

5.4. Produção *in vitro* de embriões

Os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da empresa Sigma (Chemical Co. St Louis, MO, USA). Caso contrário, encontram-se especificados no texto.

Ovários de vacas abatidas em abatedouro foram transportados para o laboratório a uma temperatura entre 30-35 °C. Os complexos cumulus-oócito (COCs) foram aspirados de folículos antrais (3 a 8 mm de diâmetro), e os oócitos com pelo menos quatro camadas de células do cumulus e com citoplasma homogêneo foram selecionados para os experimentos. Os COCs selecionados foram lavados e cultivados em poços contendo 400 μ L (30 oócitos por poço) de meio MIV, que consistiu de TCM-199 (Gibco BRL Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado

com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco BRL Invitrogen), 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bionique Animal Health, Ontario, Canadá) e 100 UI/mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier), sem óleo mineral. Os complexos cumulus-oócitos foram cultivados por 22 horas a 38,5° C, sob atmosfera de 5% de CO₂ em ar, com máxima umidade.

Após a maturação, os oócitos foram divididos em 12 gotas e submetidos à fecundação *in vitro* com o sêmen individual de cada um dos 12 touros do experimento (sendo 3 touros de cada tratamento, conforme especificado acima). As palhetas de sêmen dos 12 touros foram simultaneamente descongeladas a 37° C por 30 segundos e os conteúdos foram centrifugados separadamente em gradiente de densidade descontínua de Percoll (GE Healthcare, Bio-Science, Uppsala, Sweden) por 7 minutos a 2300g e, a seguir, em meio TALP (Parrish et al., 1988) por 5 minutos a 690g. Os COCs e os espermatozoides (400 x 10³ espermatozoides por poço de 400 µL) de cada touro foram coincubados por 18 horas a 38,5 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, com umidade máxima. O dia da fertilização foi definido como o dia 0 (D0).

Os prováveis zigotos foram cultivados em grupos de no máximo 30 estruturas por poço de 400 µL de meio SOF (Vajta et al., 1999) suplementado com 0,5% BSA e 2,5% SFB, sem óleo mineral, a 38,5 °C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar e máxima umidade. As taxas de clivagem foram avaliadas em microscópio estereoscópico às 72 horas após a inseminação (h.p.i.) e as taxas de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto foram avaliadas às 168 h.p.i. (D7).

Os blastocistos e blastocistos iniciais obtidos no D7, oriundos de cada grupo de 3 touros pertencentes a um mesmo grupo experimental, foram agrupados e analisados quanto ao conteúdo lipídico. Já os blastocistos expandidos foram lavados com PBS livre de cálcio e magnésio e submetidos ao procedimento de congelamento rápido (“snap freezing”), sendo então armazenados em freezer -80°C até o momento das análises quanto ao acúmulo de transcritos.

5.5. Quantificação lipídica dos embriões

Para avaliação do acúmulo lipídico intracitoplasmático, os blastocistos obtidos no D7 foram lavados duas vezes em PBS e foram fixados em solução de paraformoldeído (4%) à temperatura ambiente, por 2 horas. Posteriormente foram lavados em PBS e imersos em solução de etanol 50% em água destilada, durante 2 minutos. Em seguida, foram corados com Sudan Black B 1% diluído em etanol 70%, por 2 minutos. Logo após, foram imersos 3 vezes, por 5 minutos cada, em solução de etanol 50% e, em seguida, em água destilada acrescida de 1% PVP. Os embriões foram então montados em lâminas com glicerol e foram analisados e fotografados em microscópio com contraste diferencial de interferência de fase (Eclipse NI-U, Nikon, Tóquio, Japão). As imagens convertidas em escala de cinza foram analisadas pelo programa Image J versão 1.50b (National Institutes of Health, USA) para determinação da área e da intensidade média de pixels pela área delimitada de cada embrião.

5.6. Extração do RNA e transcrição reversa

Para análise da expressão gênica, foram utilizados 3 pools de 9 blastocistos expandidos (cada pool continha 3 embriões de cada um dos 3 touros pertencentes a um mesmo grupo experimental). O RNA total foi extraído com auxílio do kit RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, incluindo o tratamento com DNase. A eluição foi feita com 20 µL de água ultrapura tratada com dietil pirocarboanato (DEPC). A concentração total de RNA foi avaliada através do NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e a integridade do RNA foi analisada usando o sistema 2100-Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com o kit 6000 Pico Kit (Agilent Technologies).

A transcrição reversa (RT) do mRNA foi realizada utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante.

5.7. Expressão gênica

A análise de expressão gênica dos embriões foi feita através do sistema de micro-fluídica Biomark HD (Fluidigm®, South San Francisco, CA, USA). Para avaliação da expressão dos genes selecionados (Quadro 1), foi utilizado o ensaio Applied Biosystems™ TaqMan® Assays, específico para *Bos taurus*, incluindo os genes controles endógenos (*B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *PPIA* e *SDHA*). Cada amostra foi submetida a um processo de pré-amplificação utilizando-se TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, #4391128). Os produtos pré-amplificados foram diluídos 7 vezes e foram então analisados por reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) usando TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e TaqMan assays (20X, Applied Biosystems) em 96.96 Dynamic Array Integrated Fluidic Circuits no sistema Biomark HD System (Fluidigm). O protocolo utilizado foi o TaqMan GE 96x96 Standard, de acordo com as recomendações do fabricante. Para verificar a estabilidade da abundância de transcrição dos controles endógenos utilizados neste estudo, os genes referência foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e do algoritmo GeNorm (Vandesompele et al., 2002). O gene mais estável foi considerado aquele que teve valor de $M < 1.5$. O cycle threshold (Ct) de cada gene de interesse foi normalizado pela média geométrica dos controles endógenos (*B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *PPIA* e *SDHA*) para gerar os valores de delta Ct (ΔCt) que foram utilizados nas análises estatísticas. Posteriormente, o valor de ΔCt das amostras tratadas foi normalizado pela amostra do grupo controle (que foi o grupo Controle CAR+) para calcular o delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). O *fold change* foi calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relativo às amostras do grupo controle e os respectivos valores resultantes foram utilizados nas representações gráficas.

Quadro 1. Genes selecionados para avaliação de expressão gênica por RT-qPCR em embriões bovinos

Símbolo	Identidade*	Nome	Função
<i>BAX</i>	280730	BCL-2 associated protein X	Apoptose
<i>BCL-2</i>	281020	B-cell lymphoma protein 2	Apoptose
<i>BID</i>	510373	BH3 Interacting Domain Death Agonist	Apoptose
<i>CASP3</i>	408016	Caspase 3	Apoptose
<i>CASP9</i>	100140945	Caspase 9	Apoptose
<i>CDX2</i>	618679	Caudal Type Homeobox 2	Diferenciação e implantação
<i>IFNT2/IFNT3/IFNT</i>	317698	Interferon-tau-2	Diferenciação e implantação
	100313956	Interferon-tau-3	
	100313957	Interferon-tau	
<i>PLAC8</i>	509228	Placenta Specific 8	Diferenciação e implantação
<i>GSK3A</i>	536561	Glycogen Synthase Kinase 3 Alpha	Desenvolvimento embrionário
<i>HMOX1</i>	513221	Heme Oxygenase 1	Desenvolvimento embrionário
<i>OTX2</i>	538953	Orthodenticle Homeobox 2	Desenvolvimento embrionário
<i>PA2G4</i>	540272	Proliferation-Associated 2G4	Desenvolvimento embrionário
<i>POU5F1</i>	282316	POU Class 5 Homeobox 1	Desenvolvimento embrionário

<i>PRDX1</i>	281997	Peroxiredoxin 1	Desenvolvimento embrionário
<i>RPLP0</i>	286868	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0	Desenvolvimento embrionário
<i>S100A10</i>	282466	S100 Calcium Binding Protein A10	Desenvolvimento embrionário
<i>S100A14</i>	618250	S100 Calcium Binding Protein A14	Desenvolvimento embrionário
<i>ATF4</i>	509107	Activating Transcription Factor 4	Estresse do retículo endoplasmático
<i>CPT1B</i>	509459	Carnitine Palmitoyltransferase 1B	Estresse do retículo endoplasmático
<i>CPT2</i>	504502	Carnitine Palmitoyltransferase 2	Estresse do retículo endoplasmático
<i>DDIT3</i>	777788	DNA Damage Inducible Transcript 3	Estresse do retículo endoplasmático
<i>H2AFZ</i>	287016	H2A Histone Family Member Z	Regulação epigenética
<i>H3F3A</i>	326601	H3 Histone Family Member 3A	Regulação epigenética
<i>H3F3B</i>	617051	H3 Histone Family Member 3B	Regulação epigenética
<i>HDAC2</i>	407223	Histone Deacetylase 2	Regulação epigenética
<i>AKR1B1</i>	317748	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B	Metabolismo da glicose
<i>PGK1</i>	507476	Phosphoglycerate Kinase 1	Metabolismo da glicose
<i>HSF1</i>	506235	Heat Shock Transcription Factor 1	Resposta ao choque térmico
<i>HSP90AA1</i>	281832	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1	Resposta ao choque térmico
<i>HSPA1A</i>	282254	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A	Resposta ao choque térmico

<i>HSPA5</i>	415113	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5	Resposta ao choque térmico
<i>HSPD1</i>	511913	Heat Shock Protein Family D (Hsp60) Member 1	Resposta ao choque térmico
<i>ACACA</i>	281590	Acetyl-CoA Carboxylase Alpha	Metabolismo de lipídio
<i>ACAT1</i>	511082	Acetyl-CoA Acetyltransferase 1	Metabolismo de lipídio
<i>ACSL1</i>	537161	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 1	Metabolismo de lipídio
<i>ACSL3</i>	100138312	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 3	Metabolismo de lipídio
<i>AGPAT1</i>	282137	1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 1	Metabolismo de lipídio
<i>AGPAT9</i>	519739	1-Acylglycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase 9	Metabolismo de lipídio
<i>CD36</i>	281052	CD36 Molecule	Metabolismo de lipídio
<i>DGAT1</i>	282609	Diacylglycerol O-Acyltransferase 1	Metabolismo de lipídio
<i>ELOVL1</i>	540348	ELOVL Fatty Acid Elongase 1	Metabolismo de lipídio
<i>ELOVL2</i>	615756	ELOVL Fatty Acid Elongase 2	Metabolismo de lipídio
<i>ELOVL3</i>	539782	ELOVL Fatty Acid Elongase 3	Metabolismo de lipídio
<i>ELOVL4</i>	532015	ELOVL Fatty Acid Elongase 4	Metabolismo de lipídio
<i>ELOVL5</i>	617293	ELOVL Fatty Acid Elongase 5	Metabolismo de lipídio
<i>ELOVL6</i>	533333	ELOVL Fatty Acid Elongase 6	Metabolismo de lipídio
<i>FADS2</i>	521822	Fatty Acid Desaturase 2	Metabolismo de lipídio

<i>FASN</i>	281152	Fatty Acid Synthase	Metabolismo de lipídio
<i>FDX1</i>	281157	Ferredoxin 1	Metabolismo de lipídio
<i>GPAM</i>	497202	Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase, Mitochondrial	Metabolismo de lipídio
<i>LIPE</i>	286879	Lipase E, Hormone Sensitive Type	Metabolismo de lipídio
<i>LPL</i>	280843	Lipoprotein Lipase	Metabolismo de lipídio
<i>PLIN2</i>	280981	Perilipin 2	Metabolismo de lipídio
<i>PLIN3</i>	767984	Perilipin 3	Metabolismo de lipídio
<i>PNPLA2</i>	508493	Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2	Metabolismo de lipídio
<i>PPARA</i>	281992	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha	Metabolismo de lipídio
<i>PPARG</i>	281993	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma	Metabolismo de lipídio
<i>PPARGC1A</i>	338446	PPARG Coactivator 1 Alpha	Metabolismo de lipídio
<i>SCD</i>	280924	Stearoyl-CoA Desaturase	Metabolismo de lipídio
<i>SREBF1</i>	539361	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1	Metabolismo de lipídio
<i>SREBF2</i>	507102	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 2	Metabolismo de lipídio
<i>AQP3</i>	780866	Aquaporin 3 (Gill Blood Group)	Metabolismo
<i>G6PD</i>	281179	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase	Metabolismo
<i>HMGCS1</i>	407767	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 1	Metabolismo

<i>LUM</i>	280847	Lumican	Metabolismo
<i>SLC2A1</i>	282356	Solute Carrier Family 2 Member 1	Metabolismo
<i>SLC2A3</i>	282358	Solute Carrier Family 2 Member 3	Metabolismo
<i>SLC2A4</i>	282359	Solute Carrier Family 2 Member 4	Metabolismo
<i>SLC2A5</i>	282868	Solute Carrier Family 2 Member 5	Metabolismo
<i>FOXO3</i>	535530	Forkhead Box O3	Estresse oxidativo
<i>KEAP1</i>	532791	Kelch Like ECH Associated Protein 1	Estresse oxidativo
<i>TFAM</i>	510059	Transcription Factor A, Mitochondrial	Estresse oxidativo
<i>ATP5L</i>	515696	ATP Synthase, H ⁺ Transporting, Mitochondrial Fo Complex Subunit G	Predição da qualidade embrionária
<i>CLIC3</i>	505436	Chloride Intracellular Channel 3	Predição da qualidade embrionária
<i>IGF1R</i>	281848	Insulin Like Growth Factor 1 Receptor	Predição da qualidade embrionária
<i>IGFBP2</i>	282260	Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2	Predição da qualidade embrionária
<i>KRT8</i>	281269	Keratin 8	Predição da qualidade embrionária
<i>MTIF3</i>	509987	Mitochondrial Translational Initiation Factor 3	Predição da qualidade embrionária
<i>NANOG</i>	538951	Nanog Homeobox	Predição da qualidade embrionária
<i>NDUFA1</i>	327673	NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A1	Predição da qualidade embrionária

<i>PRDX3</i>	281998	Peroxiredoxin 3	Predição da qualidade embrionária
<i>REST</i>	507148	RE1 Silencing Transcription Factor	Predição da qualidade embrionária
<i>GPX1</i>	281209	Glutathione Peroxidase 1	Resposta ao estresse
<i>GPX4</i>	286809	Glutathione Peroxidase 4	Resposta ao estresse
<i>HIF1A</i>	281814	Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit	Resposta ao estresse
<i>NFE2L2</i>	497024	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2	Resposta ao estresse
<i>SOD1</i>	281495	Superoxide Dismutase 1	Resposta ao estresse
<i>SOD2</i>	281496	Superoxide Dismutase 2	Resposta ao estresse

5.8. Análise estatística

Os dados foram analisados considerando um arranjo fatorial que inclui o efeito de CAR (CAR- ou CAR+), o suplemento alimentar (Controle ou Megalac) e interações. Quando um efeito significativo foi encontrado, as comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey. Na ausência de interações significativas, apenas os efeitos principais estão apresentados graficamente.

O experimento foi repetido 6 vezes, em replicatas independentes. Em cada replicata, um poço contendo no máximo 30 oócitos foi considerado a unidade experimental para as variáveis do desenvolvimento embrionário. As taxas de desenvolvimento embrionário foram analisadas pela fração de oócitos cultivados atingindo os estágios determinados de desenvolvimento, reportadas em termos de porcentagem. As porcentagens foram transformadas em arco seno. Para a análise de concentração intracelular de lipídios, a unidade experimental foi cada embrião individual. As médias estão apresentadas na forma de quadrados mínimos \pm erro padrão da média (EPM).

Os resultados de expressão gênica estão apresentados nos gráficos como fold change relativo ao grupo controle (grupo Controle CAR+), todavia, as comparações estatísticas foram realizadas utilizando-se os valores de Δ Ct relativo aos genes endógenos (Anexo 1). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados não paramétricos foram transformados em log e submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's para comparação das médias.

As análises foram realizadas pelo programa JMP (versão 5.0.1, SAS Institute). Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

6. RESULTADOS

6.1 Produção *in vitro* de embriões

Foi investigado o efeito da seleção com base na eficiência alimentar (CAR) e da suplementação nutricional com ácidos graxos poliinsaturados por tempo prolongado em touros jovens da raça Nelore sobre a fecundidade *in vitro* do sêmen, avaliando-se o desenvolvimento embrionário inicial até a fase de blastocisto. Os resultados da ANOVA não identificaram interação entre CAR e suplementação para as taxas de clivagem ($P=0,3855$) e blastocistos ($P=0,6284$), de maneira que os resultados são apresentados separadamente, como variáveis independentes (Figuras 9 e 10).

Não houve efeito de CAR sobre as taxas de clivagem ($P=0,7058$) e de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* ($P=0,3335$) a partir do sêmen dos animais com diferentes eficiências alimentares. Os resultados podem ser visualizados na Figura 9.

Os efeitos da suplementação alimentar são apresentados na Figura 10. Não houve efeito da dieta sobre as taxas de clivagem ($P=0,7412$) e de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* ($P=0,7692$) a partir do sêmen dos animais dos diferentes tratamentos.

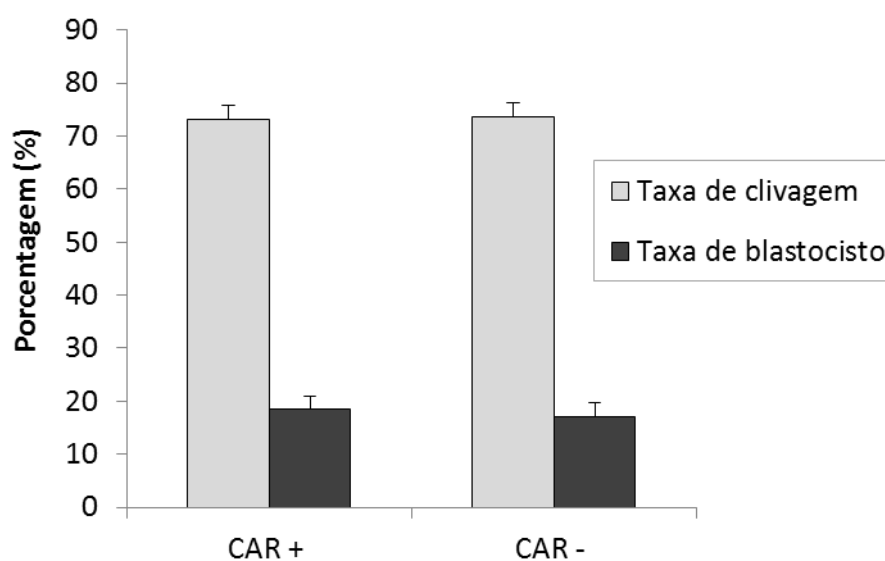


Figura 9. Clivagem e desenvolvimento *in vitro* de embriões produzidos com sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR). Número de oócitos cultivados: CAR+ (n=1108) e CAR- (n=1101). Os dados estão apresentadas na forma de média dos quadrados mínimos \pm EPM. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P>0,05$; teste de Tukey).

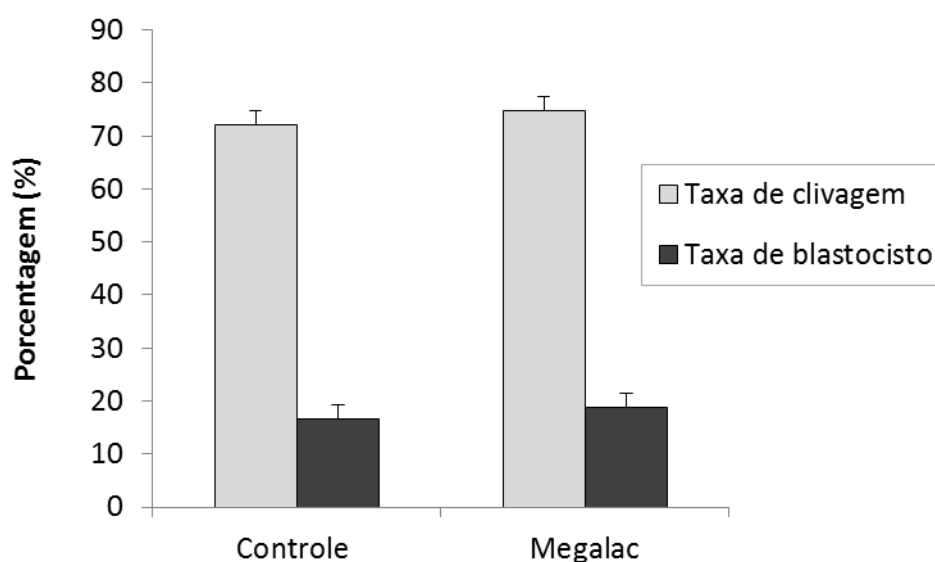


Figura 10. Clivagem e desenvolvimento *in vitro* de embriões produzidos com sêmen de touros jovens Nelore suplementados ou não com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Número de oócitos cultivados: Controle (n=1117) e Megalac (n=1092). Os dados estão apresentadas na forma de média dos quadrados mínimos \pm EPM. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P>0,05$; teste de Tukey).

6.2 Conteúdo lipídico intracitoplasmático em embriões produzidos *in vitro*

Foi avaliado o conteúdo lipídico (quantificado em intensidade de pixels pela área do embrião) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, a partir de sêmen de touros jovens da raça Nelore selecionados com base no CAR e suplementados ou não com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados por tempo prolongado (Figura 10). Não houve interação dieta x CAR sobre o conteúdo lipídico intracelular ($P=0,4030$), de maneira que os resultados são apresentados separadamente, como variáveis independentes (Figuras 11 e 12). Embriões produzidos com sêmen de animais de menor eficiência alimentar (CAR+) exibiram maior ($P=0,0325$) acúmulo de lipídeo em comparação com embriões produzidos com sêmen de animais eficientes (CAR-). Todavia, não houve efeito da dieta ($P=0,7005$) sobre o acúmulo de lipídeo de embriões produzidos *in vitro* a partir do sêmen dos animais dos diferentes tratamentos.

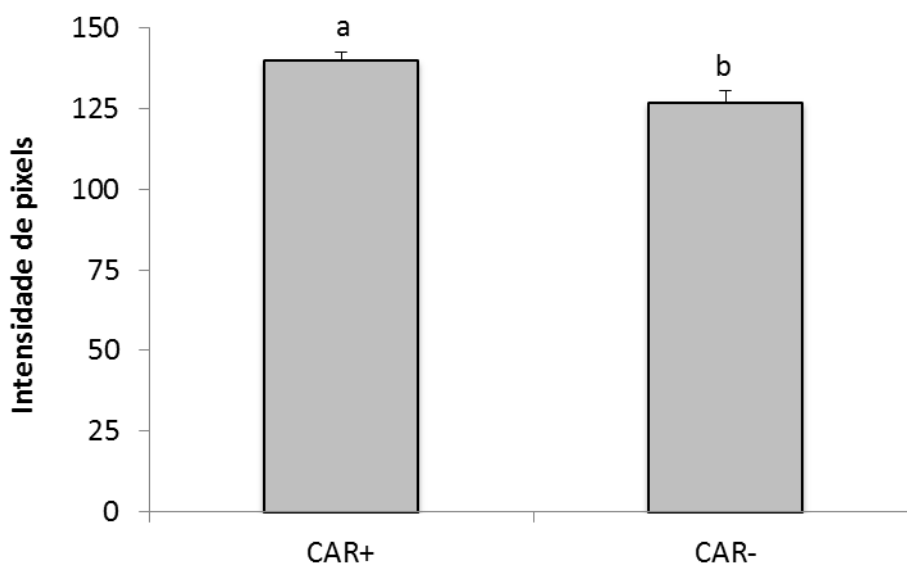


Figura 11. Conteúdo lipídico intracelular de embriões bovinos produzidos *in vitro* com sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR). Número de embriões avaliados: CAR+ (n=58) e CAR- (n=49). Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos \pm EPM. Valores com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($P<0,05$, teste de Tukey).

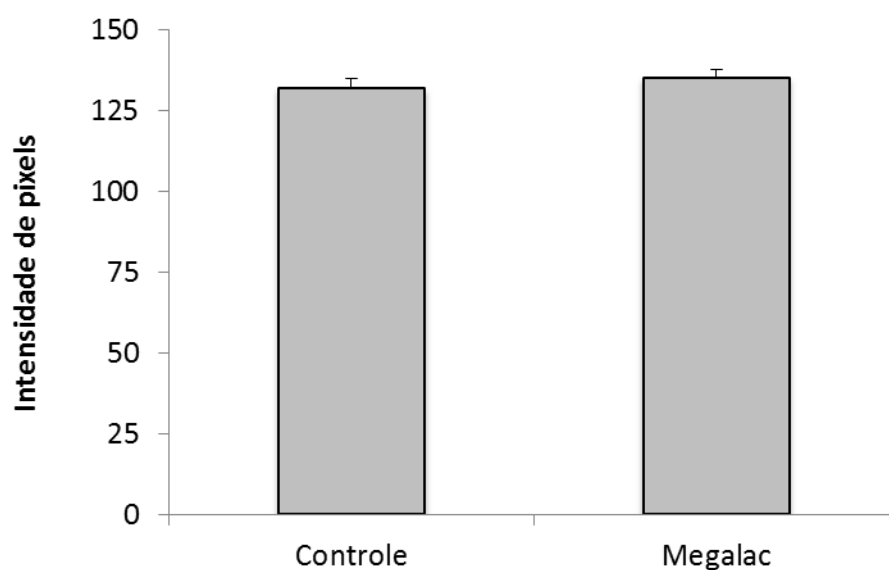


Figura 12. Conteúdo lipídico intracelular de embriões bovinos produzidos *in vitro* com sêmen de touros jovens Nelore suplementados ou não com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Número de embriões avaliados: Controle (n=54) e Megalac CAR+ (n=53). Os dados estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos \pm EPM. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$; teste de Tukey).

6.3 Expressão gênica

Efeito de CAR

Não houve interação dieta x CAR sobre o acúmulo de transcritos dos genes *PLAC8* ($P=0,0,3977$), *PPARGC1A* ($P=0,3948$) e *NFE2L2* ($P=0,7310$), de maneira que os resultados são apresentados separadamente, como variáveis independentes (Figuras 13 a 15). Os resultados referentes à análise destes genes estão apresentados no Anexo 1, sendo apresentados graficamente apenas os resultados que identificaram diferenças estatísticas do efeito de CAR.

O acúmulo relativo de transcritos do gene *PLAC8*, relacionado à diferenciação e implantação, foi afetado pela eficiência alimentar paterna ($P=0,0028$), sendo observada menor expressão em embriões derivados do sêmen de animais menos eficientes (CAR+) do que de animais CAR- (Figura 13 e Anexo 1).

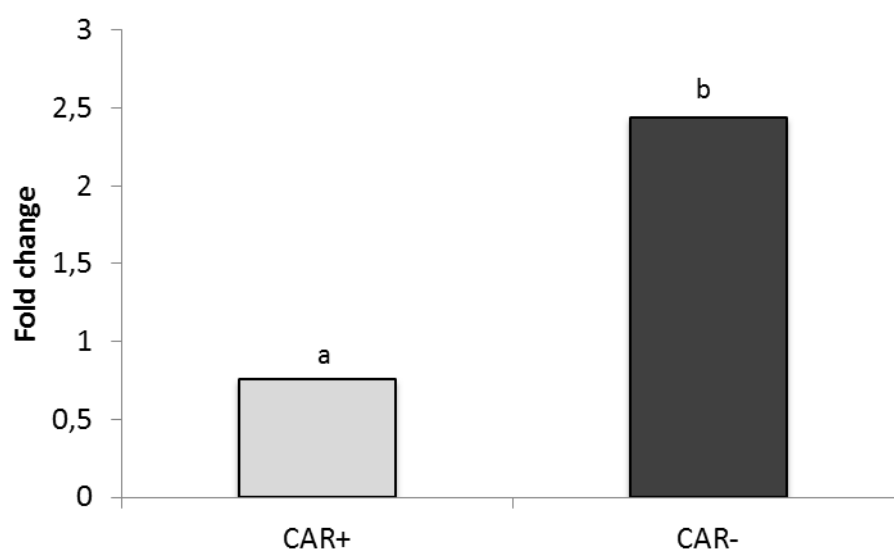


Figura 13. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *PLAC8* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($P<0,05$).

Observou-se que o genes relacionado ao metabolismo de lipídios *PPARGC1A* foi diferencialmente expresso nos embriões, como resultado de efeitos do tratamento paterno (Figura 14 e Anexo 1). O acúmulo relativo de transcritos de *PPARGC1A* foi afetado pelo CAR ($P=0,0262$), sendo mais expresso em embriões produzidos com sêmen de animais com menor eficiência alimentar (CAR+) em comparação com os de animais CAR-.

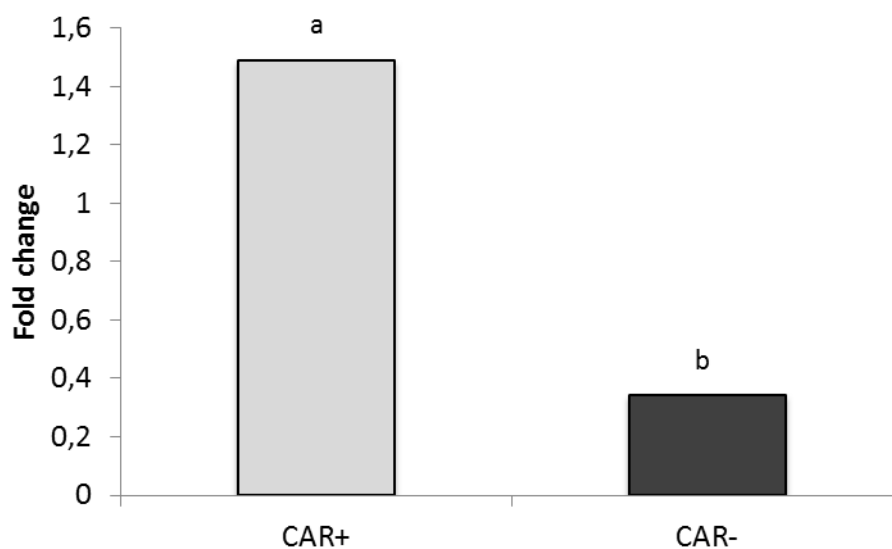


Figura 14. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *PPARGC1A* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($P<0,05$).

Os tratamentos paternos realizados neste estudo também afetaram o acúmulo relativo de transcritos de genes relacionados com a resposta ao estresse nos embriões (Figura 15 e Anexo 1). Com relação ao gene *NFE2L2*, foi observado efeito de CAR ($P=0,0464$), com menor expressão em embriões provenientes de animais CAR+ do que de animais CAR-.

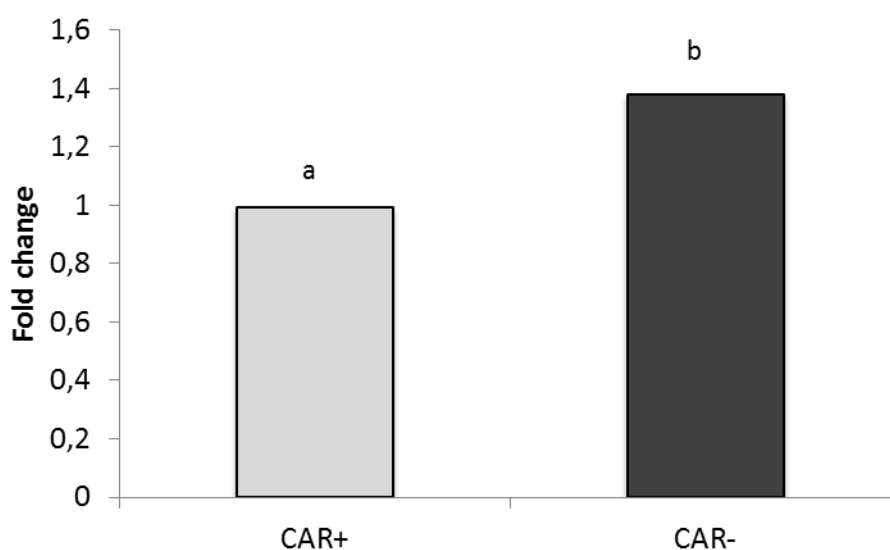


Figura 15. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *NFE2L2* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($P<0,05$).

Efeito da dieta

Não houve interação dieta x CAR sobre o acúmulo de transcritos dos genes *HMOX1* ($P=0,3007$) e *SREBF1* ($P=0,6153$), de maneira que os resultados são apresentados separadamente, como variáveis independentes (Figuras 16 e 17). Os resultados referentes à análise destes genes estão apresentados no Anexo 1, sendo

apresentados graficamente apenas os resultados que identificaram diferenças estatísticas do efeito da suplementação nutricional.

O gene *HMOX1* foi afetado pela dieta ($P=0,0107$), sendo menos expresso em embriões derivados de animais alimentados com dieta controle do que de animais suplementados com Megalac (Figura 16 e Anexo 1).

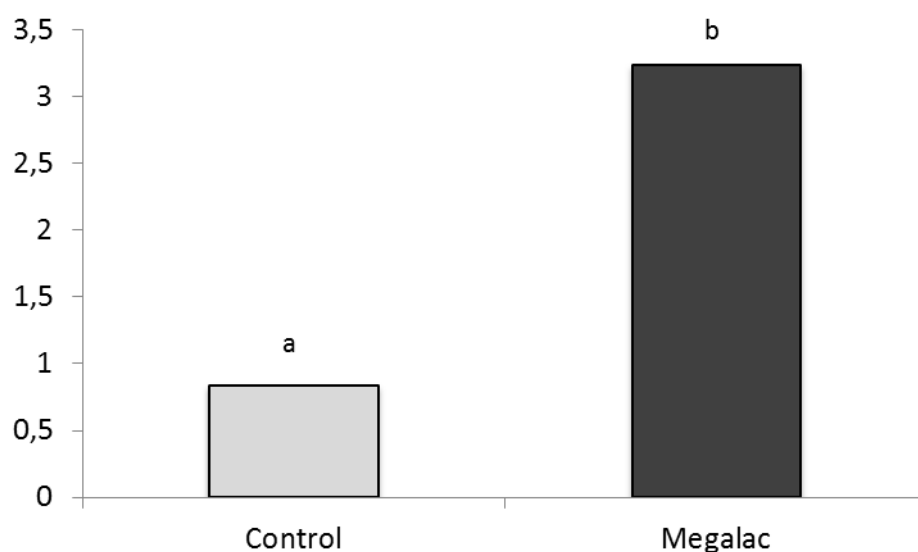


Figura 16. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *HMOX1* de embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($P < 0,05$).

Observou-se que o gene relacionado ao metabolismo de lipídios *SREBF1* foi diferencialmente expresso nos embriões, como resultado de efeitos do tratamento paterno (Figura 17 e Anexo 1). O acúmulo relativo de transcritos de gene *SREBF1*, foi afetado pela dieta ($P=0,0299$), com maior acúmulo relativo de transcritos em embriões produzidos com sêmen de animais alimentados com Megalac do que de animais que receberam a dieta controle.

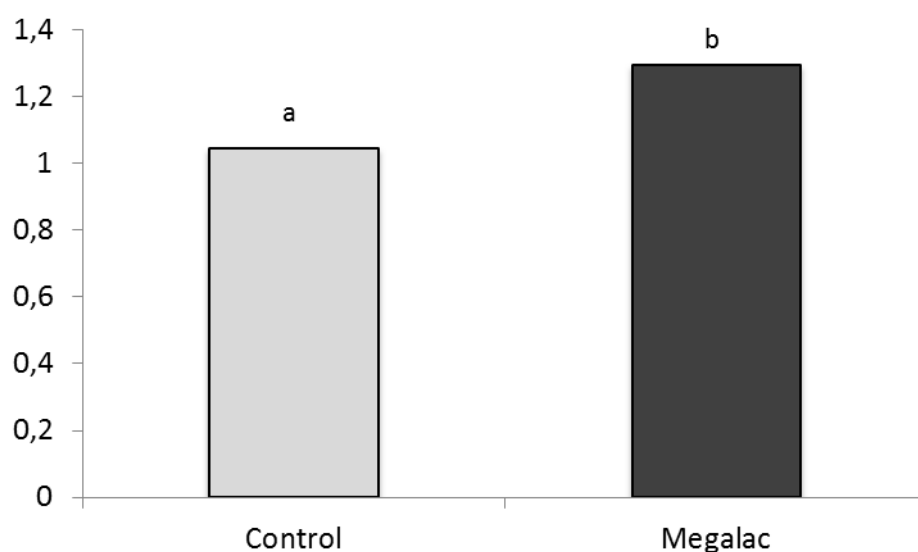


Figura 17. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *SREBF1* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($P<0,05$).

Efeitos de interação CAR x dieta

Os genes *SLC2A5* (Figura 18 e Anexo 1), relacionado ao metabolismo, foram afetados pela interação CAR x dieta ($P=0,0363$ e $P=0,0449$, respectivamente). O padrão de expressão desses genes foi menor em embriões provenientes de animais CAR- alimentados com dieta controle em comparação com o observado em embriões derivados do sêmen de animais CAR- suplementados com Megalac, ou seja, a expressão destes genes em embriões provenientes de animais CAR- variou em função da alimentação paterna.

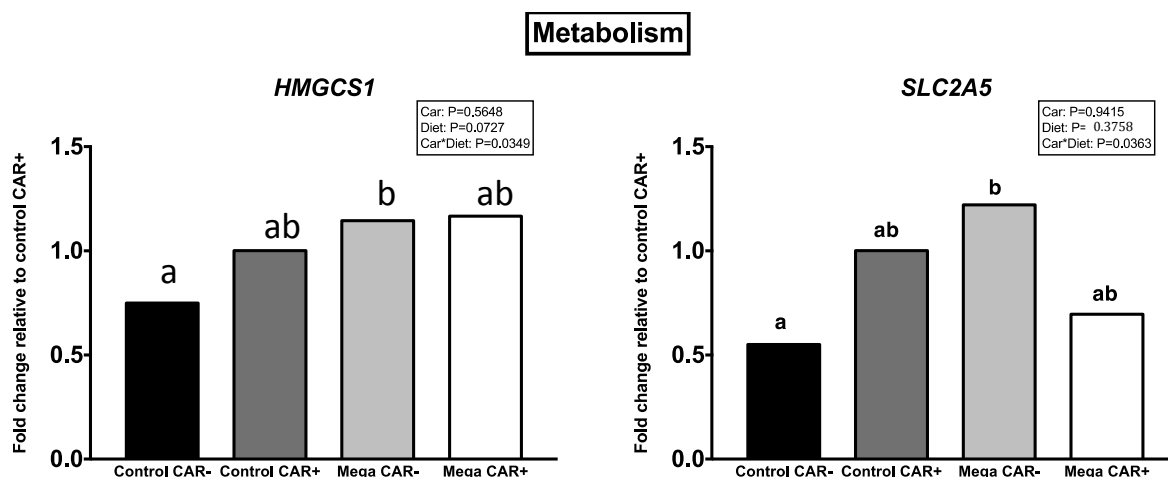


Figura 18. Efeitos paternos sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores de $P < 0,05$, indicados na caixa de texto da figura, indicam efeito significativo de CAR, dieta ou interação.

Alguns genes relacionados ao desenvolvimento embrionário também foram afetados pelo tratamento paterno (Figura 19 e Anexo 1). O gene *RPLP0* foi afetado pela interação CAR x dieta ($P=0,0325$), seguindo o mesmo padrão do gene acima descrito, em que a expressão em embriões provenientes de animais CAR- variou em função da alimentação paterna.

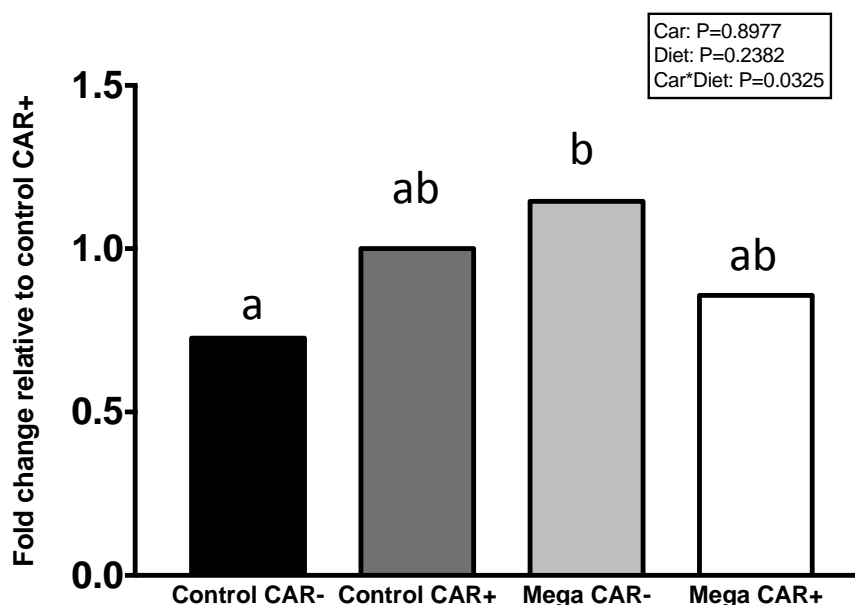


Figura 19. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *RPLP0* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores de $P < 0,05$, indicados na caixa de texto da figura, indicam efeito significativo de CAR, dieta ou interação.

O mesmo padrão de efeito de interação CAR x dieta foi observado no acúmulo relativo de transcritos do gene *REST* ($P=0,0168$), associado à predição da qualidade embrionária (Figura 20 e Anexo 1). Já para o gene *NANOG* (interação CAR x dieta: $P=0,0192$), a expressão em embriões provenientes de animais CAR+ alimentados com dieta controle foi maior do que os de animais CAR+ alimentados com Megalac, também demonstrando haver variação na expressão desse gene no embrião em função da alimentação paterna.

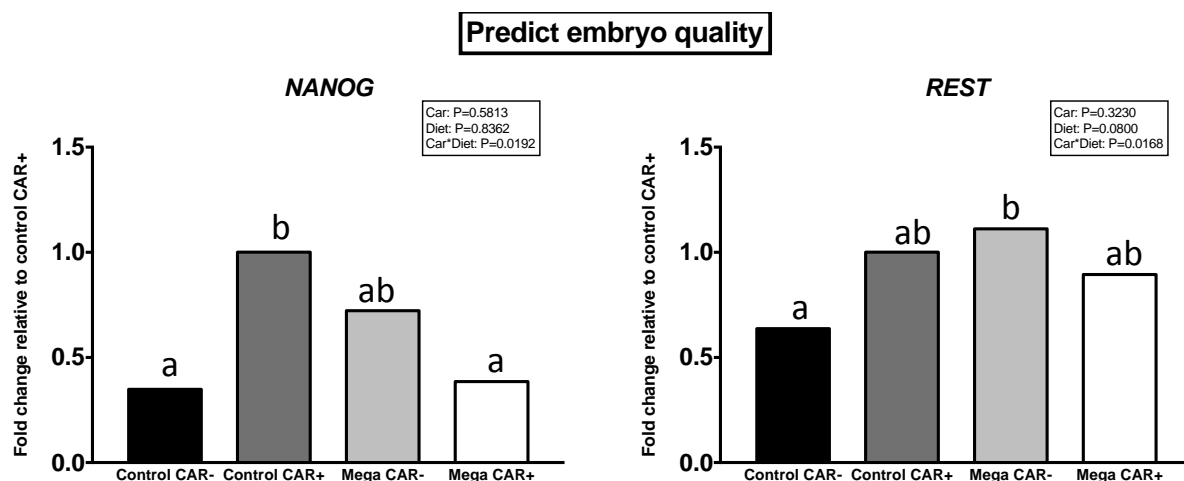


Figura 20. Efeitos paternos sobre a expressão de genes associados à predição da qualidade de embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Neloreclassificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores de $P < 0,05$, indicados na caixa de texto da figura, indicam efeito significativo de CAR, dieta ou interação.

O padrão de resposta de interação CAR x dieta descrito para os genes *H3F3A*, associado à regulação epigenética ($P=0,0392$; Figura 21 e Anexo 1), *ATF4*, relacionado ao estresse do retículo endoplasmático ($P=0,0156$; Figura 22 e Anexo 1) e *HSF1*, associado à resposta ao choque térmico ($P=0,0086$; Figura 23 e Anexo 1) foi semelhante: o acúmulo relativo de transcritos desses genes foi maior em embriões provenientes de animais CAR+ do que de animais CAR- alimentados com dieta controle, mas não diferiu em embriões derivados do sêmen de animais CAR+ e CAR- suplementados com Megalac.

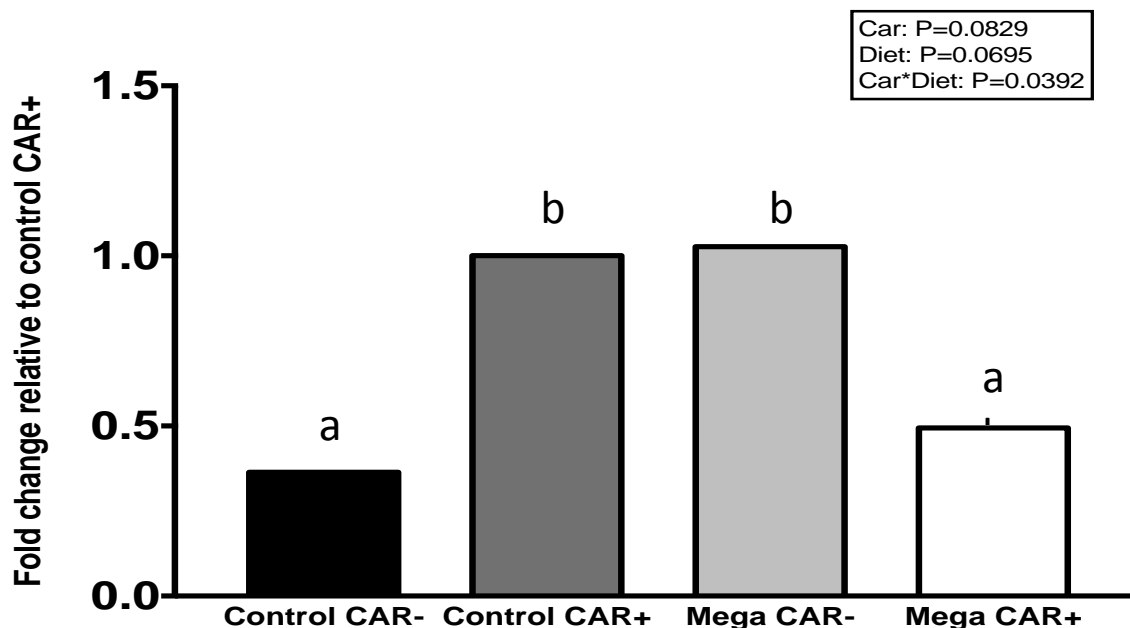


Figura 21. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *H3F3A* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores de $P < 0,05$, indicados na caixa de texto da figura, indicam efeito significativo de CAR, dieta ou interação.

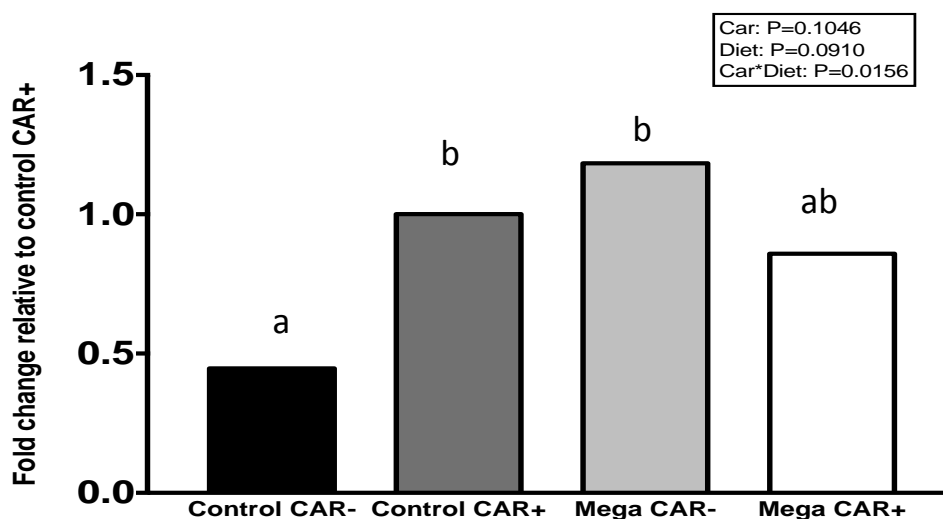


Figura 22. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *ATF4* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores de $P < 0,05$, indicados na caixa de texto da figura, indicam efeito significativo de CAR, dieta ou interação.

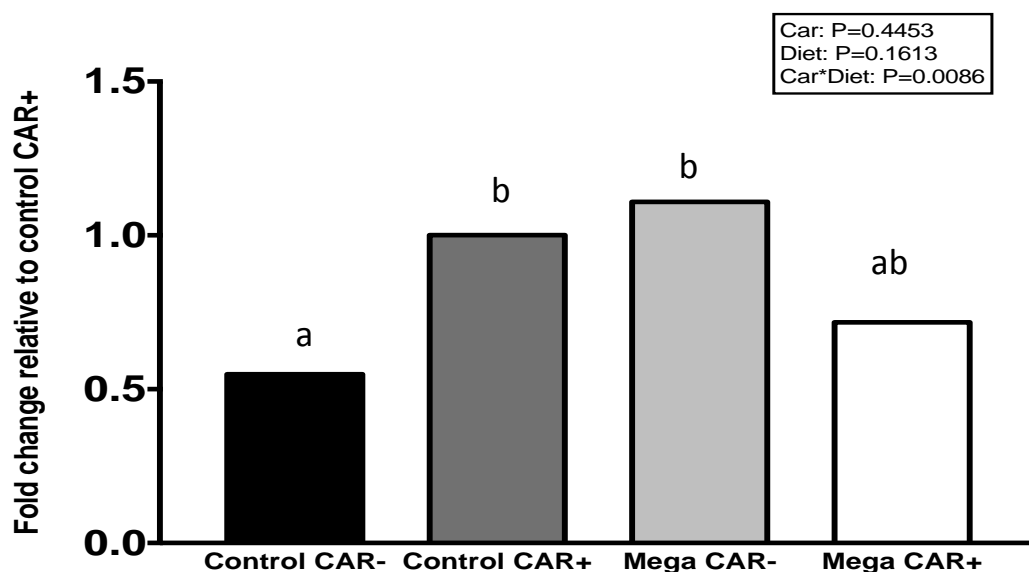


Figura 23. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *HSF1* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores de $P < 0,05$, indicados na caixa de texto da figura, indicam efeito significativo de CAR, dieta ou interação.

Os tratamentos paternos realizados neste estudo também afetaram o acúmulo relativo de transcritos de genes relacionados com a resposta ao estresse nos embriões (Figura 24 e Anexo 1). Observou-se efeito de dieta ($P=0,0148$; maior expressão para animais suplementados com Megalac) e da interação CAR x dieta ($P=0,0064$) para o gene *GPX4*, sendo que a expressão em embriões derivados de animais CAR- em animais alimentados com dieta controle foi menor do que o observado nos demais grupos experimentais.

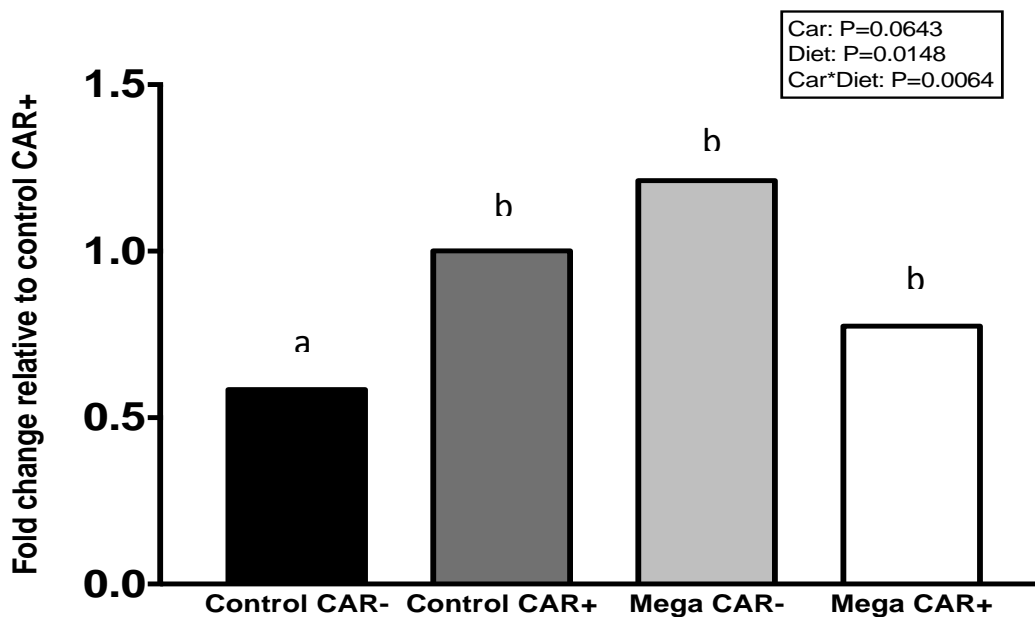


Figura 24. Efeitos paternos sobre a expressão do gene *GPX4* em embriões produzidos *in vitro* a partir de sêmen de touros jovens Nelore classificados para consumo alimentar residual (CAR) e suplementados a longo prazo com fonte de ácidos graxos poliinsaturados (Megalac). Os dados estão apresentados como fold change relativo ao grupo Controle CAR+ e foram calculados a partir da média de ΔCt . Valores de $P < 0,05$, indicados na caixa de texto da figura, indicam efeito significativo de CAR, dieta ou interação.

7. DISCUSSÃO

7.1. Desenvolvimento e qualidade embrionária

No presente estudo, foram investigados os efeitos da seleção com base na eficiência alimentar (CAR) e da suplementação nutricional com AGPs por tempo prolongado em touros jovens da raça Nelore sobre a fecundidade *in vitro* do sêmen, avaliando-se a capacidade de fecundação e o desenvolvimento embrionário na fase pré-implantação. Não houve efeito dos tratamentos sobre as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto. Resultados semelhantes foram observados em um experimento anterior (Rossi, 2017), em que o autor atribuiu a ausência de efeitos na fecundidade *in vitro* do sêmen de touros Nelore como resultado de uma suplementação nutricional insuficiente de AGPs (os autores forneceram 200 g Megalac/animal/dia, tal como no presente estudo). O efeito da

quantidade de AGPs fornecidos pela dieta foi também descrito para fêmeas (Fouladi-Nashta et al., 2007), tendo sido observadas maiores taxas de clivagem e produção de blastocisto em vacas leiteiras em lactação suplementadas com alto nível de AGPs (800 g/dia) quando comparado com baixo nível (200 g/dia). Desta forma, esses estudos sugerem que a quantidade de suplemento oferecido, e possivelmente também o sexo (se macho ou fêmea) e estado fisiológico do animal, devem influenciar os efeitos dos AGPs sobre os parâmetros reprodutivos desejados. Os embriões obtidos no presente estudo foram avaliados quanto ao acúmulo lipídico intracitoplasmático. O teor lipídico de embriões produzidos *in vitro* tem sido considerado um importante parâmetro de qualidade, uma vez que o acúmulo excessivo de gorduras afeta negativamente a criotolerância dos mesmos, causando menor taxa de sobrevivência após a descongelação (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006). Os resultados demonstraram que a dieta paterna com AGPs não afetou o conteúdo lipídico dos embriões, no entanto, embriões produzidos a partir de sêmen de touros CAR+ exibiram maior acúmulo lipídico do que aqueles provenientes de touros CAR-. Animais CAR+ são menos eficientes, ou seja o consumo observado para esses animais é maior do que o predito (Almeida, 2005). Essa diferença metabólica resulta em acúmulo de maior concentração de gordura corporal e menor concentração de proteína no corpo desses animais, quando comparados a animais CAR- (Richardson et al., 2001). Estudos anteriores demonstraram que a característica genética de CAR é transmitida à prole (Anderson et al., 2006; Ng et al., 2010; Carone et al., 2010; Soubry et al., 2013), sendo que a correlação entre a composição química corporal e a variação genética observada para o CAR apresenta herdabilidade moderada a alta (Arthur et al., 2001a; Arthur et al., 2001b; Rolfe et al., 2011). Embora esses estudos tenham avaliado os descendentes de animais classificados de acordo com o CAR, não existem outros relatos na literatura, de acordo com nosso conhecimento, que tenham investigado a influência paterna, na espécie bovina, sobre o metabolismo dos embriões ainda no estágio pré-implantação, antes da exposição desses ao ambiente uterino. Vários outros fatores levam à alterações metabólicas de embriões produzidos *in vitro*, sendo bem conhecidos os efeitos do próprio sistema de cultivo (por exemplo, uso de soro fetal bovino no meio de cultivo), as alterações na função mitocondrial e a qualidade do

oócito (Gardner et al., 2000; Kim et al., 2001). Porém, nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que além dos fatores supra mencionados, a eficiência alimentar paterna leva à alterações no metabolismo lipídico embrionário, indicando que as influências do estado nutricional e metabólico paterno também exercem importante impacto no metabolismo embrionário em sistemas de produção *in vitro*.

7.2. Expressão gênica

Efeito de CAR

Uma vez que foi observado efeito paterno sobre uma característica de qualidade embrionária (quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos), foi realizado um experimento para avaliar a relação entre essa característica e o acúmulo diferencial de transcritos nos embriões produzidos *in vitro* a partir do sêmen dos touros dos diferentes tratamentos. O objetivo desse estudo foi relacionar o teor lipídico com possíveis alterações metabólicas em resposta à expressão diferencial de transcritos relacionados ao metabolismo e à qualidade do embrião. A análise dos genes relacionados ao metabolismo lipídico revelou haver efeito de CAR sobre a expressão do gene *PPARGC1A*. Esse resultado é semelhante ao relatado em suínos, em que foi observada maior expressão desse gene no músculo de animais CAR+ (Jing et al., 2015). O gene *PPARGC1A* codifica a proteína *PGC-1 α* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha protein), a qual regula a ativação transcricional de genes envolvidos no metabolismo da glicose e lipídios (Puigserver et al., 1998), resultando no aumento da expressão de genes importantes para a gliconeogênese, oxidação de ácidos graxos, transporte lipídico e fosforilação oxidativa (Estall et al., 2009). Apesar de exercer um efeito estimulador sobre a β -oxidação, outros estudos demonstraram que o *PPARG*, juntamente com *CEBPA*, é um marcador expresso durante a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos completamente maduros (Li et al., 2012; Cowherd et al., 1999). Com a expressão desses genes, gotículas lipídicas começam a aparecer no citoplasma e gradualmente coalescem em gotículas maiores (Mcneel et al., 2000). Essas funções

explicam, provavelmente, porque polimorfismos neste gene estão associados à maior quantidade de gordura no leite (Soria et al., 2009; Weikard et al., 2005).

Os ácidos graxos representam uma importante fonte de energia para embriões no período pré-implantação (Gentile et al., 2004). A β -oxidação de ácidos graxos permanece relativamente constante em embriões até o estágio de 8 células, quando então aumenta subitamente até o estágio de mórula (Houghton et al., 1996). Todavia, quando os embriões atingem o estágio de mórula e blastocisto, a glicólise torna-se a principal via metabólica para a produção de energia (Harvey et al., 2002). Desta forma, a manutenção de níveis apropriados de *PGC-1* parece ser essencial para a regulação do metabolismo embrionário, uma vez que essa proteína estimula a gliconeogênese (Yoon et al., 2001) e a β -oxidação de ácidos graxos (Estall et al., 2009). Além de provisionar substratos para a oxidação mitocondrial, a *PGC-1 α* é também o principal regulador da biogênese de mitocôndrias (Austin e St-Pierre, 2012). Portanto, o gene *PPARGC1A*, também denominado de *PGC-1*, está intimamente relacionado à função mitocondrial, regulando tanto seu número quanto sua atividade metabólica.

É relatado que a via de sinalização *PPAR α /PGC-1* pode ser ativada por supernutrição crônica e obesidade, resultando na regulação positiva de genes relacionados à β -oxidação de ácidos graxos (Abel et al., 2008). Nossos resultados corroboram esse estudo, uma vez que os embriões derivados de pais CAR+ exibiram maiores teores intracelulares de lipídeos e maior expressão do gene *PPARGC1A*. Assim, com base nas informações supra-citadas da literatura, nossos resultados sugerem que o aumento da expressão do gene *PPARGC1A* possa ser uma resposta ou consequência do maior acúmulo de lipídeos nos embriões CAR+, o que provavelmente possa ter estimulado o aumento no número de cópias e/ou a função mitocondrial. De fato, foi relatado anteriormente que a superexpressão de *PGC-1* aumenta o número de mitocôndrias, o que conseqüentemente promove aumento no gasto de energia (Lehman et al, 2000). Essas organelas produzem a maior parte da energia celular através da fosforilação oxidativa (OXPHOS), mas também desperdiçam energia e geram calor por meio de reações de desacoplamento (Kagawa e Ohta, 1990). Particularmente em animais CAR+, as reações de desacoplamento, a OXPHOS e a síntese de ATP são exacerbadas (Jing

et al., 2015). Esses achados explicam o alto gasto energético dispendido para a manutenção corporal de animais CAR+, como anteriormente descrito por Herd e Bishop (2000). Desta forma, os achados do presente estudo sugerem que a menor eficiência dos animais CAR+ possa ser devida ao aumento da atividade mitocondrial através da ativação metabólica sinalizada por *PPARGC1A*, provavelmente com a finalidade de estimular a oxidação dos ácidos graxos para suprir as necessidades energéticas aumentadas desses animais.

É bem sabido que o metabolismo aeróbico, mais especificamente a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, pode ser acompanhado por um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como radicais livres (Feugang et al., 2003). O excesso desses radicais é responsável, em grande parte, por prejudicar o desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* (Nedambale et al., 2006), já que induzem uma cascata de reações em cadeia que eventualmente podem levar a danos celulares, incluindo peroxidação lipídica, oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, e apoptose (Kitagawa et al., 2004). O metabolismo oxidativo elevado associado ao aumento da atividade da *PGC-1 α* pode ser acompanhado por um aumento nas ROS. No entanto, evidências sugerem que a *PGC-1 α* seja também uma poderosa ativadora de enzimas desintoxicantes de ROS (Austin e St-Pierre, 2012). Portanto, essa ação da *PGC-1 α* minimizaria os efeitos negativos das ROS sobre a fisiologia celular.

Visando avaliar o impacto do acúmulo lipídico e possível aumento nas ROS sobre o embrião, foram investigados, no presente estudo, o acúmulo de transcritos de genes relacionados ao estresse e resposta ao estresse celular. Os resultados demonstraram efeito de CAR (menor expressão em embriões CAR+) sobre a expressão do gene *NFE2L2*, que é um ativador de transcrição que se liga a elementos de resposta antioxidante e coordena a ativação de genes em resposta ao estresse oxidativo (Amin et al., 2014). Este achado pode ser um indicativo de que o aumento da atividade da *PGC-1 α* em resposta à elevada expressão do gene *PPARGC1A* nos embriões CAR+ tenha, de fato, sido efetiva em ativar as defesas antioxidantes celulares. Assim, esses embriões estariam sob menor condição de estresse oxidativo, apesar da atividade metabólica exacerbada.

Devido às ações benéficas sobre a resposta mediada por estresse oxidativo, o aumento na expressão de *NFE2L2* pode ser um indicador de qualidade e sobrevivência embrionária. De fato, já foi anteriormente relatada (Amin et al., 2014) maior expressão desse gene e menores níveis de ROS em blastocistos precoces (competentes) em comparação com blastocistos tardios (não-competitivos). Assim, nossos resultados sugerem que a menor expressão do gene *NFE2L2* em embriões CAR+ possa ser um indicativo de pior qualidade e sobrevivência, comparado aos embriões CAR-. Estes resultados são concordantes com um estudo prévio realizado em bovinos da raça Nelore, em que foi observada maior expressão de *NFE2L2* no fígado de bezerros CAR- (Tizioto et al., 2015).

Genes relacionados à qualidade embrionária foram avaliados no presente estudo e foi observado efeito de CAR (maior expressão em CAR-) sobre o acúmulo de transcritos do gene *PLAC8*, relacionado à diferenciação e implantação. Esse gene é um biomarcador de qualidade e sugere-se que o aumento na sua expressão possa ser utilizado para prever o sucesso de prenhez (Rekik et al., 2011), sendo responsável pelo desenvolvimento de placenta e a interação materna embrionária (Ghanem et al., 2011). Foi demonstrado que o *PLAC8* está altamente expresso em células de embriões capazes de se desenvolver a termo, tanto em embriões produzidos *in vitro* (El-Sayed et al., 2006) como *in vivo* (Ghanem et al., 2011).

Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstraram que embriões derivados de touros de baixa eficiência alimentar (CAR+) apresentam maior conteúdo lipídico intracitoplasmático e maior expressão de gene (*PPARGC1A*) supostamente relacionado ao aumento da oxidação lipídica e da atividade metabólica mitocondrial. Paralelamente, ou como consequência, esses embriões exibiram menor expressão de genes relacionados com a qualidade e sobrevivência (*NFE2L2* e *PLAC8*). Portanto, sugere-se que a menor viabilidade de embriões CAR+ seja uma consequência da elevada carga metabólica, necessária para a manutenção das atividades fisiológicas desses animais. Os mecanismos que levam à essa consequência ainda necessitam ser investigados.

Efeito da dieta

A suplementação nutricional de ruminantes com gordura aumenta a densidade de energia da dieta, com reflexos positivos na melhoria do desempenho produtivo e reprodutivo. Todavia, estudos realizados em mamíferos demonstraram que a nutrição parental no momento peri-concepção influencia vários aspectos metabólicos e funcionais dos descendentes, incluindo o perfil epigenético, a expressão de enzimas e hormônios relacionados ao metabolismo de glicose e lipídeos, e a deposição de gordura corporal (Wu e Suzuki, 2006; Ng et al., 2010). No presente estudo, a suplementação paterna com dieta rica em AGPs alterou a expressão gênica dos embriões pré-implantação, sendo observadas alterações na abundância de transcritos de 2 genes relacionados ao metabolismo (*SREBF1* e *HMOX1*).

O fator de transcrição *SREBF1* (sterol-regulatory element binding protein) atua na homeostase energética, influenciando a glicólise, lipogênese e adipogênese (Eberle et al., 2004). Esse fator de transcrição regula a atividade de vários genes relacionados à síntese de ácidos graxos e colesterol (Shimano et al., 1997), incluindo o transporte de ácidos graxos, síntese de triacilglicerol e oxidação de ácidos graxos (Jump et al., 2005). Os AGPs tem um papel importante no controle da lipogênese, pois podem suprimir a expressão de genes lipogênicos a partir de pelo menos três receptores nucleares (*PPAR*, *LXR* e *HNF-4 α*), e de fatores de transcrição, como o *SREBP* (Al Darwich et al., 2010). No entanto, os resultados do presente estudo foram opostos ao efeito esperado, já que a expressão de *SREBF1* foi maior em embriões produzidos com sêmen obtido de touros suplementados com dietas ricas em AGPs. Uma hipótese que pode explicar esse achado consiste na própria composição de AGPs do Megalac, utilizado como suplemento. De acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, o perfil de ácidos graxos dessa fonte de gordura é de 0,9% de ácido láurico 12:0, 13,9% ácido palmítico 16:0, 4,0% ácido esteárico 18:0, 3,2% ácido elaidico 18:1 n9 *trans*, 17,9% ácido oleico 18:1 n9 *cis*, 49,1% ácido linoleico 18:2 n6 *cis*, 4,4% ácido linolênico 18:3 n3, 0,8% ácido araquidico 20:0, 0,6% ácido cis-11-eicosenóico 20:1, 1,8% de ácido heneicosanóico 21:0 e 0,7% de ácido beénico 22:0. Já foi demonstrado que suplementos que contenham quantidades maiores de ácidos graxos de cadeia muito longa [por

exemplo, ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5 n3 e ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6 n3] têm um maior efeito inibitório sobre a expressão de *SREBF1* do que AGPs de cadeia mais curta (Deckelbaum et al., 2006). No entanto, a maior proporção de ácidos graxos encontrados no Megalac é constituída de cadeias menos longas, contendo 18 ou menos cadeias de carbono, o que pode explicar a ausência de efeito sobre a inibição desse fator de transcrição associado à lipogênese.

Os mecanismos envolvidos no controle dessas alterações na expressão de genes chave do metabolismo ainda necessitam ser investigados, porém, esses resultados são interessantes por demonstrarem a influência do estado nutricional e da dieta paterna sobre a qualidade de embriões produzidos *in vitro* na espécie bovina, algo que vem sendo negligenciado até o presente momento.

A análise de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário revelou efeito da dieta sobre a expressão do gene *HMOX1*, sendo observada maior expressão nos embriões descendentes de touros alimentados com Megalac. Um estudo realizado com camundongos demonstrou que dietas ricas em ácidos graxos, especialmente ácido linolênico, ácido docosahexaenoico e ácido linoleico, aumentaram a expressão do gene *HMOX1* no tecido cardíaco (Georgiadi et al., 2012). Portanto, o resultado observado no presente estudo pode ser atribuído à constituição da dieta experimental, uma vez que o Megalac apresenta alta proporção ácido linoleico em sua composição (49,1%, de acordo com o fabricante). O aumento na expressão desse gene é uma resposta ao estresse oxidativo, porém também é regulado por proteínas de vias de metabolismo lipídico (Kronke et al., 2007; Lin et al., 2010). Ainda, a correlação entre a expressão de *HMOX1* e a formação placentária mostra sua importância para o desenvolvimento embrionário e placentação normal (Watanabe et al., 2004). A *HMOX1* oxida a molécula heme para produzir monóxido de carbono (CO), ferro (Fe) e biliverdina IX α . O ferro, em sua maior parte, é reutilizado na formação de hemoglobina e também para o crescimento celular (Durante, 2003; Conrad e Umbreit, 2000); o CO pode atuar suprimindo a apoptose das células endoteliais (Brouard et al., 2000); e a biliverdina IX α é reduzida à bilirrubina IX α , que atua como um anti-oxidante (Stocker et al., 1987a; Stocker et al., 1987b), mas também pode desempenhar um papel no desenvolvimento embrionário (Fulchuk et al., 2002). Dessa forma, o aumento na expressão desse

gene nos embriões do grupo Megalac indica um efeito benéfico da dieta parental com fontes de ácidos graxos sobre os descendentes.

Efeito da interação CAR x dieta

Dos 93 genes investigados no presente estudo, foi observado efeito de interação CAR x dieta em 2 genes relacionados ao metabolismo (*HMGCS1* e *SLC2A5*), 1 gene relacionado ao desenvolvimento embrionário (*RPLP0*), 2 genes relacionados à qualidade embrionária (*NANOG* e *REST*), 1 gene relacionado à regulação epigenética (*H3F3A*), 1 gene relacionado ao estresse do retículo endoplasmático (*ATF4*), 1 gene relacionado à resposta ao choque térmico (*HSF1*) e 1 gene relacionado à resposta ao estresse (*GPX4*). Em todos esses genes, o efeito de interação observado obedeceu o mesmo padrão, em que a expressão foi menor em embriões descendentes de animais de alta eficiência alimentar (CAR-) comparados aos descendentes de animais CAR+, quando ambos foram alimentados com dieta controle. Porém, quando os animais foram suplementados com Megalac, a expressão foi maior em embriões CAR- comparados aos CAR+.

Os genes relacionados ao metabolismo que foram alterados pela interação CAR x dieta estão envolvidos no metabolismo de gorduras e de carboidratos. O gene *HMGCS1* codifica uma enzima que está envolvida no metabolismo de colesterol. Já foi demonstrado que a menor expressão desse gene em blastocistos bovinos levou a um acúmulo de colesterol e essa resposta foi modulada pela presença de soro fetal bovino no meio de cultura, que contém alta concentração de gorduras (Cagnone; Sirard, 2014). Já o gene *SLC2A5* faz parte da via de transporte de glicose e expressa a proteína *GLUT5*, que está relacionada exclusivamente com o transporte de frutose (Ostrowska et al., 2015). A *GLUT5* é expressa em vários tecidos corporais (Davidson et al., 1992) e também é encontrada no sêmen de muitas espécies, conferindo a habilidade de utilizar a frutose como fonte de energia ou como ativadora do processo de fertilização (Douard e Ferraris, 2008). No sêmen bovino, a frutose é a principal fonte de energia (Anderson, 1946), assim, a maior expressão de *GLUT5* indica maior concentração de frutose e, conseqüentemente, uma vantagem energética.

No que se refere aos embriões de animais alimentados com dieta controle no presente estudo, a maior expressão dos genes metabólicos *HMGCS1* e *SLC2A5* em embriões derivados de animais menos eficientes (CAR+) era esperada, uma vez que esses animais demandam um alto gasto energético para a manutenção corporal, conforme descrito por Herd e Bishop (2000) e discutido no tópico anterior. Todavia, embriões derivados de animais que receberam suplementação com Megalac exibiram um padrão inverso ao do grupo controle, ou seja, a expressão desses genes foi maior para CAR-. De acordo com nosso conhecimento até o presente momento, não há relatos na literatura que tenham demonstrado intensificação no metabolismo em resposta à suplementação nutricional de animais de maior eficiência alimentar, todavia, os resultados desse estudo sugerem que o aumento do fornecimento de nutrientes (Megalac) a esses animais pode ter promovido uma aceleração metabólica nos mesmos, a qual foi transmitida aos descendentes. Assim, sugere-se que a suplementação nutricional é mais efetiva aos animais que tenham habilidade de responder de forma apropriada, ou seja, animais que tenham maior eficiência alimentar. Essa resposta ao estímulo nutricional pode ter gerado marcas epigenéticas nos espermatozoides desses touros, que foram transmitidas aos descendentes.

De fato, o mesmo padrão de resposta à interação CAR x dieta foi observado na expressão do gene *H3F3A* relacionado à regulação epigenética, o que demonstra a influência do estado nutricional e metabólico paternos sobre o perfil epigenético dos descendentes em bovinos. Esse gene expressa uma isoforma de histona H3 (H3.3) que é predominante em células que não estejam em divisão celular (Tagami et al., 2004). A H3.3 está presente em genes ativos, encontrada em sítios de deslocamento nucleossômico e é considerada uma marca epigenética de cromatina ativa (Chow et al., 2005; Daury et al., 2006). Estudos com embriões bovinos concluíram que a expressão de H3.3 é necessária para o desenvolvimento embrionário normal e sua ausência leva à produção de embriões deficientes (Zhang et al., 2017).

Outros genes relacionados ao desenvolvimento e qualidade embrionária também foram afetados pela interação CAR x dieta. O gene *RPLP0* codifica uma proteína que é constituinte estrutural de ribossomos. A baixa expressão deste gene

está relacionada à perda de embriões bovinos (Ghanem et al., 2011), enquanto que a expressão da proteína ribossomal *RPLP0* está aumentada em gestações que resultaram em nascimento do bezerro (Tesfaye et al., 2009). Os genes *NANOG* e *REST* são marcadores de pluripotência, sendo considerados marcadores de qualidade do embrião (Kong et al., 2016). A menor expressão desses genes em embriões derivados de animais mais eficientes do grupo controle, em comparação aos menos eficientes que receberam a mesma dieta, pode ser resultante do comprometimento de parâmetros reprodutivos, anteriormente relatado para animais eficientes para CAR (Awda et al., 2013; Basarab et al., 2011). Assim, o desenvolvimento e a qualidade desses embriões estariam também comprometidos. Todavia, a suplementação nutricional apropriada aos animais de maior eficiência nutricional (grupo Megalac) conseguiu melhorar os parâmetros reprodutivos desses animais, evidenciado no presente estudo pelo aumento na expressão de genes relacionados à qualidade e desenvolvimento dos embriões descendentes desses animais.

Esse possível comprometimento na reprodução em animais de maior eficiência alimentar e respectiva melhoria da mesma em resposta à dieta pode ser também devido à intensificação da resposta ao estresse, evidenciado no presente estudo pela expressão diferencial de genes relacionados ao estresse. O gene *HSF1* codifica uma proteína de ligação ao DNA responsável por ativar rapidamente a transcrição de genes da via de choque térmico, em resposta a estímulos ambientais (Akerfelt et al., 2010). *HSF-1* é expresso em grandes quantidades no núcleo de embriões, mesmo na ausência de estresse, até o estágio de blastocisto (Christians et al., 1997). Embora camundongos que não expressem *HSF1* sobrevivam até a idade adulta, apresentam diversos defeitos incluindo má-formação da placenta, aumento de mortalidade pré-natal, problemas no sistema imune, retardo de crescimento e infertilidade feminina (Akerfelt et al., 2010; Takii et al., 2010). Assim, a expressão de *HSF-1* apresenta grande importância para o desenvolvimento pré- e pós-embrionário.

A proteína *GPX4* é uma selenoproteína expressa em diversos tecidos que apresenta expressão elevada nas mitocôndrias das células germinativas masculinas de camundongos (Kryukov et al., 2003; Maiorino et al., 1998). Estudos mostram que

a baixa expressão do gene *GPX4* resulta em infertilidade em camundongos relacionada à anormalidades estruturais no espermatozoide e também à infertilidade em humanos (Imai et al., 2001; Imai et al., 2009; Schneider et al., 2009). Assim, os resultados do presente estudo sugerem que embriões descendentes de animais de maior eficiência nutricional possuem pior qualidade e habilidade de desenvolvimento, todavia, o aumento na expressão de genes relacionados à qualidade e desenvolvimento desses embriões em resposta à melhoria da dieta paterna indicam um efeito benéfico da dieta parental sobre os descendentes e estimulam o desenvolvimento de mais estudos para determinar as vias envolvidas nessas rotas transgeracionais de sinalização embrionária.

Outro gene relacionado ao estresse e que também apresentou o mesmo padrão de resposta à interação CAR x dieta foi o *ATF4*, um ativador transcricional de genes da via de UPR (*Unfolded Protein Response*), ativada quando ocorre um acúmulo de proteínas dobradas incorretamente devido ao estresse do retículo endoplasmático (Fusakio et al., 2016). A alta atividade de síntese que ocorre em embriões resulta em um estado constante de estresse do retículo endoplasmático (Abraham et al., 2012; Michalak e Gye, 2015), especialmente em condições de cultivo *in vitro* (Michalak e Gye, 2015). Assim, a capacidade de ativar respostas que reestabeleçam a homeostase é importante para o sucesso da produção de embriões *in vitro*. O gene *ATF4* contribui tanto para a sobrevivência celular, ativando a expressão de diversos genes relacionados à recuperação da homeostase celular e adaptação às condições de estresse, quanto para a morte celular quando o estresse é prolongado (Schonthal, 2012; Zhang et al., 2010). Assim, o aumento da expressão de *ATF4* em embriões pode ser benéfico ao atenuar os efeitos do estado de estresse do retículo endoplasmático e contribuir para a produção de embriões viáveis. Os resultados do presente trabalho sugerem que a menor expressão de *ATF4* possa ser devido ao menor estresse do retículo endoplasmático dos embriões descendentes de touros mais eficientes e alimentados com dieta controle, quando comparados aos descendentes de animais menos eficientes alimentados com a mesma dieta. Provavelmente, esse suposto menor estresse seja devido à menor atividade metabólica desses embriões, como discutido acima. Porém, essa resposta se inverteu quando os touros foram suplementados com Megalac, sugerindo que o

aumento da oferta de nutrientes aos animais que tem maior eficiência alimentar pode estimular o seu metabolismo, uma vez que esses animais possuem melhores condições metabólicas para aproveitamento de nutrientes. Esse possível efeito estimulador sobre o metabolismo e atividade biossintética foi supostamente capaz de ser transmitido aos descendentes, como observado pelos presentes resultados.

8. CONCLUSÃO

A dieta ou a seleção genética de touros Nelore com base na eficiência do consumo alimentar não influenciaram a capacidade de fecundação *in vitro* do sêmen desses animais, tampouco afetaram o desenvolvimento pré-implantacional dos embriões obtidos. Todavia, os embriões descendentes de animais com menor eficiência alimentar exibiram maior acúmulo de lipídeos intracitoplasmáticos. O aumento da expressão do gene *PPARGC1A*, observado nesses embriões, sugere que esta alteração no metabolismo lipídico esteja relacionada à função mitocondrial, sendo necessário avaliar se essas possíveis alterações são decorrentes da modificação da biogênese ou da atividade metabólica mitocondrial em animais geneticamente distintos. Esses resultados pioneiros na espécie bovina sugerem que efeitos ambientais durante a espermatogênese promovem alterações nos espermatozoides que são transmitidas ao embrião na fase pré-implantacional e o impacto na qualidade de embriões produzidos *in vitro* é um importante tema a ser investigado.

9. REFERÊNCIAS

Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (2002). Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. **Molecular Reproduction and Development** 61:57-66.

Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H (1999). Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development** 53:325-335.

Abel ED, Litwin SE, Sweeney G (2008). Cardiac remodeling in obesity. **Physiological Reviews** 88:389–419.

Abraham T, Pin CL, Watson AJ (2012). Embryo collection induces transient activation of XBP1 arm of the ER stress response while embryo vitrification does not. **Molecular Human Reproduction** 18:229-242.

Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ (2000). The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97:1444–1449.

Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 11:545-555.

Alberta Agriculture and Rural Development (2005). Alberta Agriculture and Rural Development. Economic, productive and financial benchmarks for Alberta cow/calf operations.

Al Darwich A, Perreau C, Petit MH, Papillier P, Dupont J, Guillaume D, Mermillod P, Guignot F (2010). Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators** 93:30-36.

Amin A, Gad A, Salilew-Wondim D, Prastowo S, Held E, Hoelker M, Rings F, Thoele E, Neuhoff C, Looft C, Schellander K, Tesfaye D (2014). Bovine embryo survival under oxidative stress condition is associated with the activity of NRF2 mediated oxidative stress response pathway. **Molecular Reproduction and Development** 81:497-513.

Anazetti MC, Melo OS (2007). Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa** 1:37-58.

Anderson J (1946). The Sugar Content of Bull Semen and Its Reduction During Storage. **Journal of Agricultural Science** 36:260-262.

Anderson LM, Riffle L, Wilson R, Travlos GS, Lubomirski MS, Alvord WG (2006). Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. **Nutrition** 22:327–331.

Aparicio IM, Garcia-Herreros M, FAIR T, Lonergan P (2010). Identification and regulation of glycogen synthase kinase-3 during bovine embryo development. **Reproduction** 140:83–92.

Arthur PD, Archer JA, Herd RM, Melville GJ (2001a) Response to selection for vet feed in intake in beef cattle. **Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet** 14:135-138.

Arthur PF, Renand G, Krauss D (2001b). Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. **Livestock Production Science** 68:131-139.

Almeida R (2005). **Consumo e eficiência alimentar de bovinos em crescimento**. 181f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Austin S, St-Pierre J (2012). PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. **Journal of Cell Science** 125:4963-4971.

Awda BJ, Miller SP, Montanholi YR, Vander Voort G, Caldwell T, Buhr MM, Swanson KC (2013). The relationship between feed efficiency traits and fertility in young beef bulls. **Canadian Journal of Animal Science** 93:185–192.

Ayala-Summano JT, Velez-Delvalle C, Beltrán-Langarica A, Marsch-Moreno M, Cerbón-Solorzano J, Kuri-Harcuch W (2006). Srebf1a is a key regulator of transcriptional control for adipogenesis. **Scientific Reports** 1:1-8.

Bagci EZ, Vodovotz Y, Billiar TR, Ermentrout GB, Bahar I (2006). Bistability in Apoptosis: Roles of Bax, Bcl-2, and Mitochondrial Permeability Transition Pores. **Biophysical Journal** 90:1546–1559.

Bakker WJ, Harris IS, Mak TW (2007). FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. **Molecular Cell** 28:941-53.

Baldoceda L, Gagne D, Ferreira CR, Robert C (2016). Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by L-carnitine. **Reproduction, Fertility and Development** 28:1172–1184.

Baron A, Migita T, Tang D, Loda M (2004). Fatty acid synthase: a metabolic oncogene in prostate cancer? **Journal of Cellular Biochemistry** 91:47–53.

Basarab JA, Colazo MG, Ambrose DJ, Novak S, McCartney D, Baron VS (2011). Residual feed intake adjusted for backfat thickness and feeding frequency is independent of fertility in beef heifers. **Canadian Journal of Animal Science** 91: 573–584.

Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K (2010). Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. **Molecular Human Reproduction** 16:135–152.

Bergman EN (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews** 70:567-590.

Berridge MJ (2002). The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. **Cell Calcium** 32:235–249.

Bertolini M, Beam SW, Shim H, Bertolini LR, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB (2002). Growth, Development, and Gene Expression by *In Vivo*- and *In Vitro*-Produced Day 7 and 16 Bovine Embryos. **Molecular Reproduction and Development** 63:318–328.

Bommer GT, MacDougald OA (2011). Regulation of Lipid Homeostasis by the Bifunctional SREBF2-miR33a Locus. **Cell Metabolism** 13:241-247.

Bomfim MM, Andrade GM, Collado M, Sangalli JR, Fontes PK, Nogueira MFG, Meirelles FV, Silveira JC, Perecin F (2017). Antioxidant responses and deregulation of epigenetic writers and erasers link oxidative stress and DNA methylation in bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development** 84:1296–1305.

Botolin D, Wang Y, Christian B, Jump DB (2006). Docosahexaneic acid (22:6,n-3) regulates rat hepatocyte SREBP-1 nuclear abundance by Erk- and 26S proteasome-dependent pathways. **Journal of Lipid Research** 47:181-192.

Bou G, Liu S, Guo J, Zhao Y, Sun M, Xue B, Wang J, Wei Y, Kong Q, Liu Z (2016). Cdx2 represses Oct4 function via inducing its proteasome-dependent degradation in early porcine embryos. **Developmental Biology** 410:36–44.

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AMK, Soares MP (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. **Journal of Experimental Medicine** 192:1015-1025.

Bukau B, Horwich A (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperonin machines. **Cell** 9:351-366.

Bulman AL, Nelson HC (2005). Role of trehalose and heat in the structure of the C-terminal activation domain of the heat shock transcription factor. **Protein** 58:826–835.

Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO (1992). Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. **Journal of Biological Chemistry** 267:14523-14526.

Cagnone G, Sirard M (2014). The impact of exposure to serum lipids during *in vitro* culture on the transcriptome of bovine blastocysts. **Theriogenology** 81:712–722.

Campanholi SP, Monteiro FM, Dias REA, Mercadante MEZ, Paz CCP, Dell'aqua Junior JA, Papa, FO, Dell'aqua CPF, Vantini R, Garcia JM (2017). Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and *in vitro* fertility. **Theriogenology** 89:114–121.

Carone BR, Fauquier L, Habib N, Shea JM, Hart CE, Li R, Bock C, Li C, Gu H, Zamore PD, Meissner A, Weng Z, Hofmann HA, Friedman N, Rando OJ (2010). Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. **Cell** 143:1084–1096.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, MG, 104 p.

Cerri RLA, Juchem SO, Chebel RC, Rutigliano HM, Bruno RGS, Galvão KN, Thatcher WW, Santos JEP (2009). Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. **Journal Dairy Science** 92:1520–1531.

Chang TY, Li BL, Chang CC, Urano Y (2009). Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism** 297:E1-E9.

Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, Lee LY, Sobel RA, Steinman L, Soares M P (2007). Heme oxygenase–1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. **The Journal of Clinical Investigation** 117:438-447.

Christians E, Michel E, Adenot P, Mezger V, Rallu M, Morange M, Renard JP (1997). Evidence for the involvement of mouse heat shock factor 1 in the atypical expression of the HSP70.1 heat shock gene during mouse zygotic genome activation. **Molecular Cell Biology** 17:778-788.

Chow CM, Georgiou A, Szutorisz H, Maia E, Silva A, Pombo A, Barahona I, Dargelos E, Canzonetta C, Dillon N (2005). Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. **EMBO Reports** 6: 354-360.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008). Caspases — An update. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** 151:10-27.

Conine CC, Sun F, Song L, Rivera-Pérez JA, Rando OJ (2018). Small RNAs gained during epididymal transit of sperm are essential for embryonic development in mice. **Developmental Cell** 46:470-480.

Conrad ME, Umbreit JN (2000). Iron absorption and transport-an update. **American Journal Hematology** 64:287-298.

Costa EBO, Pacheco C (2013). Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde** 34:125-136.

Costa RLD, Fontes RS (2010). Ácidos graxos na nutrição e reprodução de ruminantes. **PUBVET** 4:872-878.

Costa RLD (2007). **Efeito da suplementação com gordura protegida no retorno ao estro em ovelhas da raça Santa Inês**. 101 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.

Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE (1999). Molecular regulation of adipocyte differentiation. **Seminars in Cell and Developmental Biology** 10:3–10.

Daury L, Chailleux C, Bonvallet J, Trouche D (2006). Histone H3.3 deposition at E2F-regulated genes is linked to transcription. **EMBO Reports** 7:66-71.

David ES, Cingari DS, Ferraris RP (1995). Dietary induction of intestinal fructose absorption in weaning rats. **Pediatric Research** 37:777-782.

Davidson NO, Hausman AM, Ifkovits CA, Buse JB, Gould GW, Burant CF, Bell GI (1992). Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. **American Journal Physiology** 262:C795-800.

Deckelbaum RJ, Worgall TS, Seo T (2006). n-3 fatty acids and gene expression. **The American Journal of Clinical Nutrition** 83:1520S–1525S.

Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, Guyader-Joly C, Degrouard J, Renard JP (2001). Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology** 55:923-936.

Ding N, Zhou H, Esteve PO, Chin HG, Kim S, Xu X, Joseph SM, Friez MJ, Schwartz CE, Pradhan S, Boyer TG (2008). Mediator links epigenetic silencing of neuronal gene expression with x-linked mental retardation. **Molecular Cell** 31:347-359.

Douard V, Ferraris RP (2008). Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. **American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism** 295:E227-237.

Dovey OM, Foster ST, Cowley SM (2010). Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. **PNAS** 107:8242-8247.

Durante W (2003). Heme oxygenase-1 in growth control and its clinical application to vascular disease, **Journal of Cellular Physiology** 195:373-382.

Duvnjak M, Leroti I, Barsic N, Tomasic V, Virovic JL, Velagic V (2007). Pathogenesis and management issues for nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology** 13:4539-4550.

Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie** 86:839-848.

El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard M A, Schellander K, Tesfaye D (2006). Largescale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiol Genomics** 28:84–96.

Esmaeili V, Shahverdi AH, Alizadeh AR, Alipour H, Chehrazi M (2014). Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen–thawed semen and blood parameters in rams. **Andrologia** 46:42–49.

Estall JL, Kahn M, Cooper MP, Fisher FM, Wu MK, Laznik D, Qu L, Cohen DE, Shulman GI, Spiegelman BM (2009). Sensitivity of lipid metabolism and insulin signaling to genetic alterations in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression. **Diabetes** 58:1499-1508.

Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, McDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM (1990). Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biology of reproduction** 43:210– 218.

Ferreira FA, Santos DO, Ribas LO, Brito EF, Ribas MO (2015). Consumo alimentar residual em bovinos de corte. **Nutritime** 12:4368-4378.

Finkel T (2006). Cell biology: a clean energy programme. **Nature** 444:151-152.

Fontanier-Razzaq NC, Hay SM, Ress WD (1999). Upregulation of CHOP-10 (gadd153) Expression in the Mouse Blastocyst as a Response to Stress. **Molecular Reproduction and Development** 54:326–332.

Fouladi-Nashta AA, Gutierrez CG, Gong JG, Gansworthy PC, Webb R (2007). Impact of Dietary Fatty Acids on Oocyte Quality and Development in Lactating Dairy Cows. **Biology of Reproduction** 77:9–17.

Fouladi-Nashta AA, Wonnacott KE, Gutierrez CG, Gong JG, Sinclair KD, Gansworthy PC, Webb R (2009). Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction** 138:771–781.

Fulchuk KH, Contin JM, Dzedzic TS, Feng Z, French TC, Heffron GJ, Montorzi M (2002). A role for biliverdin IXa in dorsal axis development of *Xenopus laevis* embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 99:251-256.

Funston RN (2004). Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science** 82:E154–E161.

Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJ, Adams CM, Anthony TG, Wek RC (2016). Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. **Molecular Biology of the Cell** 27:1536-1551.

Gardner DK, Pool TB, Lane M (2000). Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. **Seminars in Reproductive Medicine** 18:205-218.

Gastman BR, Johnson DE, Whiteside TL, Rabinowich H (1999). Caspase-mediated Degradation of T-Cell Receptor α -Chain. **Cancer Research** 59:1422–142799.

Gentile L, Monti M, Sebastiano V, Merico V, Nicolai R, Calvani M, Garagna S, Redi CA, Zuccotti M (2004). Single-cell quantitative RT-PCR analysis of Cpt1b and Cpt2 gene expression in mouse antral oocytes and in preimplantation embryos. **Cytogenet Genome Research** 105:215-21.

Georgiadi A, Boekschoten MV, Muller M, Kersten S (2012). Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart. **Physiological Genomics** 44:352-361.

Ghanem N, Salilew-Wondim D, Gad A, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen, E, Looft C, Schellander K, Hoelker M (2011). Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. **Reproduction** 142:551–564.

Gómez E, Caamaño JN, Bermejo-Alvarez P, Díez C, Muñoz M, Martín D, Carrocera S, Gutiérrez-Adán A (2009). Gene expression in early expanded parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine blastocysts. **Journal Reproduction and Development** 55:607-614.

Gonçalves PBD, Olivera MAL, Mezzalira A, Montagner MM, Visintin JA, Costa LFS (2008) Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, cap. 14, p. 61-91.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB (2007). Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia** 53:335-343.

Guillou H, Zadavec D, Martin PGP, Jacobsson A (2010). The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. **Progress in Lipid Research** 49:186–199.

Gupta SC, Siddique HR, Mathur N, Vishwakarma AL, Mishara RK, Saxena DK, Chowdhuri DK (2007). Induction of Hsp70, alteration in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: modulation by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta** 1770:1382-1394.

Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN (2002). **Lipid biochemistry: an introduction**. 5. ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd., 340 p.

Harvey AJ, Kind KL, Thompson J G (2002). Redox regulation of early embryo development. **Reproduction** 123:479–486.

Hensen SMM, Heldens L, Enckevort CMWV, Genesen STV, Pruijn GJM, Lubsen NL (2012). Heat shock factor 1 is inactivated by amino acid deprivation. **Cell Stress and Chaperones** 17:743–755.

Herd RM, Bishop SC (2000). Genetic variation in residual feed intake and its association with other production traits in British Hereford cattle. **Livestock Production Science** 63:111–119.

Herrick JR, Lane M, Gardner DK, Behboodi E, Memili E, Blash S, Echelard Y, Krisher RL (2006). Metabolism, protein content, and *in vitro* embryonic development of goat cumulus-oocyte complexes matured with physiological concentrations of glucose and L-lactate. **Molecular Reproduction and Development** 73:256-266.

Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H (1998). Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States** 95:5987-92.

Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ (1996). Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. **Molecular Reproduction Development** 44:476– 485.

Imai H, Hakkaku N, Iwamoto R, Suzuki J, Suzuki T, Tajima Y, Konishi K, Minami S, Ichinose S, Ishizaka K, Shioda S, Arata S, Nishimura M, Naito S, Nakagawa Y (2009). Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. **Journal of Biological Chemistry** 284:32522-32532.

Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y (2001). Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. **Biology of Reproduction** 64:674-683.

Ingold I, Aichler M, Yefremova E, Roveri A, Buday K, Doll S, Tasdemir A, Hoffard N, Wurst W, Walch A, Ursini F, Angeli JPF, Conrad M (2015). Expression of a catalytically inactive mutant form of glutathione peroxidase 4 (Gpx4) confers a dominant-negative effect in male fertility. **Journal of Biological Chemistry** 290:14668–14678.

Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A (2006). Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. **Progress in Lipid Research** 45:237-249.

Jansen S, Cashman K, Thompson JG, Pantaleon ML, Kaye PL (2009). Glucose deprivation, oxidative stress and peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPARA) cause peroxisome proliferation in preimplantation mouse embryos. **Reproduction** 138:493–505.

Jenkins TC (1993). Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism - Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science** 76:3851-3863.

Jeyasuria P, Wetzel J, Bradley M, Subedi K, Condon JC (2009). Progesterone-regulated caspase 3 action in the mouse may play a role in uterine quiescence during pregnancy through fragmentation of uterine myocyte contractile proteins. **Biology of reproduction** 80:928–934.

Jing L, Hou Y, Wu H, Miao Y, Li X, Cao J, Brameld JM, Parr T, Zhao S (2015). Transcriptome analysis of mRNA and miRNA in skeletal muscle indicates an important network for differential Residual Feed Intake in pigs. **Scientific Reports** 5:1-14.

Johnson DE (1998). Regulation of survival pathways by IL-3 and induction of apoptosis following IL-3 withdrawal. **Frontiers in Bioscience** 3:313-324.

Johnson R, Teh CH, Kunarso G, Wong KY, Srinivasan G, Cooper ML, Volta M, Chan SS, Lipovich L, Pollard SM, Karatur RKM, Wei C, Buckley NJ, Stanton LW (2008). REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells. **Plos Biololy** 6:2205-2219.

Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O (2005). Fatty acid regulation of hepatic Gene transcription. **The Journal of Nutrition** 135:2503– 2506.

Kagalwala MN, Singh SK, Majumder S (2008). Stemness is only a state of the cell. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology** 73:227-234.

Kagawa Y, Ohta S (1990). Regulation of mitochondrial ATP synthesis in mammalian cells by transcriptional control. **International Journal of Biochemistry** 22:219-229.

Kalmar T, Lim C, Hayward P, Muñoz-Descalzo S, Nichols J, Garcia-Ojalvo J, Arias AM (2009). Regulated Fluctuations in Nanog Expression Mediate Cell Fate Decisions in Embryonic Stem Cells. **Plos Biology** 7:1-16.

Khan DR, Dube D, Gall L, Peynot N, Ruffini S, Laffont L, Le Bourhis D, Degrelle S, Jouneau A, Duranthon V (2012). Expression of pluripotency master regulators during two key developmental transitions: EGA and early lineage specification in the bovine embryo. **PLoS One** 7:1-12.

Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y (2001). Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction** 122:131–138.

Kim KH (1997). Regulation of Mammalian Acetyl-Coenzyme A Carboxylase. **Annual Review of Nutrition** 17:77–99.

Kim MS, Sakurai T, Bai H, Bai R, Sato D, Nagaoka K, Chang KT, Godkin JD, Min KS, Imakawa K (2013). Presence of Transcription Factor OCT4 limits Interferon-tau Expression during the Preattachment Period in Sheep. **Asian Australasian Journal of Animal Science** 26:638-645.

Khoshvaght A, Towhidi A, Zare-shahneh A, Norouzi M, Zhandl M, Davachi ND, Karimi R (2016). Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. **Theriogenology** 85:807–812.

Koch RM, Swiger LA, Chambers D, Gregory KE (1963). Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal of Animal Science** 22:486-494.

Kojima T, Zeniya Y, Aoyama T, Kondo A, Yoshino J (1997). Dietary administration of fatty acids-enriched mold dried cell containing γ -linolenic acid to female pigs improves ovulation rate and embryo quality in summer. **Journal of Reproduction and Development** 43:121-127.

Kong QR, Xie BT, Zhang H, Li JY, Huang TQ, Wei RY, Liu ZH (2016). RE1-silencing Transcription Factor (REST) Is Required for Nuclear Reprogramming by Inhibiting Transforming Growth Factor beta Signaling Pathway. **Journal of Biological Chemistry** 291:27334-27342.

Kronke G, Kadl A, Ikonomu E, Bluml S, Furnkranz A, Sarembock IJ, Bochkov VN, Exner M, Binder BR, Leitinger N (2007). Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology** 27:1276-1282.

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science** 300:1439-1443.

Lancaster PA, Carstens GE, Crews DH jr, Welsh TH jr, Forbes TD, Forrest DW, Tedeschi LO, Randel RD, Rouquette FM (2009). Phenotypic and genetic relationships of residual feed intake with performance and ultrasound carcass traits in Brangus heifers. **Journal of Animal Science** 87:3887–3896.

Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, Hardy K (1993). Early human embryo metabolism. **Bioessays** 15:259-264.

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. **Journal of Clinical Investigation** 106: 847-856.

Leidenfrost S, Boelhauve M, Reichenbach M, Gungor T, Reichenbach H, Sinowatz F, Wolf E, Habermann FA (2011). Cell Arrest and Cell Death in Mammalian Preimplantation Development: Lessons from the Bovine Model. **Plos One** 6:1-13.

Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MTT, Bernardi ML, Rubin MIB, Silva CAM (2011). Fetal calf serum enhances *in vitro* production of Bos taurus indicus embryos. **Theriogenology** 75:429 – 433.

Le Masson F, Razak Z, Kaigo M, Audouard C, Charry C, Cooke H, Westwood JT, Christians ES (2011). Identification of heat shock factor 1 molecular and cellular targets during embryonic and adult female meiosis. **Molecular Cell Biology** 31:3410-3423.

Leyens G, Knoops B, Donnay I (2004). Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Molecular Reproduction Development** 69: 243–251.

Lin H, Yu CH, Jen CY, Cheng CF, Chou Y, Chang CC, Juan SH (2010). Adiponectin-mediated heme oxygenase-1 induction protects against iron-induced liver injury via a PPARalpha dependent mechanism. **American Journal of Pathology** 177:1697-1709.

Lin T, Lee JE, Oqani RK, Kim SY, Cho ES, Jeong YD, Baek JJ, Jin D (2017). Delayed blastocyst formation or an extra day culture increases apoptosis in pig blastocysts. **Animal Reproduction Science** 185:128-139.

Li QL, Ju ZH, Huang JM, Li JB, Li RL, Hou MH, Wang CF, Zhong JF (2011). Two novel SNPs in HSF1 gene are associated with thermal tolerance traits in chinese holstein cattle. **DNA and Cell Biology** 30:247–254.

Li WZ, Zhao SM, Huang Y, Yang MH, Pan HB, Zhang X, Ge CR, Gao SZ (2012). Expression of lipogenic genes during porcine intramuscular preadipocyte differentiation. **Research in Veterinary Science** 93:1190-1194.

Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adán A, Moreira PM, Pintado B, Fuente J, Boland MP (2003). Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote to Blastocyst Stage *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction** 69:1424–1431.

Lopes CN, Scarpa AB, Cappellozza BI, Cooke RF, Vasconcelos JLM (2009). Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of Bos indicus beef cows. **Journal of Animal Science** 87:3935–3943.

Machado GM (2012). **Cultivo pós-eclosão de embriões bovinos produzidos *in vitro*: aspectos morfológicos e moleculares**. 145 f., Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Brasília, Brasília.

Madore E, Harvey N, Parent J, Chapdelaine P, Arosh JA, Fortier MA (2003). An Aldose reductase with 20-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin F2α in the bovine endometrium. **Journal of Biological Chemistry** 278:11205- 11212.

Maiorino M, Wissing JB, Brigelius-Flohe R, Calabrese F, Roveri A, Steinert P, Ursini F, Flohe L (1998). Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation. **FASEB Journal** 12:1359-1370.

Martinez-Morales JR, Signore M, Acampora D, Simeone A, Bovolenta P (2001). Otx genes are required for tissue specification in the developing eye. **Development** 128:2019-2030.

Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J (1997). Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPAR α and PPAR γ activators. **Journal of Biological Chemistry** 272:28210–28217.

Martin KL, Leese HJ (1999). Role of developmental factors in the switch from pyruvate to glucose as the major exogenous energy substrate in the preimplantation mouse embryo. **Reproduction, Fertility and Development** 11:425-433.

Martin KL, Leese HJ (1995). Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. **Molecular Reproduction and Development** 40:436-443.

Mashek DG, Li LO, Coleman RA (2006). Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. **Journal of Lipid Research** 47:2004–2010.

Mcevoy TG, Couil GD, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Speake BK (2000). Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pelúcida. **Journal of Reproduction and Fertility** 118:163–170.

Mckay JA, Mathers JC (2011). Diet induced epigenetic changes and their implications for health. **Acta Physiologica (Oxf)** 202:103-118.

Mcneel RL, Ding ST, Smith EO, Mersmann HJ (2000). Expression of porcine adipocyte transcripts during differentiation *in vitro* and *in vivo*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** 126: 291-302.

Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL (2002). Current status of sperm of cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology** 57:327-344.

Mehaisen GMK, Saeed AM, Gad A, Abass AO, Arafa M, El-Sayed A (2015). Antioxidant Capacity of Melatonin on Preimplantation Development of Fresh and Vitrified Rabbit Embryos: Morphological and Molecular Aspects. **Plos One** 10:1-16.

Meneghel M, Dall'Acqua PC, Ambrogi M, Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Mingoti GZ (2017). Lipid content and cryotolerance of *in vitro*-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 37:395-400.

Michalak M, Gye MC (2015). Endoplasmic reticulum stress in periimplantation embryos. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine** 42:1-7.

Miyauchi TM (2011). **Protocolos hormonais de preparação de doadoras bovinas para produção de embriões *in vitro***. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas.

Moreira M (2015). **Análise do gene OTX2 em pacientes com deficiência de hormônio de crescimento isolada ou associada a outras deficiências hormonais hipofisárias**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology** 65:1551–1562.

Na WH, Kang HS, Eo JW, Gye MC, Kim MK (2006). Expression and localization of ATF4 gene on oxidative stress in preimplantation mouse embryo. **Development & Reproduction** 10:105–113.

Nelson DL, Cox MM (2014). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 1298 p.

Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ (2010). Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. **Nature** 467:963–966.

NRC (2000). **Nutrient requirements of beef cattle**. 7th edition, National Academies Press, Washington D. C.

Ostrowska M, Jarczak J, Zwierzchowski L (2015). Glucose transporters in cattle - a review. **Animal Science Papers and Reports** 33:191-212.

Ou Z, Martin DM, Bedoyan JK, Cooper ML, Chinault AC, Stankiewicz P, Cheung SW (2008). Branchiootorenal Syndrome and Oculoauriculovertebral Spectrum Features Associated With Duplication of SIX1, SIX6, and OTX2 Resulting From a Complex Chromosomal Rearrangement. **American Journal of Medical Genetics Part A** 146A:2480–2489.

Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of reproduction** 38:1171–1180.

Pereira RM, Carvalhais I, Pimenta J, Baptista MC, Vasques MI, Horta AEM, Santos IC, Marques MR, Reis A, Pereira MS, Marques CC (2008). Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture. **Animal Reproduction Science** 106:322–332.

Pregl B, Kovačič B, Vlaisavljević V (2013). Are sperm DNA fragmentation hyperactivation and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection? **Fertility and Sterility** 99:1233-1241.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. **Cell** 92: 829-839.

Rando OJ, Simmons RA (2015). I'm Eating for Two: Parental Dietary Effects on Offspring Metabolism. **Cell** 61:93–105.

Razza EM (2017). “**Expressão gênica diferencial, análise ultraestrutural e avaliação do perfil lipídico de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados convencionalmente ou pelo sistema spom.**” 123 f. Tese (Doutorado - Farmacologia e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista – Botucatu, São Paulo.

Rekik W, Dufort I, Sirard MA (2011). Analysis of the gene expression pattern of bovine blastocysts at three stages of development. **Molecular Reproduction Development** 78:226–240.

Richardson EC, Herd RM, Oddy VH, Thompson JM, Archer JA, Arthur PF (2001). Body composition and implications for heat production of Angus steers progeny of parents selected for and against residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 41:1065-1072.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P (2002). Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development *In Vitro* Versus *In Vivo*: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. **Molecular Reproduction and Development** 61:234-248.

Rodriguez-Alvarez L, Velasquez AE (2015). Pursuit of Markers to Assess and Select Competence of invitro-Produced Embryos. **Austin Journal of InVitro Fertilization** 2:1-6.

Rolfe KM, Snelling WM, Nielsen MK, Freetlt HC, Ferrel CL, Jenkis TG (2011). Genetic and phenotypic parameter estimator for feed intake and other traits in growing beef cattle. **Journal of Animal Science** 89:3452–3459.

Rossi GF (2017). **Parâmetros reprodutivos de machos da raça Nelore de baixa e alta eficiência alimentar suplementados com ácidos graxos protegidos em pastagem.** 119 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

Saggerson D (2010). Malonyl-CoA, a Key Signaling Molecule in Mammalian Cells. **Annual Review of Nutrition** 28:253–272.

Sanna D, Sanna A, Mara L, Pilichi S, Mastinu A, Chessa F, Pani L, Dattena M (2010). Oct4 expression in in-vitro-produced sheep blastocysts and embryonic-stem-like cells. **Cell Biology International** 34:53- 60.

Santos JE, Cerri RL, Sartori R (2008). Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology** 69:88-97.

Sartori R, Mollo MR (2007). Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 31:197-204.

Sata R, Tsujii H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H (1999). Fatty Acid Composition of Bovine Embryos Cultured in Serum-Free and Serum-Containing Medium during Early Embryonic Development. **Journal of Reproduction and Development** 45:97–103.

Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, Neumuller C, Deutsch MJ, Walch A, Hrabe DE, Angelis M, Wurst W, Ursini F, Roveri A, Maleszewski M, Maiorino M, Conrad M (2009). Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. **FASEB Journal** 23:3233-3242.

Schonthal AH (2012). Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. **Scientifica** (Cairo) 2012:1-26.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **Journal of Lipid Research** 37:907–925.

Seidel jr GE (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology** 65:228-235.

Sfeir Z, Ibrahim A, Amri E, Grimaldi P, Abumrad N (1997). Regulation of FAT/CD36 gene expression: further evidence in support of a role of the protein in fatty acid binding/transport. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 57:17-21.

Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Belleannee C, Kucukural A, Serra RW, Sun F, Song L, Carone BR, Ricci EP, Li XZ, Fauquier L, Moore MJ, Sullivan R, Mello CC, Garber M, Rando OJ (2016). Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. **Science** 351:391–396.

Sharma U, Sun F, Conine CC, Reichholf B, Kukreja S, Herzog VA, Ameres SL, Rando OJ (2018). Small RNAs are trafficked from the epididymis to developing mammalian sperm. **Developmental Cell** 46:481–494.

Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL (1997). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. **Journal of Clinical Investigation** 99:846-854.

Silva CF, Sartorelli ES, Castilho ACS, Satrapa RA, Puelker RZ, Razza EM, Ticianelli JS, Eduardo HP, Loureiro B, Barros CM (2013). Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. **Theriogenology** 79:351–357.

Silva PE (2013). **Redução da expressão do GLUT4 induzida por palmitato não envolve estresse de retículo endoplasmático em células musculares L6**. 31 f. Tese (Doutorado em Ciência) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase., **Progress in Lipid Research** 42:289–317.

Solano ME, Kowa MK, O'Rourke GE, Horst AK, Modest K, Plösch T, Barikbin R, Remus CC, Berger RG, Jago C, Ho H, Sass G, Parker VJ, Lydon JP, Demayo FJ, Hecher K, Kariml K, Arck PC (2015). Progesterone and HMOX-1 promote fetal growth by CD8+ T cell modulation. **The Journal of Clinical Investigation** 125:1727-1738.

Soria LA, Corva PM, Branda SA, Villarreal EL, Melucci LM, Mezzadra CA, Papaleo MJ, Fernandez MG, Silvestro C, Schor A, Miquel MC (2009). Association of a novel polymorphism in the bovine PPARGC1A gene with growth, slaughter and meat quality traits in Brangus steers. **Molecular and Cellular Probes** 23:304-308.

Soubry A, Hoyo C, Jirtle RL, Murphy SK (2014). A paternal environmental legacy: evidence for epigenetic inheritance through the male germ line. **Bioessays** 36:359-371.

Soubry A, Schildkraut JM, Murtha A, Wang F, Huang Z, Bernal A, Kurtzberg J, Jirtle RL, Murphy SK, Hoyo C (2013). Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: Results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. **BMC Medicine** 11:1-10.

Spencer TE, Bazer FW (1996). Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology** 137:1144–1147.

Sritanaudomchai H, Sparman M, Tachibana M, Clepper L, Woodward J, Gokhale S, Wolf D, Hennebold J, Hurlbut W, Grompe M, Mitalipov S (2009). CDX2 in the formation of the trophectoderm lineage in primate embryos. **Developmental Biology** 335:179–187.

Stocker R, Glazer AN, Ames BN (1987a). Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 84:5918-5922.

Stocker R, Yamamoto Y, Mcdonagh AF, Glazer AN, Ames BN (1987b). Bilirubin is and antioxidant of possible physiological importance, **Science** 235:1043-1046.

Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, Mcevoy TG (2009). Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals** 44:50–58.

Suen D, Norris KL, Youle RJ (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. **Genes & Development** 22:1577–1590.

Szyf M (2015). Nongenetic inheritance and transgenerational epigenetics. **Trends in Molecular Medicine** 21:134-144.

Tachibana M, Clepper L, Sparman M, Ramsey K, Mitalipov S (2009). The Role of NANOG During Primate Pre-Implantation Embryo Development. **Biology of Reproduction** 81:248.

Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. **Cell** 116:51-61.

Takii R, Inouye S, Fujimoto M, Nakamura T, Shinkawa T, Prakasam R, Tan K, Hayashida N, Ichikawa H, Hai T, Nakai A (2010). Heat shock transcription factor 1 inhibits expression of IL-6 through activating transcription factor 3. **Journal of Immunology** 184:1041-1048.

Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC (2007). Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama (PPAR γ): Estudo Molecular na Homeostase da Glicose, Metabolismo de Lipídeos e Abordagem Terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** 51:526-533.

Tesfaye D, Ghanem N, Rings F, Hoelker R (2009). 196 Embryo biopsy transcriptomics: a potential tool to identify transcripts directly related to the ability of the embryo to induce pregnancy after transfer. **Reproduction Fertility and Development** 21.

Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, Mcmillan WH, Tervit HR (1995). Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction** 53:1385–1391.

Thornberry N A, Lazebnik Y (1998). Caspases: Enemies within. **Science** 28:1312-1316.

Tizioto PC, Coutinho LL, Decker JE, Schnabel RD, Rosa KO, Oliveira PS, Souza MM, Mourao GB, Tullio RR, Chaves AS, Lanna DP, Zerlotini-Neto A, Mudadu MA, Taylor JF, Regitano LC. Global liver gene expression differences in Nelore steers with divergent residual feed intake phenotypes. **BMC Genomics** 16:1-14.

Tran LV, Malla BA, Kumar S, Tyagi AK (2017). Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction — A Review. **Asian-Australas Journal of Animal Science** 30:622-637.

Uzbekova S, Salhab M, Perreau C, Mermillod P, Dupont J (2009). Glycogen synthase kinase 3B in bovine oocytes and granulosa cells: possible involvement in meiosis during *in vitro* maturation. **Reproduction** 138:235–246.

Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H (1999). The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. **Theriogenology** 52:939–948.

Wagner JJ, Lusby KS, Oltjen JW, Rakestraw J, Wettemann RP, Walters LE (1988). Carcass composition in mature hereford cows: Estimation and effect on daily metabolizable energy requirement during winter. **Journal of Animal Science** 66: 603-612.

Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin LN, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. **Annual Review of Immunology** 17:331–367.

Wang Z, Zhang W, Ji JL, Gao QX, Xiao SH, Wang F (2013). Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of *in vitro* fertilized ovine embryos, **Theriogenology** 79:695-701.

Wang H, Rapp UR, Reed C (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. **Cell** 87:629-638.

Watanabe S, Akagi R, Mori M, Tsuchiya T, Sassa S (2004). Marked Developmental Changes in Heme Oxygenase-1 (HO-1) Expression in the Mouse Placenta: Correlation Between HO-1 Expression and Placental Development. **Placenta** 25:387–395.

Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology Reproduction** 77:190-201.

Wdowiak A, Wdowiak E, Bojar I (2016). Improving the safety of the embryo and the patient during *in vitro* fertilization procedures. **Videosurgery and Miniinvasive Techniques** 11:137–143.

Weikard R, Kuhn C, Goldammer T, Freyer G, Schwerin M (2005). The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. **Physiological Genomics** 21:1-13.

Wu Q, Suzuki M (2006). Parental obesity and overweight affect the body-fat accumulation in the offspring: the possible effect of a high-fat diet through epigenetic inheritance. **Obesity Reviews** 7:201-208.

Yang MY, Rajamahendran R (2002). Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reproduction Science** 70:159–169.

Yang E, Korsmeyer SJ (1996). Molecular Thanatopsis: A Discourse on the BCL2 Family and Cell Death. **Blood** 88:386-401.

Yao N, Wan PC, Hao ZD, Gao FF, Yang L, Cui MS, Wu Y, Liu JH, Liu S, Chen H, Zeng SM (2009). Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. **Reproduction in Domestic Animals** 44:132–139.

Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. **Nature** 413:131–138.

Yuan J (1997). Transducing signals of life and death. **Current Opinion in Cell Biology** 9:247-251.

Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H, Am J (2014). The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. **Stem Cells** 3:74- 82.

Zhang K, Wang H, Rajput SK, Folger JK, Smith GW (2017). Characterization of H3.3 and HIRA expression and function in bovine early embryos. **Molecular Reproduction and Development** 8:106–116.

Zhang Y, Jin Y, Williams TA, Burtenshaw SM, Martyn AC, Lu R (2010). Amino acid deprivation induces CREBZF/Zhangfei expression via an AARE-like element in the promoter. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 391:1352-1357.

Zheng P, Bavister BD, Ji W (2001). Energy substrate requirement for *in vitro* maturation of oocytes from unstimulated adult rhesus monkeys. **Molecular Reproduction and Development** 58:348-355.

Zheng P, Vassena R, Latham KE (2007). Effects of *in vitro* oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos. **Molecular human reproduction**13:361–371.

ANEXOS

Anexo 1. Expressão gênica relativa (dCt) em blastocistos bovinos (D7) produzidos *in vitro* a partir da fertilização de oócitos com sêmen de touros Nelore suplementados com dieta enriquecida em ácidos graxos e classificados de acordo com o consumo alimentar

Gene	Tratamento				P-valor		
	Controle CAR-	Controle CAR+	Megalac CAR-	Megalac CAR+	Dieta	CAR	Dieta*CAR
<i>Apoptosis</i>							
<i>BAX</i>	-0,089±0,263	0,438±0,322	0,027±0,322	-0,014±0,322	0,6099	0,4677	0,3989
<i>BCL-2</i>	6,309±0,969	9,773±1,187	8,572±1,187	8,114±1,187	0,8014	0,2434	0,1451
<i>BID</i>	4,186±0,314	4,175±0,384	3,857±0,384	4,508±0,384	0,9987	0,3978	0,9903
<i>CASP3</i>	6,724±0,324	6,275±0,265	6,406±0,459	6,645±0,459	0,3730	0,7647	0,5121
<i>CASP9</i>	3,290±0,249	3,474±0,203	3,115±0,353	3,213±0,353	0,5156	0,6676	0,8951
<i>Differentiation and implantation</i>							
<i>CDX2</i>	1,281±0,175	1,082±0,143	0,702±0,248	0,617±0,248	0,0882	0,5457	0,8035
<i>IFNT2/IFNT3/IFNT</i>	4,787±0,305	3,897±0,374	3,695±0,374	3,684±0,374	0,1281	0,2645	0,2742
<i>PLAC8</i>	6,819±0,613	8,212±0,613	7,046±0,613	10,743±1,062	0,0619	0,0028	0,3977
<i>Embryo development</i>							
<i>GSK3A</i>	1,193±0,189	1,184±0,189	0,820±0,189	0,903±0,189	0,1222	0,8485	0,8129
<i>HMOX1</i>	6,063±0,303	5,491±0,303	4,593±0,303	4,740±0,371	0,0107	0,5311	0,3007

<i>OTX2</i>	1,855±0,306	1,521±0,306	1,604±0,531	2,071±0,306	0,7048	0,8654	0,3274
<i>PA2G4</i>	-0,280±0,193	0,080±0,193	-0,160±0,193	0,441±0,335	0,3494	0,0888	0,6289
<i>POU5F1</i>	-1,563±0,146	-1,800±0,103	-2,279±0,103	-1,830±0,146	0,0994	0,4939	0,1146
<i>PRDX1</i>	-1,544±0,088	-1,405±0,062	-1,631±0,062	-1,326±0,088	0,9631	0,1009	0,3881
<i>RPLP0</i>	-2,599±0,170 A	-3,063±0,170AB	-3,257±0,170 B	-2,839±0,170AB	0,2382	0,8977	0,0325
<i>S100A10</i>	1,117±0,212	1,342±0,212	0,949±0,212	1,304±0,212	0,6391	0,2082	0,7673
<i>S100A14</i>	-1,938±0,162	-1,853±0,162	-2,159±0,162	-1,774±0,162	0,6731	0,1862	0,3843
<i>Endoplasmic reticulum stress</i>							
<i>ATF4</i>	2,223±0,310 A	1,060±0,310 B	0,818±0,310 B	1,281±0,310 AB	0,0910	0,1046	0,0156
<i>CPT1B</i>	9,253±0,993	9,417±0,811	9,113±1,405	8,708±1,405	0,7436	0,9253	0,8255
<i>CPT2</i>	2,886±0,332	3,009±0,271	2,473±0,469	3,084±0,469	0,6981	0,4220	0,5812
<i>DDIT3</i>	4,052±0,231	3,867±0,327	3,882±0,327	4,445±0,231	0,5458	0,5724	0,3177
<i>Epigenetic regulation</i>							
<i>H2AFZ</i>	-0,009±0,109	-0,092±0,109	-0,199±0,109	0,046±0,134	0,8316	0,5058	0,1998
<i>H3F3A</i>	3,337±0,302 A	1,877±0,302 B	1,839±0,302 B	2,001±0,370 AB	0,0695	0,0829	0,0392
<i>H3F3B</i>	2,394±0,111	2,527±0,111	2,389±0,111	2,583±0,137	0,8381	0,2118	0,8056
<i>HDAC2</i>	2,597±0,166	2,708±0,166	2,706±0,166	2,704±0,204	0,7737	0,7669	0,7590
<i>Glucose metabolism</i>							
<i>AKR1B1</i>	3,816±0,457	5,418±0,457	5,135±0,457	5,324±0,457	0,2822	0,3170	0,3902
<i>PGK1</i>	1,569±0,203	1,664±0,203	1,537±0,203	1,861±0,352	0,7509	0,4325	0,6623
<i>Heat shock response</i>							
<i>HSF1</i>	1,335±0,184	0,469±0,184	0,320±0,184	0,869±0,226	0,1613	0,4453	0,0086

<i>HSP90AA1</i>	-2,210±0,118	-2,042±0,118	-2,081±0,118	-2,022±0,145	0,5730	0,3999	0,6784
<i>HSPA1A</i>	6,555±0,684	4,619±0,684	3,227±0,684	4,570±0,838	0,0531	0,6951	0,0586
<i>HSPA5</i>	-0,542±0,238	-0,544±0,238	-0,480±0,238	-0,506±0,292	0,8490	0,9573	0,9621
<i>HSPD1</i>	-0,086±0,145	0,167±0,145	0,147±0,145	0,332±0,177	0,2358	0,1965	0,8328
<i>Lipid metabolism</i>							
<i>ACACA</i>	1,786± 0,218	1,989± 0,218	1,652± 0,218	1,630± 1,630	0,2920	0,6912	0,6214
<i>ACAT1</i>	2,475± 0,275	3,634± 0,275	3,211± 0,275	3,170± 0,275	0,6340	0,0768	0,0608
<i>ACSL1</i>	4,447± 0,170	4,332± 0,170	4,306± 0,170	4,082± 0,170	0,2474	0,7402	0,8024
<i>ACSL3</i>	-0,899± 0,253	-0,818±0,253	-1,424±0,253	-1,286±0,253	0,0858	0,6775	0,9139
<i>AGPAT1</i>	3,128±0,415	3,773±0,415	3,576±0,415	3,784±0,415	0,4877	0,5379	0,7251
<i>AGPAT9</i>	-1,341±0,345	-1,784±0,345	-1,923±0,345	-2,154±0,345	0,2060	0,3590	0,7667
<i>CD36</i>	7,111±0,507	8,767±0,414	7,739±0,718	8,426±0,718	0,8272	0,1481	0,4815
<i>DGAT1</i>	2,984±0,500	2,319±0,707	2,431±0,707	2,590±0,500	0,8397	0,7195	0,5709
<i>ELOVL1</i>	3,529±0,517	3,070±0,732	2,988±0,732	2,843±0,517	0,6065	0,6811	0,8276
<i>ELOVL2</i>	9,215±0,400	10,589±0,566	9,482±0,566	8,284±0,400	0,1733	0,8742	0,1199
<i>ELOV3</i>	9,139±0,375	10,030±0,530	9,594±0,530	9,681±0,375	0,9186	0,3984	0,4741
<i>ELOVL4</i>	5,066±0,031	5,148±0,044	5,709±0,044	5,176±0,031	0,9289	0,4811	0,8657
<i>ELOVL5</i>	1,671±0,149	1,338±0,211	1,617±0,211	1,444±0,149	0,9004	0,3015	0,7056
<i>ELOVL6</i>	0,135±0,134	0,121±0,190	0,078±0,190	0,002±0,134	0,6475	0,8092	0,8677
<i>FADS2</i>	1,896±0,274	1,329±0,274	1,283±0,274	1,326±0,274	0,2950	0,3679	0,2985
<i>FASN</i>	-0,312±0,246	-0,907±0,246	-1,020±0,246	-1,255±0,246	0,0648	0,1304	0,4858

<i>FDX1</i>	5,009±0,403	6,062±0,403	5,883±0,403	6,364±0,403	0,1833	0,0941	0,4986
<i>GPAM</i>	4,920±0,395	5,245±0,395	5,533±0,395	4,953±0,395	0,6961	0,7553	0,2858
<i>LIPE</i>	8,207±0,674	10,203±0,826	8,676±0,826	7,674±0,826	0,2496	0,5578	0,1168
<i>LPL</i>	7,478±0,987	7,984±1,210	7,642±1,210	7,261±1,210	0,8189	0,9591	0,7175
<i>PLIN2</i>	1,206±0,307	1,467±0,307	1,285±0,307	1,312±0,533	0,9231	0,7166	0,7672
<i>PLIN3</i>	-0,646±0,177	-0,847±0,177	-1,062±0,177	-0,890±0,307	0,3316	0,9480	0,4232
<i>PNPLA2</i>	2,871±0,163	2,774±0,163	2,536±0,163	3,014±0,282	0,8178	0,3775	0,2006
<i>PPARA</i>	11,754±0,355	8,193±0,251	8,021±0,251	11,111±0,355	0,6334	0,7149	0,9011
<i>PPARG</i>	7,794±0,452	8,232±0,319	9,011±0,319	6,834±0,452	0,8385	0,1566	0,0792
<i>PPARGC1A</i>	9,481±0,236	8,021±0,167	8,773±0,167	7,753±0,236	0,1402	0,0262	0,3948
<i>SCD</i>	1,826±0,237	2,179±0,237	1,718±0,237	1,647±0,237	0,2147	0,5686	0,3985
<i>SREBF1</i>	2,488±0,170	2,429±0,138	1,966±0,138	2,072±0,170	0,0299	0,8844	0,6153
<i>SREBF2</i>	1,654±0,185	1,149±0,151	1,008±0,151	1,254±0,185	0,1610	0,4733	0,0685
<i>Metabolism</i>							
<i>AQP3</i>	-1,842±0,215	-1,864±0,215	-2,015±0,215	-2,070±0,215	0,4050	0,8646	0,9425
<i>G6PD</i>	1,697±0,200	1,548±0,200	1,198±0,200	1,144±0,200	0,0549	0,6265	0,8188
<i>HMGCS1</i>	1,321±0,122 A	0,905±0,122 AB	0,710±0,122 B	0,970±0,149 AB	0,0727	0,5648	0,0349
<i>LUM</i>	2,354±0,785	3,154±0,961	5,508±0,961	3,642±0,961	0,1049	0,5879	0,2074
<i>SLC2A1</i>	-1,270±0,180	-1,319±0,180	-1,498±0,180	-1,382±0,180	0,4434	0,8577	0,6603
<i>SLC2A3</i>	-0,148±0,294	0,102±0,294	-0,256±0,294	-0,215±0,294	0,4903	0,6329	0,7323
<i>SLC2A4</i>	6,364±0,477	6,326±0,477	5,863±0,477	6,269±0,477	0,5754	0,7102	0,6536
<i>SLC2A5</i>	-1,052±0,333 A	-1,914±0,333 AB	-2,201±0,333 B	-1,389±0,333AB	0,3758	0,9415	0,0363

Oxidative stress

<i>FOXO3</i>	5,681±0,312	5,359±0,312	4,959±0,312	5,559±0,312	0,4274	0,6682	0,1779
<i>KEAP1</i>	2,211±0,160	2,508±0,196	2,165±0,196	2,385±0,196	0,5951	0,5323	0,8977
<i>TFAM</i>	3,427±0,437	3,854±0,357	3,589±0,357	3,523±0,437	0,8393	0,6665	0,5595

Predict embryo quality

<i>ATP5L</i>	-1,482±0,121	-1,318±0,121	-1,530±0,121	-1,606±0,121	0,2027	0,7277	0,3523
<i>CLIC3</i>	4,619±0,818	6,202±0,667	5,339±1,156	4,597±1,156	0,6806	0,6951	0,3183
<i>IGF1R</i>	2,397±0,320	2,827±0,392	2,626±0,392	3,006±0,392	0,5336	0,3873	0,7501
<i>IGFBP2</i>	-2,101±0,235	-2,488±0,288	-2,662±0,288	-2,163±0,288	0,6871	0,8470	0,1705
<i>KRT8</i>	-4,115±0,242	-4,236±0,297	-4,277±0,297	-4,267±0,297	0,7485	0,8540	0,8280
<i>MTIF3</i>	5,934±0,186	5,576±0,228	4,938±0,228	5,626±0,228	0,0827	0,4854	0,0622
<i>NANOG</i>	6,153±0,331 A	4,628±0,331 B	4,952±0,573 AB	6,004±0,331 A	0,8362	0,5813	0,0192
<i>NDUFA1</i>	2,711±0,373	3,023±0,373	3,200±0,647	2,500±0,373	0,9718	0,6865	0,3109
<i>PRDX3</i>	3,013±0,278	3,168±0,196	3,281±0,196	3,294±0,278	0,5001	0,7609	0,7982
<i>REST</i>	1,869±0,160 A	1,218±0,160 AB	1,066±0,160 B	1,380±0,160 AB	0,0800	0,3230	0,0168

Stress response

<i>GPX1</i>	-0,775±0,175	-0,818±0,175	-0,885±0,175	-1,162±0,175	0,2320	0,3891	0,5227
<i>GPX4</i>	2,930±0,263 A	2,154±0,263 B	1,877±0,263 B	2,523±0,263 B	0,0148	0,0643	0,0064
<i>HIF1A</i>	5,512±0,395	5,194±0,395	5,748±0,395	5,379±0,395	0,6303	0,4391	0,9529
<i>NFE2L2</i>	3,905±0,227	4,503±0,227	3,729±0,394	4,528±0,227	0,7977	0,0464	0,7310
<i>SOD1</i>	1,346±0,310	1,674±0,253	1,609±0,253	2,134±0,310	0,2493	0,1836	0,7396
<i>SOD2</i>	3,520±0,805	3,603±0,657	4,921±0,657	3,531±0,805	0,4010	0,4081	0,3547
