

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**EFEITO DO ÁCIDO LINOLEICO E CATALASE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* NA
AUSÊNCIA DE SORO E BAIXA TENSÃO DE OXIGÊNIO**

Mônica Ferreira Accorsi

Bióloga

Araçatuba - SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**EFEITO DO ÁCIDO LINOLEICO E CATALASE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* NA
AUSÊNCIA DE SORO E BAIXA TENSÃO DE OXIGÊNIO**

Mônica Ferreira Accorsi

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Venturoli Perri

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zoccal Mingoti

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA - SP

2014

Catalogação na Publicação(CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Accorsi, Mônica Ferreira

A172e

Efeito do ácido linoleico e catalase sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro na ausência de soro e baixa tensão de oxigênio / Mônica Ferreira Accorsi. -- Araçatuba: [s.n], 2014.

119 f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientador: Profa. Dra.Silvia Helena Venturoli Perri

Co-orientador: Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

1. Ácidos graxos. 2. Antioxidantes. 3. Criopreservação. 4. Embrião Bovino. 5. Produção in vitro. 6. Vitrificação I. T.

CDD 636.0892



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito do ácido linoleico e catalase sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro na ausência de soro e baixa tensão de oxigênio.

AUTORA: MÔNICA FERREIRA ACCORSI

COORDINADORA: Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

Dr. FELIPE PERECIN

Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Dra. CALIÊ CASTILHO

Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

DATA DA REALIZAÇÃO: 11 de agosto de 2014.

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI
- Coordenadora -

DADOS CURRICULARES

MÔNICA FERREIRA ACCORSI – nascida no dia 30 de Janeiro de 1979, no município de Taquaritinga-SP, é bióloga formada pela Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, foi bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 110760/98-0 - durante o período de Agosto/1998 a Julho de 2000. Atuou profissionalmente a partir de 2001 na empresa VITROGEN, onde iniciou como estagiária e em 2008 saiu como Gerente de Operações da empresa. Posteriormente trabalhou na empresa Geneal Genética Animal por 6 meses. Em 2006, ainda trabalhando, iniciou o mestrado em Qualidade e Produtividade Animal, Pela Universidade de São Paulo, campus Pirassununga-SP, sob a orientação do prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, e este foi defendido em Janeiro de 2009. A tese teve apoio financeiro do projeto PIPE- FAPESP vinculado a empresa Vitrogen – Processo 05/50911-3- de Junho de 2006 a Fevereiro de 2007. De 2009 a 2011, prestou consultoria de produção *in vitro* bovina para profissionais na área de reprodução animal. Sentindo necessidade de evoluir na carreira acadêmica e na área da pesquisa, iniciou o doutorado em março de 2011 no programa em Ciência Animal, na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal sob a orientação da Profa. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri e a co-orientação da Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti. Foi bolsista do programa de pós-graduação (Doutorado) CPNQ – Processo 142558/2011-7. Durante o doutorado fez estágio docência na disciplina de Bioestatística para alunos do primeiro ano de medicina Veterinária sob a orientação da Profa. Dra. Silvia Helena Venturoli Perri. Em 2011 também iniciou uma nova graduação na Faculdade de Tecnologia de Araçatuba (FATEC) no curso de bioenergia, terminado em Janeiro de 2014. Desde Maio de 2013 assumiu a gerência dos laboratórios de Produção *in vitro* da empresa Sexing Technologies do Brasil.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”.

Winston Churchill

“Quem nunca cometeu um erro, nunca tentou algo novo”.

Albert Einsten

Dedico esse trabalho aos homens da minha vida, meu pai e meu companheiro Léo.

Meu pai pelo exemplo de ser humano que foi, e pela presença constante em meus pensamentos e ações.

E ao Léo pelo apoio, compreensão, paciência, força, incentivo e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que é a força maior que rege toda a natureza.

À minha orientadora Silvia Helena Venturoli Perri, por aceitar o pedido de me orientar sem mesmo me conhecer. Me ensinou a “danada” da estatística e me acolheu como poucos fazem. Meus sinceros agradecimentos.

À minha co-orientadora Gisele Zoccal Mingoti por todos os ensinamentos, conselhos, paciência, amizade e pelo grande incentivo no momento mais difícil de todo o processo, quando grande parte das minhas amostras, que eram o “grand finale”, se perderam.

À minha mãe Parê, que está sempre pronta pra tudo. Nunca vou poder retribuir o que a senhora fez e ainda faz por mim. Se um dia for mãe, quero muito conseguir ser igual à você. Te amo incondicionalmente.

Ao professor Iveraldo Santos Dutra, por sua atenção, simpatia, alegria e incentivo.

À professora Flavia Lombardi Lopes, pela total disposição em me ajudar a entender o que era necessário para a parte molecular que infelizmente não foi realizada, mas os ensinamentos ficarão para outras atividades futuras.

Às minhas companheiras de laboratório, **Nathália Rocha Frigoni e Beatriz Caetano da Silva Leão**, que confesso que me ajudaram muito mais do que eu consegui ajudá-las. Queria muito agradecê-las por tudo.

Aos estagiários, Giovana, Thiago, Laís e Joice, que perderam vários horários de almoço para me ajudar na aspiração dos ovários e pelas conversas, risadas e apoio.

Aos funcionários Adão Custódio e Alessandra Ragozo.

À Janahi Sousa Ticianelli, que simplesmente disponibilizou tudo que podia e tinha ao seu alcance para eu poder fazer os microarrays. Muito obrigada e tenho certeza que no futuro aplicarei todas as suas dicas valiosas.

Às minhas irmãs, que sempre me apoiaram, com todo o carinho, amor e atenção.

Aos meus dois filhos lindos, Salsicha e Linguixa, pelos olhares, carinhos, lambidas e companhia toda vez que sentava para estudar e escrever. A vida não tem graça sem a presença de um quatro patas.!

À todas as minhas amigas que mesmo à distância não deixaram de estar sempre por perto, principalmente a Robertinha e a Lú. Obrigada!

Aos amigos “FIVEiros” de trabalho, Fernando Prestes, Ana Cláudia Teixeira e Fernanda Elias, que em pouco tempo de convivência me ensinaram muito, ajudaram, apoiaram e torceram para que tudo desse certo e a tempo!

Aos amigos da Sexing (Nil, Bernardo, Erivelton, Luciano, Carina, Michel, Duda, Adriele, Anderson, Sthefano, Marcela, Janete, e outros) pelos ensinamentos, convivência maravilhosa e almoços divertidos.

Aos professores e colegas do programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

À Faculdade de Medicina Veterinária UNESP campus Araçatuba e a todos os funcionários da seção de Pós-graduação, Staepe e Biblioteca por toda a ajuda para a finalização deste projeto.

Ao CNPq pelos 2 anos de bolsa de estudos (Processo 142558/2011-7).

SUMÁRIO

Páginas

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO	19
II REVISÃO DA LITERATURA.....	22
Suplementação com soro fetal bovino (SFB) no CIV	22
Lipídios, ácidos graxos e o ácido linoleico (LA)	24
Atmosfera gasosa de 5% O ₂ vs 20% O ₂	29
Espécies reativas de oxigênio (ros) e antioxidantes	31
Criopreservação.....	35
Lipídios, membranas e o processo de criopreservação.....	38
III HIPÓTESE	40
VI OBJETIVOS.....	40
V MATERIAL E MÉTODOS.....	41
Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	41
Análise do conteúdo total de lipídios - coloração Nile Red	42
Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluorêscência	43
Coloração “Terminal Transferase assay” – TUNEL	44
Vitrificação e análise da re-expansão embrionária pós aquecimento	45
Delineamento Experimental do pré-experimento.....	46
Delineamento do experimento principal.....	48
VI ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
VII RESULTADOS	51
Resultados do pré-experimento.....	51
Resultados do experimento principal.....	53
VIII DISCUSSÃO	61
IX CONCLUSÃO	69

X REFERÊNCIAS	70
---------------------	----

CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO	87
SUMMARY	88
INTRODUCTION	89
MATERIAL AND METHODS	91
Reagents and media	91
Oocyte collection and maturation	91
Sperm separation and <i>in vitro</i> fertilization.....	92
Embryo culture.....	92
Quantification of intracellular reactive oxygen species by dichlorofluorescein assay.....	93
Quantification of intracellular lipid content by Nile red staining.....	93
Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling.....	94
Vitrification, warming and subsequent culture of embryos.....	95
EXPERIMENTAL DESIGN.....	97
STATISTICAL ANALYSIS.....	99
RESULTS.....	100
DISCUSSION.....	102
ACKNOWLEDGEMENTS.....	107
REFERENCES.....	108
TABLES AND FIGURE.....	115

LISTA DE FIGURAS

Páginas

FIGURA 1 – Composição dos lipídios (triacilgliceróis, fosfolipídios, esfingolipídios).....	25
FIGURA 2 - Esquema da membrana plasmática (bicamada lipídica).....	25
FIGURA 3 – Composição dos fosfolipídios	26
FIGURA 4 – Ácido Linoleico; ácido linoleico cis-9, trans-11; ácido linoleico trans-10, cis-12	28
FIGURA 5 – Esquema da perda de um elétron de um átomo normal transformando-o em radical livre.....	31
FIGURA 6 – Equações químicas demonstrando a ação das enzimas que neutralizam os efeitos ROS.....	36
FIGURA 7 – Etapas da produção <i>in vitro</i> . A- ovário; B- Oócitos selecionados Grau I; C- Meios de maturação e placa de 4 poços utilizada na maturação; D- Oócitos maturados após 22-24 horas de MIV; E- Palheta de sêmen descongelada e percoll; F- Oócitos + espermatozoides na gota de FIV; G- Mistura gasosa de 5%CO ₂ , 7%O ₂ , 88%N ₂ aplicada nos “BAGS”; H- “BAGS” dentro da incubadora (setas vermelhas); I- Embriões D7.....	42
FIGURA 8 - Equipamentos e haste usada no processo de vitrificação.....	45
FIGURA 9 – Delineamento Experimental – Pré-experimento.....	47
FIGURA 10- Delineamento do Experimento principal.....	49
FIGURA 11 – Coloração com Nile Red (quantidade total de lipídios).....	54
FIGURA 12 – Coloração com H ₂ DCFDA (mensuração de ROS).....	55
FIGURA 13 – Coloração com Hoechst (A) e TUNEL (B).....	57
FIGURA 14 – Embriões reaquecidos (objetiva de 40x).....	60

FIGURA 15 - Taxa de eficiência por grupo utilizando os dados de produção de embriões no dia 8 (D8) e as taxas de re-expansão imediata, às 24 horas e às 48 horas (eclosão).....	59
---	----

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1 - Desenvolvimento embrionário em meio de cultivo com SFB ou BSA (na MIV) e SFB + BSA ou BSA (no CIV) nas atmosferas de 5%CO ₂ em ar = 20%O ₂ e de 7%O ₂ , 5%CO ₂ e 88%N ₂ , até o D8 (192 hpi).....	51
Tabela 2 - Agrupando os dados (MIV, CIV, atmosfera) para avaliar o efeito no desenvolvimento embrionário em meio de cultivo com SFB ou BSA (na MIV) e SFB + BSA ou BSA (no CIV) nas atmosferas de 5%CO ₂ em ar = 20%O ₂ e de 7%O ₂ , 5%CO ₂ e 88%N ₂ , até o D8 (192 hpi).....	52
Tabela 3 - Clivagem e desenvolvimento embrionário em meio de cultivo <i>in vitro</i> suplementado com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi).....	53
Tabela 4 - Quantidade total de lipídios (unidades arbitrárias de fluorescência-UAF) presentes nos embriões suplementado com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi).....	54
Tabela 5 - Quantificação intracelular de ROS (em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) presentes nos embriões suplementado com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi).....	55
Tabela 6 - Efeito da suplementação com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi) sobre o número total de células e a taxa (%) de apoptose em blastocistos bovinos.....	56
Tabela 7 - Taxa de re-expansão e recultivo <i>in vitro</i> imediatamente pós reaquecimento, 3 e 24 horas, taxa de eclosão (48 horas) de embriões CIV em meio suplementado com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi).....	58

RESUMO

EFEITO DO ÁCIDO LINOLEICO E CATALASE SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* NA AUSÊNCIA DE SORO E BAIXA TENSÃO DE OXIGÊNIO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação do meio de cultivo com ácido linoleico e/ou catalase, em meio sem a adição de SFB, cultivados em atmosfera de baixa tensão de oxigênio sobre o desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos. Em um grupo foi feita a suplementação com 100 μ M de ácido linoleico (LA); 100UI de catalase (CAT) em um segundo, no terceiro grupo foram feitas as 2 suplementações (CAT+LA) e um quarto grupo sem suplementação (CONTROLE), durante todo o período de cultivo em atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂ e 88%N₂ em BAGS. As taxas de clivagem não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos. Porém as taxas de produção de embriões em D7 e D8 diferiram ($P<0,05$), sendo que o controle obteve melhor resultado perante os 3 tratamentos e o grupo CAT+LA gerou a menor taxa de produção (30,7; 22,4; 19,8; 12,4%). Observou-se um atraso no desenvolvimento, sendo os blastocistos expandidos somente encontrados no D8. Na avaliação do conteúdo total de lipídios, houve uma redução significativa ($P<0,05$) nos 3 grupos tratados em relação ao controle. A medida dos níveis intracelulares de ROS não foi afetada nos 4 grupos ($P>0,05$). A quantidade de células totais foi significativamente menor ($P<0,05$) no grupo CAT+LA, e o grupo CAT foi o que apresentou maior porcentagem de células apoptóticas. Em relação à taxa de re-expansão às 24 horas ($P<0,05$), o grupo controle (50%) e o CAT (67,2%) apresentaram menores taxas que os grupos LA (71,7%) e o CAT+LA (76,7%). Às 48 horas, o grupo controle apresentou a menor taxa (35,7%), seguido pelo grupo CAT (47,5%). Já o grupo LA (56,5%) diferiu estatisticamente do controle mas não dos grupos CAT (47,5%) e CAT+LA (76,7%). O grupo CAT+LA diferiu estatisticamente dos grupos controle e CAT. Com base nestes resultados, embriões tratados com LA ou CAT+LA no cultivo *in vitro*, na ausência de soro e baixa tensão de oxigênio, apresentaram melhores taxas de sobrevivência pós reaquecimento. Em conclusão, a diminuição na quantidade total de lipídios nos embriões pode melhorar o desempenho destes no processo de criopreservação.

Palavras-chave: ácidos graxos; antioxidantes; criopreservação; desenvolvimento embrionário - bovino; embrião bovino.

SUMMARY

EFFECT OF LINOLEIC ACID AND CATALASE IN SERUM-FREE MEDIUM AND UNDER LOW OXYGEN TENSION DURING *IN VITRO* CULTURE ON DEVELOPMENT AND CRYOTOLERANCE OF BOVINE EMBRYOS

The most commonly recommended way to obtain more resistant *in vitro* embryos during the cryopreservation process is to change these embryos, whether through removal of fetal bovine serum (FBS), addition of different supplements to the culture medium or changes in oxygen tension in the production process. The objective of this study was to assess the effects of supplementation of the culture medium with linoleic acid and/or catalase in medium without the addition of FBS, in low tension oxygen atmosphere on development, quality and cryotolerance of bovine embryos. In one group, the medium was supplemented with 100 μ m of linoleic acid (LA); the second was supplemented with 100UI of catalase (CAT), a third group was supplemented with both, CAT+LA and a fourth group received no supplementation (control), during the entire culture period in an atmosphere of 5% CO₂, 7% O₂ and N₂ 88% in BAGS. Cleavage rates did not differ ($P>0.05$) between groups (72.7; 74.1; 72.1; and 72.0%, respectively). However, embryo production rates in D7 and D8 were different ($P<0.05$), where the control had the highest blastocyst rate of the treatments and the CAT+LA group presented the lowest rate of production (30.7; 22.4; 19.8; 12.4%). Expanded blastocysts were only found on D8, indicating a delay in development. There was a significant reduction ($P<0.05$) of total lipids in the 3 treated groups when compared to the control group. There was no difference in the intracellular levels of ROS between the 4 groups ($P>0.05$). Total cell number was significantly lower ($P<0.05$) in the CAT+LA and the CAT group showed the highest percentage of apoptotic cells. Considering the re-expansion rates in 24 hours ($P<0.05$), the control group (50%) and the CAT group (67.2%) presented lower rates than the LA group (71.7%) and CAT+LA group (76.7%). At 48 hours, the control group showed the worst rate (35.7%) followed by the CAT group (47.5%). The LA group (56.5%) was statistically different from control group but not from CAT (47.5%) and CAT+LA groups (76.7%). The CAT+LA group was statistically different from control and CAT groups. According to these results, embryos treated with LA or CAT+LA *in vitro* during culture, without fetal serum and low tension oxygen, showed better survival rates after reheating. In conclusion, decrease in the total amount of lipids in embryos can improve performance in the process of cryopreservation.

Keywords: Antioxidants; bovine embryo; criopreservation; development embrionic- bovine; fatty acids.

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO

O Brasil possui 212,85 milhões de cabeças de gado segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), que o qualifica como o segundo rebanho mais numeroso do mundo. O país tem se destacado como o maior usuário em larga escala das diversas biotecnologias da reprodução animal, onde foi responsável por 85% do total de embriões produzidos *in vitro* e transferidos no mundo em 2011 (STROUD, 2012).

Todavia, o desenvolvimento de uma metodologia eficaz de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos para maximizar o ganho genético e a produção a um baixo custo é um desafio há anos, já que a eficiência da técnica ainda é pouco satisfatória. *In Vivo* aproximadamente 80% do oócitos ovulados desenvolvem-se até blastocisto, enquanto *in vitro* apenas 40% atingem esse estágio (MERTON et al., 2003). Vários fatores podem contribuir para esse resultado, entre eles: a qualidade do oócito (MERTON et al., 2003), a fertilidade do sêmen (CAMARGO et al., 2006) e as condições sub-ótimas e composição dos meios de cultivo *in vitro*, desde a maturação até o desenvolvimento embrionário (THOMPSON; PETERSON, 2000).

Sistemas de produção cada vez mais eficientes estão sendo desenvolvidos para propiciar condições de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* mais adequadas (ASSUMPÇÃO et al., 2002), afim de se obter embriões de melhor qualidade e com resultados superiores de prenhez tanto de embriões à fresco como criopreservados.

A criopreservação de embriões é uma tecnologia aplicada a reprodução pois permite que os embriões excedentes do processo possam ser reaproveitados no momento mais adequado, e não sejam descartados onerando os custos e desperdiçando material genético. Porém os resultados de prenhez de embriões que foram reaquecidos após serem criopreservados são muito variáveis e inconsistentes, o que reflete no número ainda reduzido da aplicação desta biotecnologia no Brasil (STROUD, 2012). A capacidade de

sobrevivência embrionária após este processo é um evento multifatorial. Segundo Seidel Jr (2006) a melhor abordagem para aumentar o sucesso da criopreservação é alterar os próprios embriões para torná-los mais resistentes.

A participação dos lipídios embrionários na baixa criotolerância está bem documentada (ABE et al., 2002; BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL, 2007; PEREIRA et al., 2008). Porém, recentemente vem sendo reconhecido que não é apenas a quantidade de lipídios que afeta a criopreservação. Diversos fatores estão envolvidos na criotolerância embrionária, como: o próprio conteúdo e composição lipídica, o metabolismo embrionário, a apoptose e o padrão de expressão gênica (SUDANO et al., 2011). Um estudo sobre a adição de ácido linoleico conjugado (CLA) ao meio de cultivo de embriões bovinos (PEREIRA et al., 2004; 2007; 2008) demonstrou um efeito positivo no aumento das taxas de sobrevivência embrionária pós-criopreservação com a diminuição do conteúdo lipídico dos embriões.

Outro fator que deve ser considerado, é a proteção contra as avarias causadas pelo estresse oxidativo. Este parece desarranjar os embriões por ocasionar a peroxidação dos fosfolipídios de membrana e alterar moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. Os efeitos desses danos incluem alterações mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento embrionário e apoptose. Oócitos e embriões parecem estar protegidos contra o estresse oxidativo pela presença de antioxidantes nos fluidos folicular e do oviduto. Porém, quando removidos de seu ambiente natural para a produção *in vitro* eles perdem a sua defesa natural, e, portanto, cuidados especiais, como a adição de antioxidantes ao meio de cultivo devem ser priorizadas afim de se evitar que o estresse oxidativo ocorra e reduza a eficiência do processo (WANG et al., 2002).

A tensão de oxigênio empregada no cultivo *in vitro* também afeta a produção *in vitro*. Sabe-se que a redução da tensão de oxigênio de 20% para 5% no cultivo aumenta a taxa de desenvolvimento embrionário em várias espécies (GUERIN et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2000; YUAN et al., 2003). Estudos comprovam que o cultivo *in vitro* de embriões sob baixas concentrações de oxigênio propicia uma menor produção de radicais livres

(NARS ESFAHANI et al., 1990, 1991) indicando que a alta concentração de oxigênio afeta o desenvolvimento, provavelmente devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Desta forma, para produzir embriões *in vitro* mais aptos ao desenvolvimento e assim, mais resistentes à vitrificação, a proposta deste estudo foi utilizar meios de cultivo embrionário sem a presença de soro fetal bovino que causaria um acúmulo de lipídeos nos embriões, e, adicionar ou não o ácido linoleico no cultivo *in vitro*, que proporciona uma diminuição da quantidade total de lipídios. Partindo do princípio que a adição de ácidos graxos ao processo poderia propiciar uma maior quantidade de reações que levassem ao estresse oxidativo, foi proposto utilizar um antioxidante extracelular, a catalase, para controlar a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes no meio de cultura, que é um antioxidante que tem como função a remoção do peróxido de hidrogênio do meio, principal responsável pela peroxidação lipídica das membranas. Em conjunto, todo o sistema de cultivo *in vitro* foi realizado sob baixa tensão de oxigênio, a fim de impedir o aumento da concentração de ROS no sistema de produção. A ação conjunta de ácidos graxos, antioxidantes, cultivo *in vitro* sem SFB em baixa tensão de O₂ parece ser uma alternativa viável para a produção de embriões de melhor qualidade com um acréscimo na taxa de sucesso da criopreservação de embriões.

II REVISÃO DA LITERATURA

SUPLEMENTAÇÃO COM SORO FETAL BOVINO (SFB) NO CULTIVO *IN VITRO*

A qualidade do oócito é um fator determinante para que embriões produzidos *in vitro* possam chegar ao estágio de blastocisto. Entretanto, estudos ressaltam que as condições de cultivo que envolvem vários fatores, como o tipo de meio, a atmosfera gasosa, a densidade (quantidade de embriões/volume de meio), a suplementação proteica e a presença ou não de co-cultivo influenciam na qualidade dos embriões (LONERGAN et al., 2003; GÓMEZ et al., 2008).

O período pós-fecundação é de grande impacto à qualidade do blastocisto, pois durante os dias de cultivo *in vitro* vários eventos ocorrem, como: as primeiras clivagens, que são um grande indicador do potencial desenvolvimento do embrião; a ativação do genoma embrionário; e a compactação da mórula, que envolve a partir daí o estabelecimento de 2 tipos celulares, o trofotoderma e a massa celular interna (LONERGAN et al., 1999; RIZOS et al., 2003). Qualquer modificação no meio de cultivo celular pode afetar a qualidade do embrião. Portanto, o cultivo é fundamental para o êxito da produção *in vitro* (PIV), e seu sucesso está relacionado com o conhecimento das necessidades nutricionais durante o desenvolvimento do embrião (RIZOS et al., 2003).

O soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) são as fontes proteicas mais utilizadas no cultivo *in vitro* (MINGOTI et al., 1995). O soro é uma complexa mistura não definida de diferentes proteínas que contêm pequenos peptídeos, substratos energéticos e fatores de crescimento que participam do desenvolvimento embrionário, e por isso, é conhecido por

promover o crescimento de embriões cultivados *in vitro* (BRUNNER et al., 2010).

Quando adicionado ao meio, o SFB melhora significativamente as taxas de desenvolvimento (LEIVAS et al., 2011; PEREIRA et al., 2008; SUDANO et al., 2011), apesar do potencial efeito prejudicial na qualidade dos mesmos (BRUNNER et al., 2010; RIZOS et al., 2003). O SFB inibe as primeiras divisões celulares mas acelera a cinética do desenvolvimento embrionário após as primeiras divisões celulares (GUTIERREZ-ADAN et al., 2001; RIZOS et al., 2003).

Contudo, o soro não permite apurar as necessidades nutricionais do embrião durante o desenvolvimento por apresentarem uma variedade de componentes indefinidos (ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas) que variam de lote para lote (ABE et al., 2002). Apesar das suas propriedades benéficas, a sua utilização vem sendo associada a diversas anormalidades, como: modificações nas organelas celulares, degeneração mitocondrial, alteração do padrão de expressão gênica, aumento do número de gotas lipídicas, modificação no metabolismo celular (ABE et al., 2002; KHURANA; NIEMANN, 2000; LONERGAN et al., 2003; PEREIRA et al., 2007, 2008; REIS et al., 2005; RIZOS et al., 2003, 2008; STURMEY et al., 2008), reduzida sobrevivência pós criopreservação (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2002, 2003; SUDANO et al., 2011, 2012), além de alterar a fluidez e função da membrana plasmática, causar danos ao citoesqueleto e às junções célula-célula (ABE et al., 2002; REIS et al., 2005; RIZOS et al., 2003).

O SFB pode aumentar a incidência de apoptose (KNIJN et al., 2003) além de ser uma fonte de contaminação por patógenos (LONERGAN et al., 2006).

Embriões cultivados na presença de soro apresentaram acúmulo de lipídios citoplasmáticos, os quais são responsáveis por uma maior sensibilidade desses embriões ao processo de criopreservação (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2003). O SFB pode interferir no metabolismo lipídico dos embriões de três formas: o soro pode aumentar a neossíntese de lipídios (especialmente os

triacilglicerídios) em embriões (ABD EL RAZEK et al., 2000); lipoproteínas presentes no soro podem ser internalizadas pelas células aumentando seu conteúdo lipídico (FERGUSON; LEESE, 1999; SATA et al., 1999); e, a presença de soro pode alterar o metabolismo lipídico na mitocôndria, principalmente aumentando os estoques de lipídios intracelulares (ABE; HOSHI, 2003).

A síntese ou o acúmulo excessivo de lipídios nos embriões induzido pela presença de SFB dão aos embriões uma aparência escura quando comparados com outros embriões produzidos sem SFB ou embriões *in vivo* (ABE et al., 1999, 2002; ABE; HOSHI, 2003; FERGUSON; LEESE, 1999; PEREIRA et al., 2007; REIS et al., 2003; RIZOS et al., 2003, 2008; SHAMSUDDIN; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994). Embriões produzidos sem a adição de SFB reduzem o acúmulo de gotas lipídicas em blastocistos e melhoraram a resistência à criopreservação (ABE et al., 1999, 2002; DIEZ et al., 1996, 2001).

Portanto, a adição do SFB tem sido relatada como essencial para obtenção de produção satisfatória de embriões, mas reduzir as concentrações de SFB durante algumas etapas da PIV é necessário para sustentar a qualidade do embrião.

LIPÍDIOS, ÁCIDOS GRAXOS E O ÁCIDO LINOLEICO (LA)

Os lipídios são compostos caracterizados por sua insolubilidade em água, sendo os mais importantes os triacilgliceróis (TAG) e os fosfolipídios (FL). Os TAG são a principal forma de estocagem de energia em diversos organismos, e os FL, são o principal componente da estrutura bicamada lipídica das membranas biológicas (Figura 1).

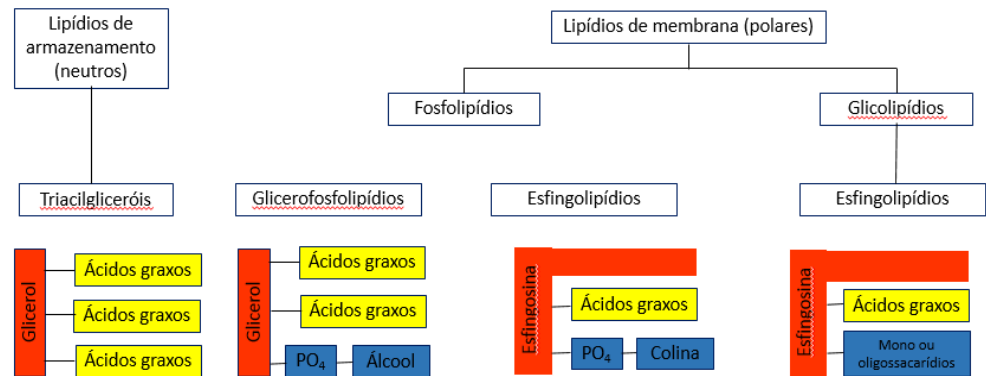


FIGURA 1 – Composição dos lipídios (triacilgliceróis, fosfolipídios, esfingolipídios) – fonte: Princípios de Bioquímica - Lehninger.

As membranas celulares (Figura 2) apresentam o modelo mosaico fluido compostas por uma fluida bicamada lipídica de fosfolipídios (ENGELMAN, 2005).

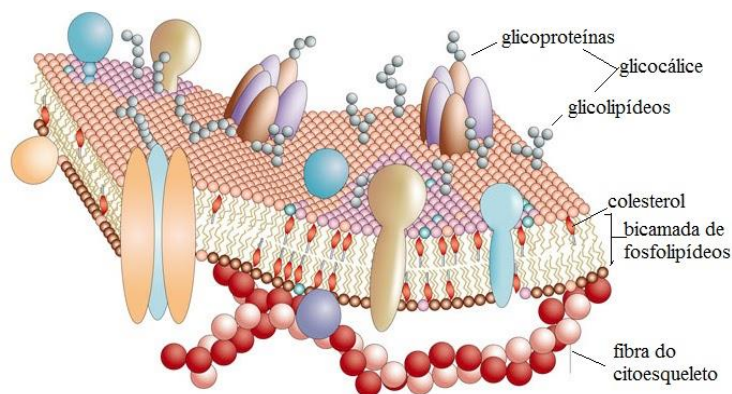


FIGURA 2- Esquema da membrana plasmática (bicamada lipídica) – fonte domínio público.

Os fosfolipídios são compostos por uma cadeia de 3 carbonos onde um grupo de cabeça-fosfato é aderido a um carbono posicionado no final do esqueleto carbônico e dois ácidos graxos são conectados aos 2 outros carbonos. Tanto os ácidos graxos como seus grupos cabeça-fosfato, podem variar em sua composição (Figura 3) e essa variação é que determinará as propriedades das membranas celulares (EDIDIN, 2003).

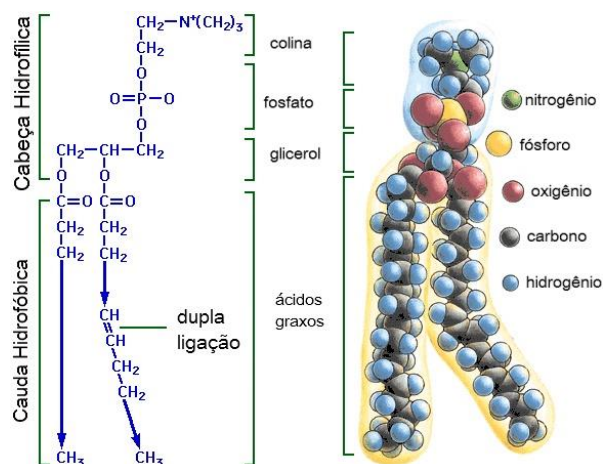


FIGURA 3 – Composição dos fosfolipídios – fonte domínio público.

Os fosfolipídios, cujas cadeias de AG são predominantemente poli-insaturadas, quando submetidos a uma redução de temperatura, assumem uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma hexagonal II, ou micela invertida. Quando a membrana está em transição de fase fluida para a fase cristalina, para muitos lipídios, a formação desta micela invertida é transitória, entretanto, para certos fosfolipídios esta estrutura persiste. Como consequência, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana e, assim, causar danos irreparáveis (PARKS & GRAHAM, 1992).

Embora existam diferenças consideráveis entre as espécies de mamíferos, em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios. As propriedades físicas das membranas além de serem influenciadas pela composição de lipídios, são reguladas em resposta a fatores do ambiente, temperatura ou dieta (GUR & HARWOOD, 1991). Se a membrana apresentar maior número de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), a fluidez aumenta porque nos PUFAS as cadeias acil são extremamente flexíveis e podem mudar rapidamente seu estado conformacional (JUCHEM et al., 2010; LOMBARDO; CHICCO, 2006).

Os lipídios também atuam na interação célula-célula, proliferação celular, transporte (SATA et al., 1999) além de serem precursores da biossíntese de prostaglandinas e hormônios esteroides.

O citoplasma de alguns mamíferos é rico em lipídios, como em bovinos e suínos, e outros não, como em humanos e camundongos. A composição lipídica de oócitos bovinos é de 50% de triacilgliceróis, 20% de fosfolipídios, 20% de colesterol e 10% de ácidos graxos livres (MC EVOY et al., 2001). O triacilglicerol (TAG) é o mais abundante em oócitos bovinos e funciona como uma reserva potencial de energia para o desenvolvimento embrionário inicial (FERGUSON; LEESE, 1999; KIM et al., 2001; STURMEY et al., 2009; ZERON et al., 2001). Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) compreendem menos de 20% do total de ácidos graxos, sendo o ácido linoleico (LA), da família n-6 o mais abundante deles (SANTOS et al., 2008).

Os TAG representam 40-50% da massa de lipídios total em embriões bovinos *in vivo*, e, *in vitro* eles podem atingir 88% da massa. Isso porque a concentração permanece estável nos embriões *in vivo* do estágio de 2 células até o estágio de blastocisto, enquanto os *in vitro* a reserva de triacilgliceróis pode duplicar no estágio de blastocisto em embriões expostos a cultura com soro fetal bovino (CHARPIGNY et al., 2003).

A delipidação mecânica tem sido aplicada nos estágios iniciais do desenvolvimento de embriões suínos e de embriões clone bovinos (USHIJIMA et al., 1999; DIEZ et al., 2001) através da polarização das gotas lipídicas por centrifugação e remoção física do excesso de lipídios. Em ambos os casos, a sensibilidade a criopreservação foi reduzida. Entretanto, é um método invasivo e este mecanismo altera o desenvolvimento potencial de blastocistos transferidos para para receptoras (DIEZ et al., 2001).

O ácido linoleico é um ácido graxo poli-insaturado da família ômega-6 e é denominado essencial por não poder ser sintetizado pelos organismos (SCHMITZ; ECKER, 2008). São importantes reguladores das funções celulares, na formação das membranas, expressão de genes, adesão e

proliferação celular, transporte intra e intercelular (WAHLE et al., 2003), e no correto funcionamento do sistema imunológico e processo inflamatório.

O ácido linoleico denomina um conjunto de isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecadienóico com duplas ligações conjugadas, que podem ser encontradas nas posições 9 e 11, 10 e 12 ou 11 e 13, entre outras e podem ser em ambas configurações, *cis* e *trans* (Figura 4).

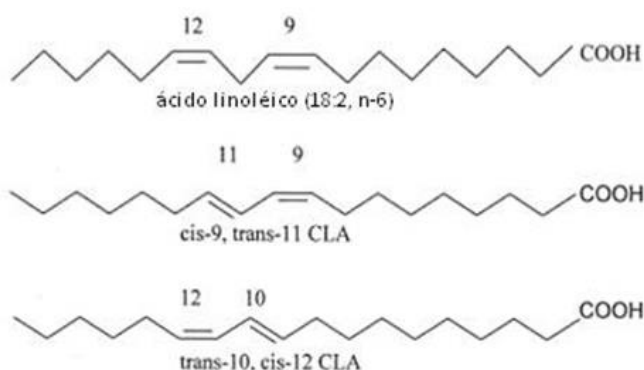


FIGURA 4 – Ácido Linoleico; ácido linoleico *cis*-9, *trans*-11; ácido linoleico *trans*-10, *cis*-12.

Estudos demonstraram que a posição da dupla ligação e o seu tipo de isomeria geométrica determinam o papel no metabolismo. Os isômeros mais conhecidos são também o que se apresentam em maior abundância, o ácido linoleico conjugado (CLA) *trans*-10, *cis*-12 e o CLA *cis*-9, *trans*-11. O efeito do CLA na composição corporal e no metabolismo lipídico em cultura de células é induzido pelo *trans*-10, *cis*-12, e o crescimento e eficiência alimentar parece estar mais relacionado com o *cis*-9, *trans*-11 (PARIZA et al., 2001).

Segundo Aardema et al. (2011), 95% dos ácidos graxos presentes no sistema de produção *in vitro* são metabolizados pelos oócitos/embriões. Isso justifica a suplementação com ácido linoleico e que de alguma forma essa incorporação melhora a criotolerância dos embriões PIV e diminui a quantidade de lipídios.

Pereira e Marques (2008) avaliaram embriões produzidos na presença de SFB e de CLA *trans*-10, *cis*-12, e este tratamento não resultou em

diferenças em comparação ao grupo controle, na taxa de clivagem, sexagem, taxa de blastocistos no D7 e D8 e qualidade morfológica. Porém, os embriões suplementados com o CLA tiveram um aumento de pequenas gotas de lipídios e uma menor quantidade de embriões catalogados como “gordos”. Em geral, embriões cultivados com CLA se apresentaram mais “magros” que os controles. A taxa de sobrevivência pós aquecimento foi maior para os embriões com CLA. Neste trabalho, houve uma redução do conteúdo dos triacilgliceróis induzida pelo CLA *t*10, *c*12 e isso contribuiu para um aumento da resistência do embrião à criopreservação, pois segundo a autora, o CLA tem a função de bloquear a entrada de ácidos graxos nos adipócitos, podendo interferir deste modo na deposição de ácidos graxos nos embriões. Em 2007, o mesmo grupo verificou que em meios suplementados com CLA houve uma melhora na razão de sobrevivência dos blastocistos depois do congelamento lento e aquecimento. Outros pesquisadores também demonstraram que a adição do ácido linoleico melhora a sobrevivência pós aquecimento (AL DARWICH et al., 2010; HOCHI et al., 1999; IMAI et al., 1997; PEREIRA et al., 2007; TOMINAGA et al., 2000), e este efeito pode ser resultado de um aumento na conversão de ácidos graxos insaturados na membrana antes da criopreservação, e isto pode resultar, num aumento da fluidez da membrana, que pode vir a melhorar a habilidade do embrião ao processo (HOCHI et al., 1999; TOMINAGA et al., 2000).

ATMOSFERA GASOSA DE 5% O₂ VS 20% O₂

Um aspecto de grande relevância no cultivo embrionário é a atmosfera gasosa que influencia tanto na produção como na qualidade dos embriões. Já foi comprovado o efeito negativo ocasionado pelo estresse oxidativo em diferentes células de mamíferos, inclusive embriões, proporcionado pela alta tensão de oxigênio (BAVISTER, 1995; GUERIN et al., 2001).

A atmosfera de 5% CO₂ em ar é a mais utilizada para co-cultivo de embriões bovinos, onde a concentração de O₂ é maior do que a encontrada no oviduto de mamíferos (FUJITANI et al., 1997). A concentração de oxigênio influencia no desenvolvimento embrionário pela prevenção na formação de radicais livres, que levam à peroxidação dos lipídios nos embriões, resultando em danos celulares tanto em embriões murinos (NARS-ESFAHANI et al., 1991) quanto em bovinos (NAGAO et al., 2008). A baixa tensão de O₂ leva à diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que induzem a apoptose, permitindo ainda que a atividade metabólica desses embriões esteja mais próxima daqueles produzidos *in vivo* (CORREA et al., 2008). Portanto o cultivo de embriões *in vitro* com alta tensão de oxigênio (20%) produz mais radicais livres do que os embriões cultivados em baixa tensão de O₂ (FUJITANI, et al., 1997; TAKAHASHI et al., 2000; THOMPSON et al., 1990).

Desta forma, a formação de radicais livres devido ao estresse oxidativo pela alta concentração de O₂ torna a atmosfera gasosa uma importante variável no processo de produção (BAVISTER, 1995; FUJITANI et al., 1997). O aumento de radicais livres de oxigênio pode estar relacionado com uma disfunção mitocondrial devido ao estresse (LIU et al., 2003), podendo resultar em danos celulares e danos ao DNA (ADLER et al., 1999; DIAS, 2003; GUERIN et al., 2001).

O estresse oxidativo pode atrasar o desenvolvimento de embriões e aumentar a frequência de fragmentação no DNA pela formação de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) intracelular. A atmosfera de 5-7% O₂ diminui os efeitos deletérios no DNA durante o desenvolvimento embrionário e apresenta taxa satisfatória de produção de embriões (FUJITANI et al., 1997; GUERIN et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2000; THOMPSON et al., 1990; YUAN et al., 2003), e blastocistos com maiores quantidades de células (DUMOULIN et al., 1999), além dos embriões serem mais próximos ao *in vivo* quanto ao perfil de expressão gênica (WRENZYCKI et al., 2001).

Cultura de embriões em baixa tensão de oxigênio pode melhorar desenvolvimento embrionário em diversas espécies, inclusive bovinos (YUAN et al., 2003).

Contudo, a necessidade da adição de antioxidantes ao cultivo *in vitro* sem SFB em baixa tensão de O₂ ainda precisa ser melhor avaliada (ALI et al., 2003).

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E ANTIOXIDANTES

Quimicamente os metabólitos do oxigênio são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons (Figura 5), os quais são altamente instáveis e energéticos, podendo ser formados pela ação direta de alguma fonte externa de energia (luz, calor, radiação), interna (próprio metabolismo), de reações catalisadas por metais (Fe, Cu) ou enzimas. Essa energia, ao atingir o átomo, induz um elétron a ser removido do orbital, formando um novo átomo contendo um elétron extra, o qual para se tornar novamente estável, precisa liberar essa energia acumulada (KEFER et al., 2009; VALKO et al., 2005). Esta nova partícula formada por um elétron livre apresenta instabilidade elétrica muito grande, e mesmo tendo meia vida muito curta, apresentam grande capacidade reativa, atingindo uma molécula, célula, ou tecido do organismo para capturar um elétron para sua estabilização. É onde acontece as reações em cadeia de lesão celular. Devido a esta característica, é denominado de substância oxidante (SHARMA et al., 1999).

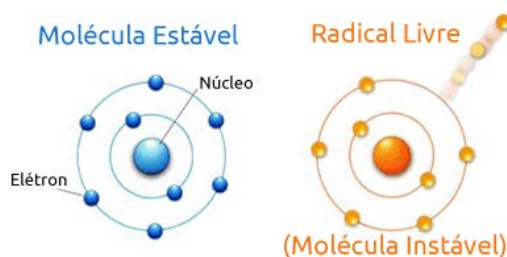


FIGURA 5 – Esquema da perda de um elétron de um átomo normal transformando-o em radical livre – fonte domínio público.

Assim, metabólitos reativos do oxigênio (ROS, do termo em inglês: *reactive oxygen species*), radicais livres e oxidantes são termos usados para identificar os intermediários químicos reativos do metabolismo do oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001), tanto os próprios radicais livres (íons hidroxil, superóxido, óxido nítrico, peróxido), quanto os não radicais (ozônio, peróxido de hidrogênio, peroxidases lipídicas) como os derivados do oxigênio (AGARWAL et al., 2005).

O organismo produz naturalmente espécies reativas de oxigênio decorrentes do próprio metabolismo celular aeróbico, como subprodutos no processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias e da síntese de estruturas. A produção controlada de ROS apresenta funções fisiológicas em diferentes tipos celulares, porém altas concentrações são prejudiciais e danificam biomoléculas, como o DNA, proteínas e lipídios. As células possuem um sistema de defesa antioxidante para proteger-se destes efeitos deletérios (HALLIWELL et al., 1992, 1999). Concentrações reduzidas de ROS são importantes para processos bioquímicos normais como a sinalização e controle do crescimento celular, ataque de patógenos invasores, síntese enzimática (AGARWAL et al., 2004).

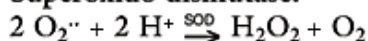
O estresse oxidativo ocorre quando a geração de ROS é superior à eficiência dos mecanismos endógenos protetores. O desequilíbrio na concentração de ROS pode ser gerado pelo aumento de sua produção ou pela diminuição da atividade de substâncias antioxidantes (GUERIN et al., 2001; FEUGANG et al., 2003). As consequências desses danos oxidativos podem ser evidenciados no desenvolvimento retardado dos embriões, nas disfunções metabólicas e até mesmo no aumento e aceleração da apoptose (GUÉRIN et al., 2001).

As concentrações intracelulares de ROS são maiores em sistemas *in vitro* quando comparadas à produção *in vivo*. Quantidades elevadas de O_2^- e H_2O_2 têm sido constatadas em embriões de camundongos produzidos *in vitro* em estágio inicial de clivagem quando comparadas à produção *in vivo* desses mesmos animais (GOTO et al., 1993; NASR-ESFAHANI et al., 1990; NASR-

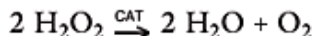
ESFAHANI; JOHNSON, 1991). O estresse na produção *in vitro* podem provocar alterações negativas tanto na maturação, fecundação como no cultivo. Para que não ocorra essa situação de estresse, é necessário reduzir a produção de ROS ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis (FUJITANI et al., 1997).

Cada célula é capaz de neutralizar os efeitos deletérios das altas concentrações de ROS pelo uso de algumas enzimas. A SOD (superóxido dismutase) remove o radical superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio, a catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, a glutathiona peroxidase remove peróxidos das células (Figura 6). Outros antioxidantes, como a vitamina C e E, bloqueiam a ação da ROS envolvidas na oxigenação de ácidos graxos poliinsaturados (AGARWAL et al., 2005).

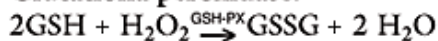
Superóxido dismutase:



Catalase:



Glutathiona peroxidase:



Glutathiona redutase:

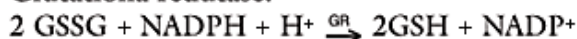


FIGURA 6 – Equações químicas demonstrando a ação das enzimas que neutralizam os efeitos ROS (SOD, catalase, Glutathiona peroxidase e redutase) – fonte domínio público.

Diversos fatores exógenos podem alterar a geração de ROS nos sistemas de produção *in vitro* de embriões, como a elevada tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro*, a presença de cátions metálicos na água e/ou reagentes utilizados, exposição à luz visível, produção de ROS pelos espermatozoides durante a FIV, excesso de glicose, o processo de criopreservação/descongelamento (GUÉRIN et al., 2001) e o excesso de manipulação dos embriões em laboratório (CORRÊA et al., 2008).

A produção de radicais livres pode ter origem diretamente a partir de gametas e embriões, os quais são formados durante os passos intermediários

da redução de oxigênio: radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^{\cdot}$). O estresse oxidativo parece danificar os embriões por levar à peroxidação dos lipídios e à alteração de grande parte dos tipos de moléculas celulares. As consequências desses danos incluem alterações mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento embrionário (GUÉRIN et al., 2001), e podem subsequentemente diminuir a viabilidade da PIV de embriões (ALI et al., 2003; KITAGAWA et al., 2004; WANG et al., 2002).

Oócitos e embriões parecem estar protegidos do estresse oxidativo pela presença de antioxidantes nos fluidos folicular e do oviduto. Os oócitos quando removidos dos folículos ovarianos para serem utilizados na produção *in vitro*, perdem a sua defesa antioxidante intrínseca, e a adição de antioxidantes ao meio de cultivo deve ser feita para evitar o estresse oxidativo e consequentemente, redução na eficiência da produção *in vitro* de embriões (WANG et al., 2002).

As membranas que circundam as células e as organelas celulares contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, por isso é um dos componentes celulares mais atingidos pelos ROS. Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Há perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério. Tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A catalase é um antioxidante enzimático que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio. É a principal responsável pela remoção imediata de peróxido de hidrogênio (FRIDOVICH, 1998).

Para modulação das ROS extracelulares pode-se suplementar os meios de cultivo *in vitro* com antioxidantes enzimáticos extracelulares, como a catalase. A suplementação com 100 UI de catalase melhorou o

desenvolvimento embrionário através da redução do conteúdo de H_2O_2 (ORSI; LEESE, 2001).

O estresse oxidativo resultantes das técnicas de reprodução assistida não pode ser evitado. Entretanto pode-se reduzir a formação de ROS adicionando antioxidantes ao meio de cultura ou empregando baixa concentração de O_2 . Estas duas ações parecem ser efetivas na proteção contra os efeitos deletérios proporcionando boas condições de desenvolvimento embrionário (CAAMAÑO et al., 1996; DIAS, 2003; LIM et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2002).

CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação permite o armazenamento de material biológico por tempo indeterminado. Todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores que protegem as células durante o resfriamento e reaquecimento. Estes são divididos em duas categorias, os intracelulares ou penetrantes (dimetilsulfóxido - DMSO, metanol, etanol, glicerol, etilenoglicol - EG, 1,2-propanodiol) que são caracterizados por serem moléculas pequenas que atravessam as membranas celulares e formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água no citosol, com isso o ponto de congelamento da água diminui e há menor probabilidade de formação de cristais de gelo dentro da célula. Os extracelulares ou não penetrantes (lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona - PVP, rafinose, manitol, sorbitol, trealose) que permanecem no meio extracelular por serem moléculas grandes e atuam atraindo a água para fora da célula causando a desidratação da mesma (NIEMANN, 1991; PEREIRA; MARQUES, 2008). Essas duas classes de crioprotetores são usadas separadamente ou associadas para diferentes tipos de protocolos de criopreservação (KIM et al., 1997). A técnica convencional de criopreservação normalmente utiliza somente um crioprotetor, e a vitrificação utiliza misturas de crioprotetores (DOBRINSKY, 2002).

A principal finalidade de um protocolo de criopreservação é obter temperaturas criogênicas sem danos químicos e sem formação de cristais de gelo (RUBINSKY, 2003). A técnica de criopreservação empregada (vitrificação ou congelamento lento) influenciará no surgimento dos danos nas células ou embriões.

A vitrificação baseia-se no uso de soluções aquosas contendo altas concentrações de crioprotetores que aumentam a viscosidade do meio. É a solidificação de um líquido produzida pela extrema elevação na viscosidade durante o congelamento, ou seja, um processo químico pelo qual uma solução concentrada solidifica durante o resfriamento sem formar cristais de gelo, e formando o vítreo (KIM et al., 2012).

Segundo Saragusty e Arav (2011), quanto maior a concentração de crioprotetores, maior será a temperatura de transição para o estado vítreo, diminuindo assim a chance de cristalização da água e a formação do gelo, e, que pequenos volumes permitem uma melhor transferência de calor, aumentando a taxa de resfriamento. A desvantagem da aplicação da técnica de vitrificação é o aumento do risco de injúrias osmóticas causada pelas altas concentrações de crioprotetores.

No congelamento lento as concentrações de crioprotetores são baixas e a saída de água da célula ocorre lentamente (SARAGUSTY; ARAV, 2011). Segundo Al Darwich (2010) o método de congelamento lento não previne o choque térmico e a formação de cristais de gelo, ao contrário da vitrificação, que foi rapidamente adotada frente ao congelamento lento por ser um método prático, de fácil execução, rentável economicamente além de ser realizado num curto período de tempo (VAJTA et al., 1999). Desta forma, atualmente a vitrificação tem sido descrita como o método de eleição para a criopreservação dos embriões produzidos *in vitro*.

No reaquecimento ocorre a entrada de água nas células podendo provocar uma ruptura da membrana plasmática e/ou dos compartimentos membranosos intracelulares com a formação de cristais de gelo e alterações nas membranas (DROBNIS et al., 1993).

A sensibilidade à criopreservação é um fator exclusivo de blastocistos reaquecidos que foram produzidos *in vitro* (IMAI et al., 2002; RIZOS et al., 2001). Uma melhora na sobrevivência após a criopreservação pode ser atingida alterando as condições de cultivo *in vitro* e/ou modificando os métodos tradicionais de criopreservação utilizados (GOMEZ et al., 2008; MASSIP et al., 1995).

O acúmulo intracelular de lipídios pode ser parcialmente responsável pela grande sensibilidade ao congelamento (LEIBO et al., 1993; SEIDEL, 2006) e a adição de soro fetal bovino (SFB) ao meio de cultivo aumenta o acúmulo de lipídios em embriões bovinos (ABE et al., 2002; ABE; HOSHI, 2003; LEROY et al., 2005). Além disso, a delipidação parcial de embriões bovinos PIV melhora a sobrevivência após o reaquecimento dos embriões (DIEZ et al., 2001; USHIJIMA et al., 1999), e a remoção do SFB do meio tem mostrado uma maior resistência do embrião ao processo de criopreservação (RIZOS et al., 2003). A criopreservação também é conhecida por induzir o estresse oxidativo (TARIN; TROUNSON, 1993).

Embora o conteúdo lipídico afete a sensibilidade e a sobrevivência dos embriões criopreservados (ABE et al., 2002; STURMEY et al., 2009), há outros fatores que devem ser levados em conta, como: a origem do embrião (*in vivo* ou *in vitro*), a razão congelamento e aquecimento, tamanho e estágio de desenvolvimento do embrião, propriedades osmóticas e toxicidade dos crioprotetores (PALASZ et al., 1996). Nos embriões produzidos *in vitro*, influenciam também na sobrevivência as condições estáticas da maioria dos protocolos de cultivo, e as substâncias que compõem estes meios induzem o aparecimento de alterações morfológicas e ultra-estruturais nos embriões, que são detectadas somente quando estes são comparados àqueles desenvolvidos sob condições *in vivo* (MASSIP et al., 1995, 2001). Entre outras, as divergências traduzem-se no número de células, no grau de compactação entre os blastômeros, no metabolismo lipídico do embrião e/ou na integridade e permeabilidade das membranas plasmáticas (ABE et al., 1999; MASSIP et al., 1995; RIZOS et al., 2008). Do ponto de vista morfológico, a qualidade dos

embriões produzidos *in vitro* é inferior à dos produzidos *in vivo*, aumentando a susceptibilidade aos danos (KHURAMA; NIEMANN, 2000) decorrentes dos efeitos tóxicos e osmóticos dos crioprotetores, como a formação de cristais de gelo (POLLARD; LEIBO, 1994; VAJTA et al., 1997). Os embriões *in vitro* apresentam uma coloração do citoplasma mais escura e densidade mais baixa (ABE et al., 1999; LEIBO et al., 1993; POLLARD; LEIBO, 1994) devido ao acúmulo de lipídios (ABB EL RAZEK et al., 2000), um espaço perivitelínico maior e com vesiculações, uma população menor de microvilos, reduzidas conexões intercelulares e vacúolos nos trofoblastos (KHURANA; NIEMANN 2000a). Estas características conferem aos embriões *in vitro* uma má tolerância à criopreservação (FAIR et al., 2001; POLLARD; LEIBO, 1993; RIZOS et al., 2002).

Desta forma, a qualidade do embrião antes da criopreservação afeta diretamente a sobrevivência pós reaquecimento, portanto, o sistema de cultivo *in vitro* e o método de congelamento estão relacionados e ambos afetam a viabilidade do embrião. A eficiência dos embriões produzidos *in vitro* congelados provavelmente determinará a aceitação da tecnologia *in vitro* por outros países (STROUD; BO, 2011).

LIPÍDEOS, MEMBRANAS E O PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO

A constituição lipoprotéica das membranas determinará o seu comportamento durante o resfriamento ou às baixas temperaturas. Quanto mais alta a temperatura e quanto maior o número de insaturações mais fluida fica a membrana. Em baixas temperaturas a conformação tridimensional dos canais se altera e a membrana fica menos fluida. Aparentemente as células controlam a fluidez ajustando os tipos de ácidos graxos que são incorporados na membrana. Os lipídios, quando refrigerados, tornam-se endurecidos e quebradiços, podendo afetar a integridade e a permeabilidade da membrana

durante o resfriamento. Essas alterações físico-químicas causam alterações na dinâmica da água e nas concentrações intra e extracelulares durante a criopreservação (ZERON et al., 2001).

O conteúdo lipídico de oócitos e embriões é um importante parâmetro que liga a qualidade à criotolerância. O acúmulo de gotas lipídicas e o conteúdo lipídico de oócitos e embriões podem ser influenciados pelo meio de cultura onde são desenvolvidos (ABE et al., 2002; LONERGAN et al., 2003; PEREIRA et al., 2007, 2008; REIS et al., 2005; RIZOS et al., 2008).

As vesículas de lipídios dentro do citoplasma têm um estreito arranjo espacial com o retículo endoplasmático do embrião, e eles ajudam a promover a nutrição das células, assim como induzir modificações nas propriedades físicas e função da membrana plasmática da célula (STUBBS; SMITH, 1984).

Estudos constataram que a remoção de lipídios intracelulares por centrifugação aumenta a tolerância à criopreservação dos embriões de suínos *in vitro* (NAGASHIMA et al., 1994,1995) e bovinos (USHIJIMA et al., 1999), mas a transferência destes embriões resulta em baixas taxas de prenhez, sugerindo que o estoque de lipídios herdado maternalmente interfere na sobrevivência pós- transferência (DIEZ et al., 1996, 2001).

Pereira e colaboradores (2008) mostraram que a integridade pós-descongelação e a taxa re-expansão em embriões cultivados com SFB contendo CLA *t*-10,*c*-12 foram melhores que os obtidos a partir de meios definidos sem SFB, embora os embriões destes últimos apresentem menor acúmulo de lipídios. A direta incorporação do CLA poliinsaturado dentro da membrana do embrião durante a cultura pode contribuir para um aumento da fluidez da membrana (nível de insaturação). A redução do conteúdo dos triacilgliceróis induzida por ele durante a cultura pode contribuir para o aumento da resistência do embrião à criopreservação.

III HIPÓTESE

A adição de ácido graxo (LA) e antioxidante (catalase) no cultivo *in vitro* de embriões bovinos, na ausência de SFB e em atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂ e 88% N₂, gera embriões com menor conteúdo lipídico e mais criotolerantes ao processo de vitrificação.

IV OBJETIVOS

GERAL

Produzir embriões com menor conteúdo lipídico e menos sensíveis à criopreservação.

ESPECÍFICOS

- Avaliar qual suplementação proteica será utilizada no experimento principal tanto na maturação (SFB ou BSA) como no cultivo *in vitro* (SFB+BSA ou BSA) e qual atmosfera gasosa utilizada no cultivo *in vitro* (baixa ou alta tensão de oxigênio – 20% O₂ vs 7%O₂);

- Avaliar os efeitos da adição tanto do ácido linoleico (LA) como da catalase isolados ou em conjunto, no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos e a competência em gerar embriões;

- Avaliar o conteúdo lipídico total dos embriões, a quantidade de DNA fragmentado, a quantidade de espécies reativas de oxigênio encontradas nos diferentes grupos, e a taxa de re-expansão pós criopreservação dos embriões.

V MATERIAL E MÉTODOS

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Ovários de vacas abatidas em frigoríficos foram transportados até o laboratório em solução fisiológica a uma temperatura entre 30-35°C. As punções foliculares foram realizadas com seringa acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL e decantado por 15 minutos para posterior seleção dos oócitos. Somente complexos cumulus-oócitos (COCs) com cumulus compacto e citoplasma homogêneo (grau I) seguiram para os experimentos.

Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (TCM-199 suplementado com 0,2mM de piruvato, 20mM de HEPES, 5mM de Bicarbonato de sódio e 75µg/mL de amicacina) e uma vez em meio de maturação B-199 (TCM199 suplementado com 0,2mM de piruvato, 25mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH, 100UI/mL de hCG) com 10% SFB ou 0,008g/mL BSA. O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 22-24horas.

Ao término da MIV, os oócitos seguiram para a fecundação *in vitro*. Foi utilizado apenas um touro de uma mesma partida para todas as rotinas. Para a obtenção do sêmen, as palhetas foram descongeladas em banho-maria à 35°C, durante 30 segundos e seu conteúdo centrifugado em gradiente Percoll (45 e 90%) durante 5 minutos a 900G. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração espermática ajustada para 25x10⁶ espermatozóides/mL de meio de fecundação (TALP-FIV) suplementado com 4 µl/mL solução PHE (1 mM hipotaurina, 2 mM penicilamina e 250 µM epinefrina) e 10 µg/ml heparina. Aproximadamente 100x10³ espermatozóides foram adicionados a cada gota de 100 µl de meio de fecundação. Os COCs foram lavados em meio TALP-FIV. Foram adicionados 25 oócitos/gota, permanecendo em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 22 horas.

Após a fecundação, os prováveis zigotos foram cultivados por 7 dias em placas de 4 poços NUNC ou placas de 35mm em microgotas. O CIV foi conduzido em atmosfera controlada com mistura de gases (7% de O₂, 5% de CO₂ e 88% de N₂) em “BAGS” (polietileno de baixa densidade) em temperatura de 38,5°C ou atmosfera de 5%CO₂ em ar (Figura 7).

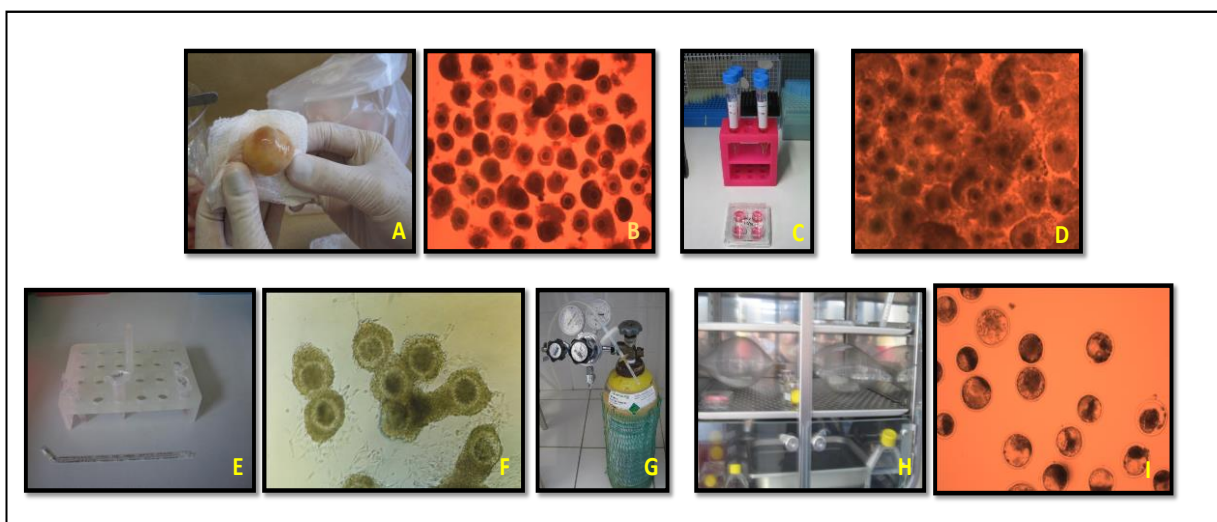


FIGURA 7 – Etapas da produção *in vitro*. A- ovário; B- Oócitos selecionados Grau I; C- Meios de maturação e placa de 4 poços utilizada na maturação; D- Oócitos maturados após 22-24 horas de MIV; E- Palheta de sêmen descongelada e percoll; F- Oócitos + espermatozoides na gota de FIV; G- Mistura gasosa de 5%CO₂, 7%O₂, 88%N₂ aplicada nos “BAGS”; H- “BAGS” dentro da incubadora; I- Embriões D7.

ANÁLISE DO CONTEÚDO TOTAL DE LIPÍDEOS NOS EMBRIÕES – COLORAÇÃO NILE RED

A quantificação do conteúdo lipídico foi avaliada com a utilização da coloração com Nile Red. Nesta técnica altamente sensível, a quantidade de lipídios intracelulares é correlacionada com a emissão de fluorescência (GENICOT et al., 2005).

No dia sete de cultivo, os blastocistos foram classificados e posteriormente separados em grupos. Estes foram fixados por uma hora em 1

mL de paraformaldeído 3,7% acrescido de 10% de TRITON 100X. Em seguida, foram incubados durante 3 horas em 1 mL de PBS acrescido de 10µg/mL de Nile Red e 0,1% PVP, em temperatura ambiente e protegidos da luz. Terminado esse passo, os embriões foram lavados em 3 banhos de solução salina 0,9% com 0,1% PVP, e seguiram direto para microscópio equipado com epifluorescência para captar a imagem em gotas de meio de lavagem.

Os embriões foram avaliados em microscópio com epifluorescência, com objetiva de 40X para quantificação da intensidade do sinal de fluorescência (em pixels), segundo protocolo de Genicot e equipe (2005). As imagens foram fotografadas e, posteriormente, a intensidade de fluorescência avaliada com o auxílio do programa Q-Capture Pro Image (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26). O sinal médio de intensidade de fluorescência de embriões controle negativo (embriões fixados com paraformaldeído, antes da coloração com Nile Red) foi subtraído do valor quantificado em cada microfotografia dos embriões dos diferentes grupos experimentais, para eliminar o sinal de *background*. Os resultados estão apresentados como valores ajustados de intensidade relativa de fluorescência.

MENSURAÇÃO DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) PELO ENSAIO COM DICLOROFLUORESCEÍNA

Os níveis intracelulares de ROS (H_2O_2 , $HO\cdot$, $ROO\cdot$) foram quantificados através da utilização da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA ; Molecular Probes, Invitrogen; BAIN et al., 2011). Os embriões foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 5 µM de H_2DCFDA durante 30 minutos no escuro, a 38,5°C e 5% CO_2 em ar. Terminado este primeiro passo, os embriões foram novamente lavados duas vezes em PBS e analisados imediatamente em microscópio

invertido equipado com epifluorescência, com exposição de 508ms, excitação de 495 nm e emissão de 520 nm em objetiva de 40X. As imagens foram fotografadas e, posteriormente, a intensidade de fluorescência foi avaliada com auxílio do Software Q-Capture Pro Image (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26). O sinal médio de intensidade de fluorescência de embriões controle negativo (embriões fixados com paraformaldeído, antes da coloração com H₂DCFDA) foi subtraído do valor quantificado em cada microfotografia dos embriões dos diferentes grupos experimentais, para eliminar o sinal de *background*. Os resultados estão apresentados como valores ajustados de intensidade relativa de fluorescência.

COLORAÇÃO “TERMINAL TRANSFERASE ASSAY” - TUNEL

As células em apoptose dos embriões foram marcadas pela coloração “*in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP, Nick and labeling assay*” (TUNEL), descrita por Paula Lopes e Hansen (2002). Blastocistos obtidos no D7 foram lavados por quatro vezes em 100 µL de PBS 1% PVP (PBS-PVP) e posteriormente fixados, com a zona pelúcida intacta, em 100 µL de solução de paraformaldeído (4%), a temperatura ambiente por 1 hora. Os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em citrato de sódio (0,1%), por 30 minutos em temperatura ambiente.

Os embriões reservados para o controle positivo foram incubados com DNase I (50 UI/ml de água Milli-Q) (RNase free) a 37°C por 1 hora, enquanto que os embriões dos tratamentos permaneceram, pelo mesmo período, em gotas de 100 µl de PBS-PVP. Posteriormente, todos os embriões foram lavados em PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 15 µL da mistura (1:9, da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Germany), por 1 hora a 37°C no escuro. Os embriões reservados para o controle negativo foram incubados na ausência da enzima

“terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) (tubo 1, contida no kit). Posteriormente, os embriões foram incubados em solução Hoechst 33342 (1 µg/mL de PBS-PVP) por 30 minutos, em temperatura ambiente.

Por fim, os embriões foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Estes foram avaliados em microscópio equipado com epifluorescência (excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm) quanto ao número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas = fluorescência verde ou amarelada pontual dentro no núcleo) em relação ao número total de células (determinado pelos núcleos corados em azul pelo corante Hoechst).

VITRIFICAÇÃO E ANÁLISE DA RE-EXPANSÃO EMBRIONÁRIA PÓS AQUECIMENTO

Os procedimentos utilizados para vitrificação e desvitrificação (reaquecimento) foram realizados de acordo com o protocolo Vitri-Ingá® (Ingámed, Paraná, Brasil) (Figura 8).



FIGURA 8 - Equipamentos e haste usada no processo de vitrificação Vitri-Ingá.

Os embriões selecionados para vitrificação foram retirados dos poços no dia 7 de cultivo (D7) e transferidos para uma placa contendo microgotas de 20 µL de solução de manutenção. Em seguida, foram transferidos para solução de equilíbrio (VI-1) por 5 minutos, e, posteriormente para microgotas (3) de 20 µL da solução de vitrificação (VI-2) por um período de 60 segundos. No decorrer

dos últimos 20 segundos, todos os embriões foram retirados com o mínimo de volume da última gota, e depositados na porção final de uma haste de polipropileno (até 8 embriões/haste) de 0,7 mm de espessura, e foram diretamente mergulhadas no nitrogênio líquido. As hastes foram introduzidas no protetor dentro do nitrogênio, sendo então armazenadas em botijões criogênicos.

Para desvitrificação dos embriões (reaquecimento), as hastes foram retiradas dos botijões de N₂ e imediatamente imersas na solução de desvitrificação 1 (DV-1) por 1 minuto a 37°C. Posteriormente, os embriões foram transferidos para a solução 2 (DV-2) por 3 minutos e por fim na solução 3 (DV-3) por 5 minutos.

Após esse procedimento, os embriões seguiram novamente ao CIV (agora em meio SOF suplementado com 20% SFB em placas de 4 poços com 500µL por poço, e sem óleo mineral) e destinados à avaliação da taxa de re-expansão embrionária (sobrevivência *in vitro*). Essa taxa foi expressa pela taxa de re-expansão imediata, às 3 e 24 horas pós reaquecimento, assim como a taxa de eclosão (48 horas).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

DELINEAMENTO DO PRE-EXPERIMENTO – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SFB OU BSA NA MIV E/OU CIV NAS 2 ATMOSFERAS PROPOSTAS (5%CO₂ EM AR OU 5%CO₂, 7%O₂ E 88%N₂)

No pré-experimento, foram testadas as suplementações com SFB ou BSA na MIV e/ou CIV nas atmosferas de alta e baixa tensão de oxigênio.

Na maturação, o grupo com SFB o meio de maturação foi composto por TCM199 suplementado com 0,2mM de piruvato, 25mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH, 100UI/mL de hCG e 10%

SFB. O grupo BSA foi composto pelos mesmos componentes porém sem a adição de SFB e suplementado com 0,008g/mL de BSA. Pelo menos vinte e cinco estruturas foram transferidas para microgotas de 100µL de meio de maturação. O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 22-24 horas.

Após fecundação, os prováveis zigotos foram cultivados por 7 dias em microgotas de 100µL cobertas com óleo mineral (atmosfera de 5%CO₂) ou em placas NUNC de 4 poços com 500 µL (atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂ e 88%N₂). O meio de cultivo foi o SOF suplementado ou com 0,004g/mL de BSA e 2,5% SFB ou suplementado apenas com 0,008g/mL BSA. O cultivo foi realizado tanto na atmosfera de 5%CO₂ em ar e em atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂ e 88%N₂ em temperatura de 38,5°C e máxima umidade.

Foram avaliados o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto após 144 e 168 hpi (Figura 9).

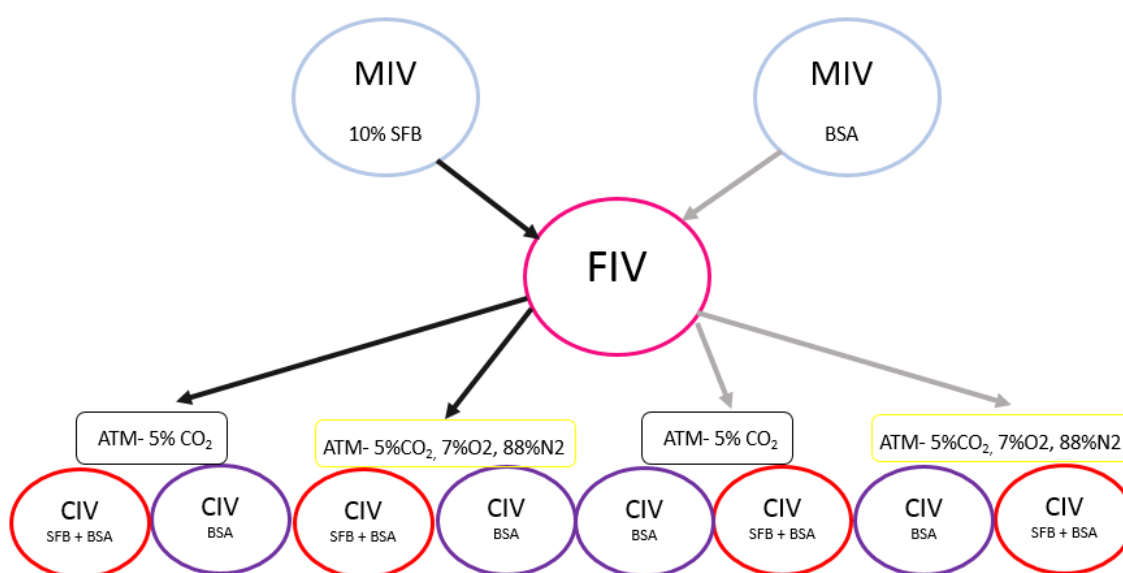


FIGURA 9 – Delineamento Experimental – Pré-experimento

DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO PRINCIPAL – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM LA E/OU CAT NO CIV EM ATMOSFERA DE 5%CO₂, 7%O₂ E 88%N₂

A Maturação foi realizada com a suplementação de 10% SFB. Após fecundação, os prováveis zigotos foram cultivados por 7 dias em placas de 4 poços NUNC por 7 a 8 dias (168 a 192 hpi) em meio: 1) SOF suplementado com 0,008g/mL BSA (controle); 2) SOF suplementado com 0,008g/mL BSA e 100 µM de LA (LA) (PEREIRA et al., 2007); 3) SOF suplementado com 0,008g/mL BSA e 100 UI de catalase (CAT) (ORSI; LEESE, 2001); e 4) SOF suplementado com 0,008g/mL BSA e 100 µM de LA e 100 UI de catalase (LA + CAT). A maioria dos protocolos de produção *in vitro* de embriões postulam que na ausência de SFB as concentrações de BSA devem variar entre 0,006 e 0,008g/mL. O CIV foi conduzido em atmosfera controlada com mistura de gases (7% de O₂, 5% de CO₂ e 88% de N₂) em “BAGS” (polietileno de baixa densidade) em temperatura de 38,5°C (figura 8- delineamento experimental). A umidade é feita com a adição de água ultra pura nos espaços entre os poços da placa de 4 poços, e o gás é injetado dentro do “BAG” com o auxílio de uma agulha, onde depois a abertura foi fechada com fita adesiva.

Foi avaliado o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto após 144 e 168 hpi, quando os mesmos foram corados para avaliação de ROS, do teor lipídico e fragmentação do DNA ou foram vitrificados. Posteriormente à vitrificação, os embriões foram reaquecidos para avaliação da taxa de re-expansão e eclosão após o cultivo *in vitro* por até 48 horas (Figura 10).

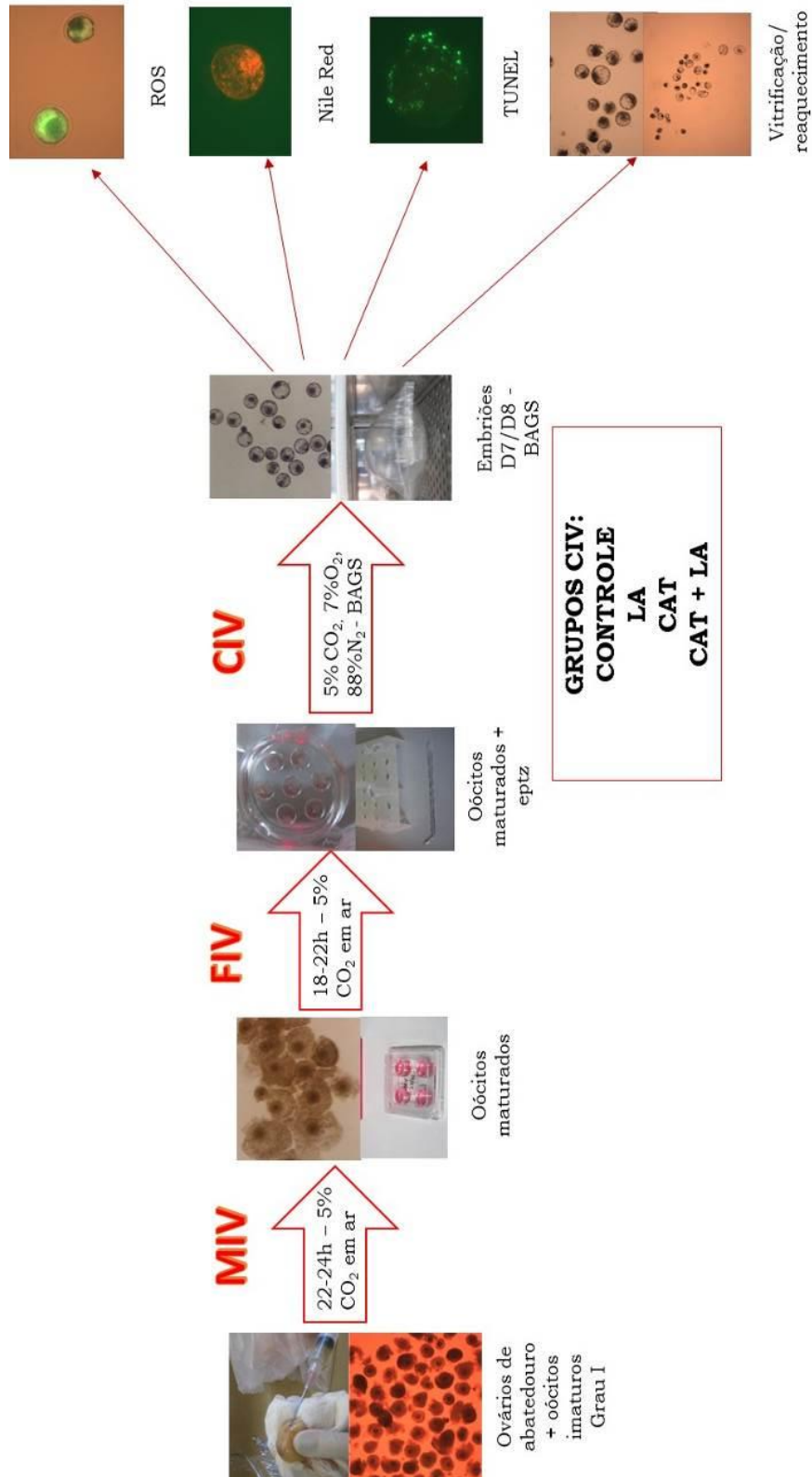


FIGURA 10 – Delineamento experimental do experimento principal

VI ANÁLISE ESTATÍSTICA

No pré-experimento, foram feitas pelos menos 5 repetições, onde o dia foi considerado a unidade experimental. Em cada replicata, foi utilizado pelo menos um poço ou uma gota de cultivo com 40-50 oócitos para cada grupo. A taxa de blastocisto foi calculada sobre o total de oócitos maturados. As porcentagens foram transformadas em arco seno da raiz quadrada e foram analisados por PRO-GLM, considerando o modelo estatístico que inclui o suplemento do meio de maturação (BSA ou SFB), o suplemento do meio de cultivo (BSA ou SFB+BSA), a atmosfera gasosa (7% ou 20% O₂) e possíveis interações. Os dados são apresentados como média dos quadrados mínimos. Se ANOVA for significativa, os valores de média dos quadrados mínimos foram comparados por Tukey. Na ausência de interações significativas apenas a média dos efeitos principais foram apresentados. Os valores menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados significativos, e, valores entre 0,05 e 0,1 foram considerados como tendência.

No experimento principal, cada experimento foi repetido no mínimo 20 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata, foi utilizado um poço da placa de cultivo celular com 40-50 oócitos para cada grupo experimental, sendo que o dia foi considerado a unidade experimental. A taxa de blastocistos foi calculada sobre o total de oócitos maturados. Os dados foram analisados pela fração de embriões cultivados atingindo os estádios determinados, reportada em termos de porcentagem. As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada e os dados transformados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. O estudo comparativo entre variáveis binomiais foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). Os valores menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados significativos, e, valores entre 0,05 e 0,1 foram considerados como tendência.

As análises foram realizadas pelo programa SAS.

VII RESULTADOS

RESULTADOS DO PRÉ-EXPERIMENTO

Os valores das taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário para os diferentes tratamentos na MIV e no CIV do pré-experimento estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Desenvolvimento embrionário em meio de cultivo com SFB ou BSA (na MIV) e SFB + BSA ou BSA (no CIV) nas atmosferas de 5%CO₂ em ar = 20%O₂ e de 7%O₂, 5%CO₂ e 88%N₂, até o D8 (192 hpi)

MIV	CIV	N. oócitos	ATM	% D7	%D8
BSA	BSA	605	20% O ₂	11,9 ± 1,2	15,6 ± 1,7
BSA	BSA	473	7%O ₂	6,2 ± 0,6	9,1 ± 1,0
BSA	SFB+BSA	34	20% O ₂	32,4	32,4
BSA	SFB+BSA	85	7%O ₂	20,8 ± 4,8	23,8 ± 1,8
SFB	SFB+BSA	552	20% O ₂	41,6 ± 5,5	48,8 ± 4,9
SFB	SFB+BSA	294	7%O ₂	28,5 ± 3,8	31,3 ± 3,5
SFB	BSA	232	20% O ₂	29,7 ± 1,4	28,1 ± 2,5
SFB	BSA	1.504	7%O ₂	26,4 ± 2,3	30,8 ± 2,2
		3.779	-	-	-

Embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado SFB ou BSA na MIV ou CIV até as 192 hpi sob a atmosfera de 5% CO₂ em ar ou de 5%CO₂, 7%O₂, 88%N₂.

O desenvolvimento embrionário (D7 e D8), o Grupo MIV com SFB e CIV com SFB+BSA em atmosfera de 20%O₂ (41,6% e 48,8%) apresentaram maiores taxas de produção. O mesmo tratamento em atmosfera de 7%O₂, essas taxas foram menores (28,5% e 31,3%). O Grupo MIV e CIV com BSA nas duas atmosferas apresentaram os menores resultados (D7: 11,9 e 6,2% em atmosfera de 20 e 7%, e D8: 15,6 e 9,1% em atmosfera de 20 e 7%

respectivamente). Como não houve interação ($P>0,05$) entre os tratamentos (SFB e/ou BSA) e tensão de oxigênio (7 e 20%O₂), os resultados estão apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabela 2).

Tabela 2 - Agrupando os dados (MIV, CIV, atmosfera) para avaliar o efeito no desenvolvimento embrionário em meio de cultivo com SFB ou BSA (na MIV) e SFB + BSA ou BSA (no CIV) nas atmosferas de 5%CO₂ em ar = 20%O₂ e de 7%O₂, 5%CO₂ e 88%N₂, até o D8 (192 hpi)

Efeito Principal		N. oócitos	% D7	Valor p	%D8	Valor p
MIV	BSA	1.078	17,2 ± 3,6 ^b	<0,0001	20,2 ± 3,4 ^b	<0,0007
	SFB	2.582	31,5 ± 2,3 ^a		34,8 ± 2,2 ^a	
CIV	BSA	2.814	17,9 ± 2,1 ^b	<0,004	20,9 ± 2,0 ^b	<0,002
	SFB+BSA	846	30,8 ± 3,8 ^a		34,1 ± 3,6 ^a	
Atmosfera	20% O ₂	1.389	28,6 ± 3,5 ^a	0,0545	31,2 ± 3,3 ^a	0,0738
	7%O ₂	2.271	20,1 ± 2,6 ^a		23,8 ± 2,4 ^a	
		-	-		-	

Embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado SFB ou BSA na MIV ou CIV até as 192 hpi sob a atmosfera de 5% CO₂ em ar ou de 5%CO₂, 7%O₂, 88%N₂.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Quando avaliamos o efeito da suplementação na MIV e CIV (Tabela 2), e a atmosfera, observamos que a suplementação com soro (SFB) na MIV e no CIV apresentou taxas significativamente maiores de produção de embriões ($P<0,05$). Já a quando comparamos apenas as 2 atmosferas testadas não foi observada diferença significativa ($P>0,05$), mas foi observada uma tendência da atmosfera de 20%O₂ apresentar resultados maiores que a de 7%O₂.

RESULTADOS DO EXPERIMENTO PRINCIPAL

Para os experimentos realizados com os tratamentos com LA, CAT ou ambos, foi escolhido a suplementação na maturação com SFB, cultivo sem adição de soro e atmosfera de baixa tensão de oxigênio (5%CO₂, 7%O₂ e 88%N₂).

Avaliando os experimentos com os tratamentos propostos, os valores das taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário para os diferentes tratamentos no cultivo *in vitro* estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Clivagem e desenvolvimento embrionário em meio de cultivo *in vitro* suplementado com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi)

CIV	N. oócitos	% Clivados (% média ± EPM)	% D7 (% média ± EPM)	%D8 (% média ± EPM)
Controle	1.504	72,0 ± 1,2%	26,4 ± 2,3% ^a	30,8 ± 2,2% ^a
LA	1.596	74,3 ± 1,0%	18,3 ± 1,5% ^b	23,1 ± 1,5% ^b
CAT	1.551	72,2 ± 0,8%	14,2 ± 1,3% ^{bc}	19,3 ± 1,5% ^b
CAT+LA	1.958	72,3 ± 0,8%	9,2 ± 0,9% ^c	12,7 ± 1,0% ^c
TOTAL	6.609	72,7%	17,0%	20,7%

Clivagem e embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado ou não até as 192 hpi sob a atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂, 88%N₂. CONTROLE = embriões submetidos ao CIV sem a adição de nenhum suplemento; LA = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 µM de LA; CATALASE = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 UI de catalase; CAT+LA = embriões submetidos ao CIV com adição de 100 µM de LA e 100 UI de catalase.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Quando foi avaliado o efeito da suplementação nas taxas de clivagem não houve diferença significativa (P>0,05) em relação ao controle (Tabela 3). No entanto, o desenvolvimento embrionário (D8) foi superior no grupo controle (30,8%), seguido pelos grupos LA (23,1%) e CAT (19,3%) e o pior resultado encontrado no grupo CAT+LA (12,7%).

Quando foi avaliada a quantidade de lipídios intracelulares presente nos embriões (Tabela 4) submetidos a cada tratamento, houve uma diferença ($P < 0,05$) significativa, onde o grupo controle apresentou maior quantidade de lipídios quando comparados aos 3 grupos tratados (Figura 11).

Tabela 4 - Quantidade intracelular de lipídios (unidades arbitrárias de fluorescência-UAF) presentes nos embriões suplementado com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi)

GRUPOS	Nº Embriões avaliados	Nile Red (UAF) Média $\pm$ EPM
CONTROLE	74	27,3 $\pm$ 0,7 ^a
LA	58	24,6 $\pm$ 0,7 ^b
CAT	35	22,2 $\pm$ 0,7 ^b
CAT + LA	32	22,9 $\pm$ 1,0 ^b
TOTAL	199	-

Mensuração da quantidade total de lipídios em unidades arbitrárias de fluorescência pela coloração com Nile Red de embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado ou não até as 192 hpi sob a atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂, 88%N₂. CONTROLE = embriões submetidos ao CIV sem a adição de nenhum suplemento; LA = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 μ M de LA; CATALASE = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 UI de catalase; CAT+LA = embriões submetidos ao CIV com adição de 100 μ M de LA e 100 UI de catalase. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

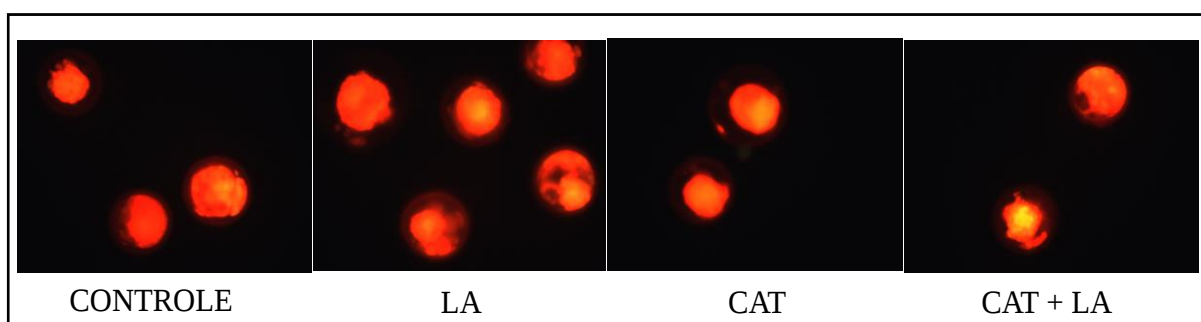


FIGURA 11 – Coloração com Nile Red (quantidade total de lipídios).

Com relação à quantificação intracelular de ROS (espécies reativas de oxigênio), mensurado em pixels emitida pela coloração com H₂DCFDA, a análise não mostrou diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos (LA, CAT, CAT+LA) e o Grupo controle (Tabela 5 e Figura 12).

Tabela 5 - Quantificação intracelular de ROS (em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) presentes nos embriões suplementado com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi)

GRUPOS	Nº Embriões avaliados	ROS (UAF) Média ± EPM
CONTROLE	58	2,7 ± 0,1
LA	52	3,1 ± 0,2
CAT	60	2,8 ± 0,1
CAT + LA	31	2,9 ± 0,2
TOTAL	201	-

Mensuração de ROS em unidades arbitrárias de fluorescência pela coloração com H₂DCFDA de embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado ou não até as 192 hpi sob a atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂, 88%N₂. CONTROLE = embriões submetidos ao CIV sem a adição de nenhum suplemento; LA = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 µM de LA; CATALASE = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 UI de catalase; CAT+LA = embriões submetidos ao CIV com adição de 100 µM de LA e 100 UI de catalase.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

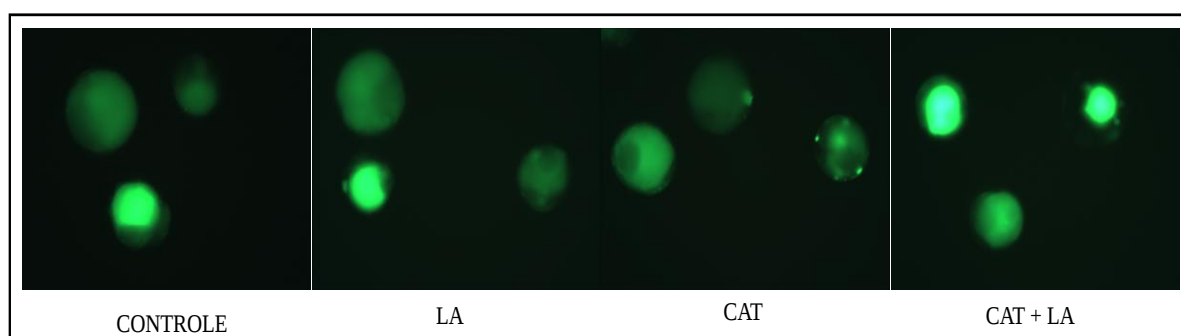


FIGURA 12 – Coloração com H₂DCFDA (mensuração de ROS).

Com relação ao número de células (Tabela 6) onde foi utilizada a coloração com Hoechst, houve uma diferença significativa ($P<0,05$) com controle (114,9) e CAT (116,8) que apresentaram valores superiores ao CAT + LA (92,7). O Grupo LA (107,5) não diferiu do controle nem do Grupo CAT + LA. Com relação a porcentagem de células apoptóticas, a análise mostrou diferença ($P<0,05$), onde o grupo CAT (3,3) apresentou uma maior porcentagem de células apoptóticas quando comparado com controle (1,8), LA (2,0) e CAT+LA (1,9) (Figura 13).

Tabela 6 - Efeito da suplementação com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi) sobre o número total de células e a taxa (%) de apoptose em blastocistos bovinos

CIV	Nº Embriões avaliados	Nº Total de células (Média $\pm$ EPM)	Células apoptóticas (% média $\pm$ EPM)
Controle	66	114,9 $\pm$ 5,5 ^a	1,8 $\pm$ 0,2 ^b
LA	58	107,5 $\pm$ 5,3 ^{ab}	2,0 $\pm$ 0,3 ^b
CAT	51	116,8 $\pm$ 5,6 ^a	3,3 $\pm$ 0,6 ^a
CAT+LA	38	92,7 $\pm$ 3,0 ^b	1,9 $\pm$ 0,2 ^b
213		-	-

Número de células totais pela coloração com Hoechst e porcentagem de células apoptóticas pela técnica TUNEL de embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado ou não até as 192 hpi sob a atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂, 88%N₂. CONTROLE = embriões submetidos ao CIV sem a adição de nenhum suplemento; LA = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 μ M de LA; CATALASE = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 UI de catalase; CAT+LA = embriões submetidos ao CIV com adição de 100 μ M de LA e 100 UI de catalase. Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

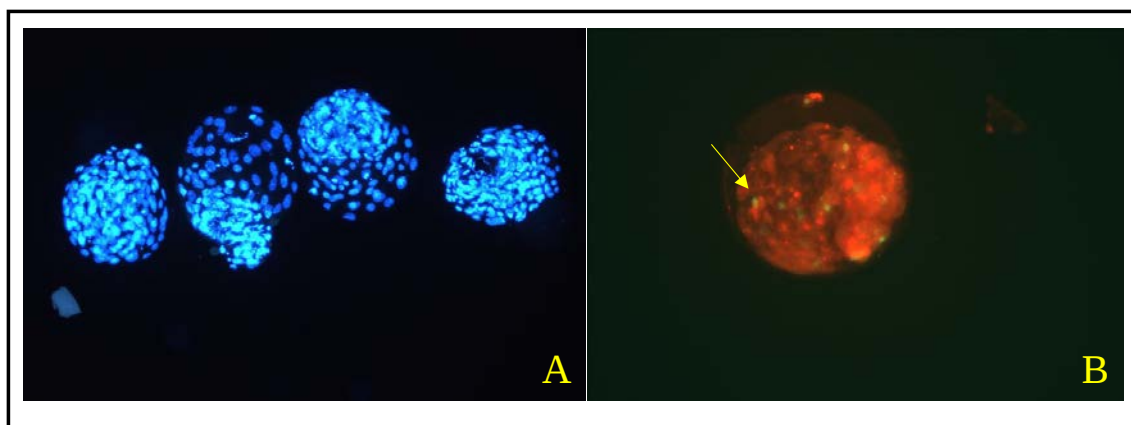


FIGURA 13 – Coloração com Hoechst (A) e TUNEL (B).

Quando avaliamos a taxa de re-expansão imediata dos embriões (Tabela 7) após eles terem sido reaquecidos (desvitrificados), não houve diferença significativa ($P>0,05$). Porém, na avaliação após 3h, 24h e a taxa de eclosão após 48h, foi observada uma diferença significativa ($P<0,05$). Às 3 horas, o Grupo CAT+LA foi superior (74,4%) aos Grupos controle (47,6%) e CAT (49,1%), os quais não diferiram do LA (56,5%). Já em 24 horas, tanto o Grupo LA (71,7%) como o CAT+LA (76,7%) diferiram significativamente do Grupo controle (50%), sendo que o Grupo CAT (67,2%) não diferiu nem do controle como dos Grupos LA e CAT+LA. Já a taxa de eclosão às 48 horas de recultivo, o Grupo CAT+LA (76,7%) e o Grupo LA (56,5%) foram superiores aos resultados obtidos pelo Grupo controle (35,7%) e CAT (47,5%) (Figura 14).

O gráfico (Figura 15) apresenta os dados da taxa de eficiência, que é a porcentagem esperada de embriões sobreviventes após o aquecimento, baseada no N total de oócitos iniciais de cada grupo. Foram comparados os quatro grupos (controle, LA, CAT e CAT+LA), considerando os dados das taxas de embriões em D8, e as taxas de re-expansão imediata, às 24 e 48 horas (%D8 x taxa re-expansão). Na taxa de re-expansão imediata, o Grupo controle apresentou a maior taxa de eficiência (18,3%) seguido pelo LA e CAT (14,1 e 14,2%), e o menor resultado foi obtido pelo Grupo CAT+LA (8,8%). Após 24 horas de recultivo, o Grupo LA (16%) não diferiu do controle (15,4%) e este não diferiu do CAT (13,3%), e novamente o Grupo CAT+LA apresentou o menor

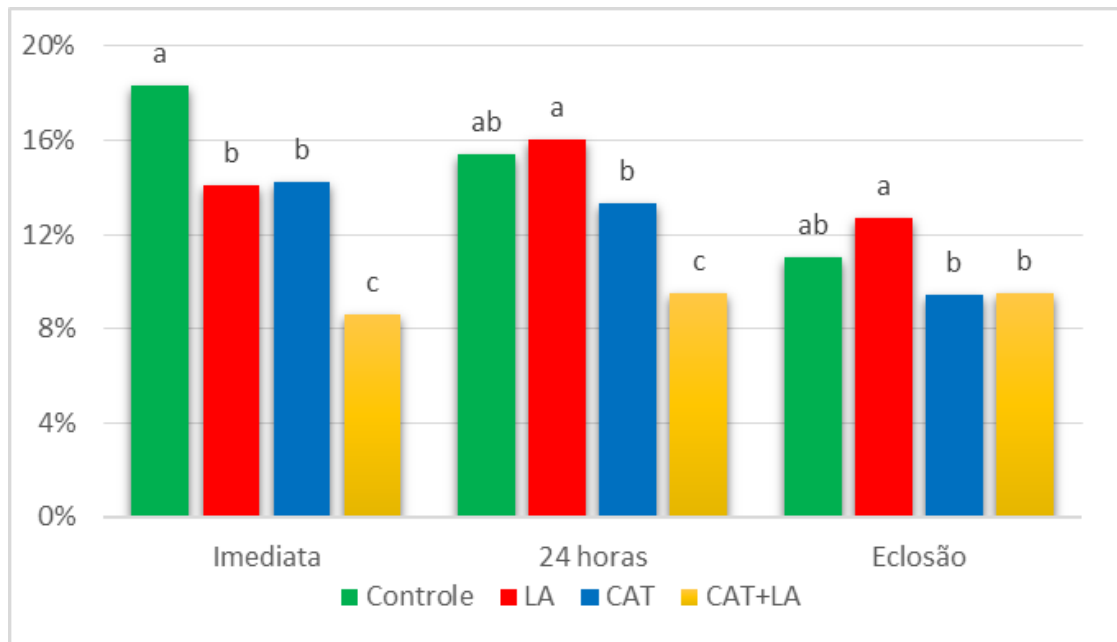
resultado (9,5%). Quando observamos a taxa de eclosão, o Grupo LA (12,7%) não diferiu estatisticamente do controle (11%), e o controle não diferiu do CAT (9,4%) e do CAT+LA (9,5%).

Tabela 7 - Taxa de re-expansão e cultivo *in vitro* imediatamente pós reaquecimento, 3 e 24 horas, taxa de eclosão (48 horas) de embriões CIV em meio suplementado com ácido graxo (LA – ácido linoleico), antioxidante (CAT – catalase) ou ambos, até o D8 (192 hpi)

GRUPOS	N° Embriões reaquecidos	Re-exp imediata N° (%)	Re-exp 3h N° (%)	Re-exp 24h N° (%)	Eclosão 48h N° (%)
CONTROLE	42	25 (59,5%) ^a	20 (47,6%) ^a	21 (50,0%) ^a	15 (35,7%) ^a
LA	46	29 (63,0%) ^a	26 (56,5%) ^{ab}	33 (71,7%) ^b	26 (56,5%) ^{bc}
CAT	61	44 (72,1%) ^a	30 (49,1%) ^a	41 (67,2%) ^{ab}	29 (47,5%) ^{ac}
CAT + LA	43	30 (69,7%) ^a	32 (74,4%) ^b	33 (76,7%) ^b	33 (76,7%) ^b
TOTAL	192	128 (66,6%)	108 (56,2%)	128 (66,6%)	103 (53,6%)

Taxa de re-expansão de embriões produzidos *in vitro* e vitrificados/reaquecidos. CONTROLE = embriões submetidos ao CIV sem a adição de nenhum suplemento; LA = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 µM de LA; CATALASE = embriões submetidos ao CIV com a adição de 100 UI de catalase; CAT+LA = embriões submetidos ao CIV com adição de 100 µM de LA e 100 UI de catalase.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (χ^2) (P<0,05).



Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste Qui-quadrado (χ^2) ($P < 0,05$).

FIGURA 15 - Taxa de eficiência por grupo utilizando os dados de produção de embriões no dia 8 (D8) e as taxas de re-expansão imediata, às 24 horas e às 48 horas (eclosão)

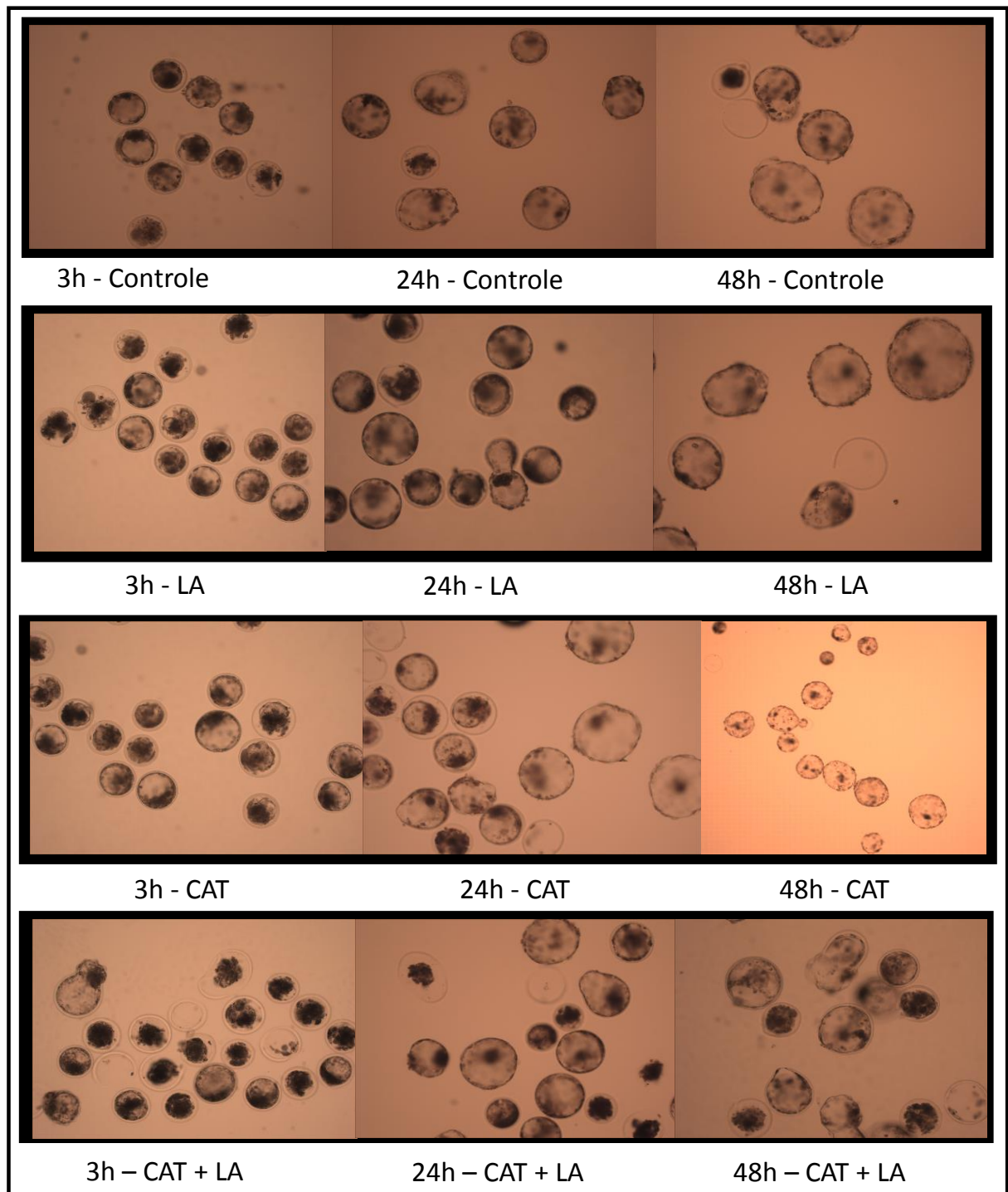


FIGURA 14 – Embriões reauecidos (objetiva de 40x).

VIII DISCUSSÃO

Com o intuito de colaborar na superação dos desafios inerentes à criopreservação de embriões produzidos *in vitro* este trabalho testou o uso de atmosfera de baixa tensão de oxigênio juntamente com a adição de ácidos graxos poli-insaturados (LA) e/ou antioxidante (catalase) em cultivo *in vitro* sem a presença de SFB afim de se obter embriões com características mais próximas daqueles produzidos *in vivo*, e assim com perspectivas de melhores resultados no processo de criopreservação.

Os experimentos foram iniciados testando a retirada do SFB da maturação e do cultivo *in vitro* (Tabela 1) e a utilização das atmosferas de alta e baixa tensão de oxigênio. Como é possível observar, quando foi feita a retirada total de SFB, usando apenas BSA na MIV e CIV, nas 2 atmosferas testadas, as taxas de produção de embriões ficaram muito baixas (15,6% e 9,1%) inviabilizando a possibilidade da retirada total do SFB do processo de produção *in vitro*. O procedimento padrão do laboratório, com suplementação com SFB na MIV e uma mistura de BSA e 2,5% SFB no CIV na atmosfera de 5%CO₂ em ar a produção de embriões ficou em 48,8% e na atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂ e 88%N₂ em 31,3%. Os dados obtidos nestes testes iniciais corroboram com o de vários autores que também apresentaram resultados de taxas de desenvolvimento embrionário maiores na presença de SFB (LEIVAS et al., 2011; PEREIRA et al., 2007; SOMFAI et al., 2010; SUDANO et al., 2011).

O objetivo era retirar o SFB pelo menos do cultivo *in vitro* para podermos avaliar o efeito da suplementação com LA e/ou CAT sem a interferência dos componentes indefinidos (ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos, vitaminas) presentes no SFB (BRUNNER et al., 2010). Avaliando os resultados obtidos retirando o SFB somente do CIV nas 2 atmosferas, e a taxa de produção de embriões não diferiu na comparação entre as atmosferas propostas (28,1% e 30,8%). Portanto, optamos por utilizar a atmosfera de baixa tensão de oxigênio e sem a suplementação de SFB no CIV.

Quando utilizamos a atmosfera de 5%CO₂ em ar houve uma tendência ($P>0,05$ e $P<0,1$) de maiores taxas de produção de embriões. Os trabalhos de Rocha-Frigoni et al. (2013) também apresentaram melhores taxas com atmosfera de alta tensão de oxigênio, e contrariando os resultados de outros (FUJITANI et al., 2007; KITAGAWA et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2000) que reportaram resultados superiores na atmosfera de baixa tensão de oxigênio. Um fator que pode ter influenciado nestes resultados apresentados, pode ter sido a utilização de “plastic BAGS” para a realização do cultivo *in vitro* em baixa tensão, o que pode ter gerado menores taxas de produção de embriões, já que a equipe Arias (2011) testou a realização do cultivo em atmosfera de baixa tensão tanto em BAGs como em estufa, e em BAGs as taxas foram significativamente menores. Outro ponto a considerar, é que ao utilizar a atmosfera de baixa tensão de oxigênio os embriões não são co-cultivados com células do *cumulus*, por essa razão, há um aumento na manipulação para remoção destas células após a FIV, expondo os prováveis zigotos a um estresse que pode comprometer seu potencial de desenvolvimento (CORREA et al., 2008).

No presente estudo observou-se que a suplementação com LA e/ou CAT no CIV não modificou as taxas de clivagem em relação ao controle (72,0; 74,3; 72,2 e 72,3% – controle, LA, CAT e CAT+LA, respectivamente), corroborando em parte com os dados de Pereira et al. (2007, 2008) que também adicionaram LA no processo de produção *in vitro* e não observaram diferenças nas taxas de clivagem dos embriões. A suplementação com catalase (CAT) também não alterou a taxa de clivagem em relação ao controle, igualmente os resultados de Rocha-Frigoni (2012).

Na avaliação das taxas de produção de embriões nos dias 7 e 8 observamos um atraso no desenvolvimento dos embriões (a maioria apresentavam-se em blastocistos expandidos apenas no dia 8). Uma justificativa seria a retirada do SFB, que é sabido que inibe as primeiras divisões celulares, mas estimula o desenvolvimento embrionário posterior (RIZOS et al., 2003). Os três tratamentos propostos (LA, CAT e CAT+LA) apresentaram em D8 menores taxas de desenvolvimento embrionário quando

comparados ao grupo controle (30,8; 23,1; 19,3; 12,7% – controle, LA, CAT e CAT+LA respectivamente). Os dados obtidos diferem dos da equipe de Pereira (2007), onde a adição de CLA não interferiu na taxa de produção de embriões, porém no experimento desta autora, havia a presença de SFB no meio de cultivo juntamente com a adição do CLA *trans-10*, *cis-12*.

A adição de catalase também interferiu negativamente na taxa de desenvolvimento embrionário. O efeito da catalase pode ter sido mascarado por sua inability de atravessar a membrana e portanto sua incapacidade de remover os peróxidos de hidrogênio produzidos pelo embrião (NARS-ESFAHANI, 1990). Segundo Vann Soom et al. (2002), os efeitos dos antioxidantes são muito influenciados pelas condições de cultura como a tensão de oxigênio e a composição dos meios, sendo os efeitos mais pronunciados em condições desfavoráveis, como em atmosfera de alta tensão de oxigênio e em meio TCM-199, já que o meio SOF, utilizado no nosso trabalho, apresenta diversos fatores que possuem capacidade antioxidante. Como observado por Guerin et al. (2001), o desequilíbrio do estado redox seja por excesso de ROS ou falta de antioxidante, pode levar ao bloqueio no desenvolvimento embrionário. E, a aplicação de catalase em baixa tensão de oxigênio pode ser desnecessária (ORSI; LESSE, 2001). Outro ponto em relação a catalase, é que utilizamos a catalase em todo o período de cultivo, ou seja, do D1 ao D8. Segundo Lim et al. (1999), quando o embrião bovino está entre estágio de 8-16 células, que é conhecido como o período do bloqueio embrionário, o embrião passa a sintetizar glutathione, e assim, pode-se supor que a adição de antioxidantes após 72 horas pode ter sido prejudicial ou tóxica em decorrência da redução excessiva dos níveis intracelulares de ROS. Rocha-Frigoni e colaboradores (2012) testaram a suplementação por todo o período e por apenas 72 horas (D1 a D3), e, os resultados obtidos de produção de embriões não diferiram dos demais grupos, sugerindo que a suplementação por todo o período de CIV no nosso trabalho possa ter prejudicado os resultados obtidos pelos grupos catalase e catalase + ácido linoleico.

Foi utilizada a coloração com Nile Red (GENICOT et al., 2005) para mensurar a quantidade de lipídios intracelulares presentes nos embriões. Embriões do grupo controle apresentaram maiores quantidades de lipídios que todos os grupos tratados. O LA é capaz de reduzir a quantidade de lipídios em diferentes tipos celulares atuando principalmente na redução da captação e da síntese de ácidos graxos (BAUMGARD et al., 2000; BROWN et al., 2001; PARIZA et al., 2001). Acredita-se que os mecanismos moleculares envolvidos na redução da síntese lipídica incluam uma diminuição coordenada na expressão de RNAm de importantes enzimas lipogênicas associadas às rotas de síntese de gordura (BAUMGARD et al., 2002; GERVAIS et al., 2009). Os dados obtidos corroboram com os da equipe de Pereira (2007, 2008) que observaram que a adição de CLA ao meio de cultivo *in vitro* proporcionou uma diminuição na quantidade de lipídios intracelulares presentes nos embriões. O grupo CAT também apresentou uma diminuição na quantidade de lipídios. Talvez um desequilíbrio no estado redox em um determinado momento do processo de cultivo *in vitro*, possa ter interferido em alguma via metabólica ou receptores de membrana responsáveis pela captação de lipídios e/ou na biodisponibilidade de lipídios pelos embriões.

Segundo Martin-Romero (2008) o próprio meio de cultivo pode ser a maior fonte de ROS durante a produção de embriões. Porém, a adição de antioxidantes para combater os efeitos deletérios do estresse oxidativo têm apresentado resultados muito contraditórios (IWATA et al., 1998; NARSESFAHANI et al., 1990; VAN SOON et al., 2002), sendo apenas satisfatório quando o sistema de cultivo adotado por si só é inadequado (HARVEY et al., 2007). Ainda não está definido se há necessidade da adição de antioxidantes em sistemas de cultivo em atmosfera com baixa tensão de oxigênio (ALI et al., 2003).

A sonda fluorescente H₂DCFDA é oxidada pelo peróxido de hidrogênio e outros peróxidos e indiretamente pelo ânion superóxido, proporcionando uma ferramenta confiável para avaliar a produção intracelular de ROS (DALVIT et al., 2005). Nos resultados apresentados neste trabalho, não houve diferença

significativa na quantidade de ROS apresentada entre o grupo controle e os 3 grupos tratados quando avaliamos os blastocistos expandidos. A adição de catalase não reduziu as ROS diferente dos resultados obtidos por outros autores (ALI et al., 2003; ROCHA-FRIGONI, 2012), onde pode ter ocorrido um excesso de antioxidante no sistema em algum momento do cultivo *in vitro* (do D1 ao D8).

Apesar da apoptose ser considerada um mecanismo endógeno benéfico para melhora da qualidade embrionária, uma alta incidência é associada com a redução da viabilidade embrionária (BYRNE et al., 1999). Uma forma de quantificação da apoptose é através da reação de TUNEL (*"in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP, Nick and labeling assay"*), que possibilita a detecção *in situ* de células apoptóticas pela marcação da fragmentação oligonucleossomal do DNA geradas pela atividade de DNAases endógenas durante o processo de apoptose (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002).

Quando foi analisado o número de células, o grupo suplementado com catalase não diferiu do grupo controle e LA, porém a mistura LA + CAT apresentou um menor número de células. Talvez a adição conjunta de ácido graxo e antioxidante tenha provocado uma possível alteração na quantidade de radicais livres em um dado momento do cultivo *in vitro* (que não foi observado na coloração com a sonda fluorescente, onde utilizamos apenas para a coloração blastocistos expandidos), e de acordo com Guérin et al. (2001), o acúmulo de radicais superóxido e H_2O_2 em blastocistos parece estar relacionado com maiores taxas de apoptose. No nosso trabalho, o grupo catalase apresentou maior porcentagem de células apoptóticas sugerindo que talvez a diminuição de radicais livres pelo excesso de antioxidante em dado momento do CIV possa ter gerado esse aumento. Lopes et al. (2010) afirmaram que concentrações fisiológicas de ROS, principalmente de H_2O_2 , atuam como moléculas sinalizadoras que podem influenciar em algumas funções celulares, como a produção de energia e proliferação no desenvolvimento inicial de embriões, diferenciação celular e expressão gênica,

sendo importante a manutenção do equilíbrio redox para que não levem ao estabelecimento de morte celular.

A criotolerância de embriões produzidos *in vitro* é afetada pelas condições estabelecidas durante o cultivo, indicando que o aumento ou a redução na sensibilidade ao congelamento podem estar associados às mudanças nas condições do cultivo e na quantidade de lipídios presentes nos embriões (PEREIRA; MARQUES et al., 2008). O mecanismo através do qual o acúmulo de lipídios nos embriões PIV influencia na criotolerância é desconhecido, porém a peroxidação dos lipídios poderia explicar essa diminuição (SEIDEL, 2006).

Quando avaliamos a taxa de re-expansão após os embriões serem reaquecidos, o grupo catalase não diferiu do controle na re-expansão imediata, às 3, 24 e 48 horas (eclosão). Porém a mistura catalase e ácido linoleico apresentou resultados superiores de re-expansão às 3, 24 e 48 horas, sendo que a taxa de eclosão às 48 horas foi estatisticamente igual ao grupo LA. Mesmo com a presença da catalase, a adição do LA resultou numa diminuição da quantidade de lipídios e isso pode ter refletido na melhora na taxa de sobrevivência embrionária. Portanto o grupo LA e o grupo LA + CAT apresentaram maiores taxas de sobrevivência embrionária pós reaquecimento. Nossos dados corroboram com os obtidos pela equipe de Pereira (2007, 2008) que relataram que a suplementação com LA diminuiu significativamente a quantidade de lipídios acumulados no citoplasma de blastocistos, e isso refletiu no aumento da sobrevivência após a criopreservação. Adicionalmente, a equipe de Hochi (1999) produziram mórulas bovinas mais resistentes à criopreservação adicionando ácido linoleico conjugado à albumina ao meio de cultivo *in vitro*. Os resultados de Accorsi (2008) e Tominaga et al. (2000) também reforçam os resultados obtidos neste trabalho, que observaram que a adição de LA ao meio de cultivo aumentou a taxa de sobrevivência pós reaquecimento.

Quando avaliamos a quantidade final de embriões viáveis (taxa de eficiência), podemos observar que o Grupo controle mesmo obtendo uma

maior taxa de desenvolvimento, apresentou 11,0% de eficiência (considerando embriões produzidos em D8 e a taxa de eclosão). Já o Grupo LA apesar de apresentar menor porcentagem de embriões produzidos que o controle, a taxa de eficiência ficou em 12,7%. Os Grupos CAT (9,4%) e CAT+LA (9,5%) apresentaram resultados menores de eficiência, mesmo o Grupo CAT+LA apresentou maior taxa de sobrevivência *in vitro* (taxa de eclosão). Os Grupos LA e controle apresentaram somente uma diferença numérica ($12,7\% \times 11\%$) na taxa de eficiência. Todavia, quando avaliamos as características morfológicas dos embriões (tanto antes como depois do processo de criopreservação), os embriões presentes no Grupo LA apresentavam melhor qualidade visual (de acordo com a classificação proposta pelo Manual IETS; WRIGHT, 2009). O ideal para avaliar a eficiência seria transferir embriões para receptoras sincronizadas e avaliar a taxa de prenhez de cada grupo, antes e após a criopreservação. Talvez com estes resultados, poderíamos avaliar de uma forma mais efetiva que a adição do ácido graxo é uma estratégia favorável para o sucesso de embriões que passarão pelo processo de criopreservação.

Em resumo, embriões tratados com ácido linoleico ou com ácido linoleico associado à catalase no cultivo *in vitro* na ausência de soro e baixa tensão de oxigênio apresentaram melhores taxas de sobrevivência pós reaquecimento. Estes resultados foram provavelmente gerados pela diminuição na quantidade de lipídios mas não por um aumento no número de células. A quantidades de espécies reativas de oxigênio não foram diferentes entre os grupos, e a adição de catalase não alterou essa quantidade. Talvez porque o sistema (meio SOF sem adição de SFB e atmosfera de baixa tensão de oxigênio) já fosse adequado e a adição de catalase tenha gerado um desequilíbrio no estado redox que acabou prejudicando o desenvolvimento dos embriões e, conseqüentemente, aumentando a taxa de células apoptóticas. Sendo assim, a hipótese mais provável é que o LA atue diminuindo a quantidade de lipídios presentes nos embriões e talvez modificando a composição dos lipídios de membranas, influenciando na sua fluidez, que é a

chave para um melhor desempenho dos embriões produzidos *in vitro* no processo de criopreservação.

IX CONCLUSÃO

A adição ácido graxo (LA) e ácido graxo associado a um antioxidante (catalase) no cultivo *in vitro* de embriões bovinos, na ausência de SFB e em atmosfera de 5%CO₂, 7%O₂ e 88% N₂, foi capaz de melhorar as taxas de sobrevivência pós vitrificação.

Contudo a escolha do antioxidante, o período de exposição do embrião ao antioxidante, e concentração adequada do antioxidante e do ácido graxo são imprescindíveis para que encontremos os melhores índices de aproveitamento de embriões produzidos *in vitro* e criopreservados.

X REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; VOS, P.L.A.M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B.A.J.; KNIJN, H.M.; VAANDRAGER, A.B.; HELMS, J.B.; GADELLA, B.M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.85, p. 62-69, 2011.
- ABD EL RAZEK, I.M.; CHARPIGNY, G.; KODJA, S.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; MERMILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C. Differences in lipids composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 53, 2000.
- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 193-202, 2003.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. 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 Development**, v. 61, p. 57-66, 2002.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* – matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos culture either in serum free medium or in serum supplemented medium. **Molecular Reproduction Development**, v. 53, p. 325-335, 1999.
- ACCORSI, M.F. **Avaliação de embriões bovinos cultivados *in vitro* na presença de ácidos graxos e sua sobrevivência pós-criopreservação**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 2008
- ADLER, V.; YIN, Z.; TEW, K.D.; RONAI, Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. **Oncogene**, v. 18, p. 6104-6111, 1999.
- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reproduction Biomed Online**, v. 9, p. 338-347, 2004.

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective. **Reproduction Biomed Online**, v. 11, p. 641-650, 2005.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 963-974, 2005.
- AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M.H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v.93, p.30-36, 2010.
- ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p.939-949, 2003.
- ARIAS, M.E.; SANCHEZ, R.; FELMER, R. Evaluation of different culture systems with low oxygen tension on the development, quality and oxidative stress-related genes of bovine embryos produced *in vitro*. **Zygote**, p.1-9, 2011.
- ASSUMPCAO, R.P.; SANTOS, F.D.; SETTA, C.L.; BARRETO, G.F.; MATTA, I.E.A.; ESTADELLA, D.; AZEREDO, V.B.; CARMO, M.G.T. Trans fatty acids in maternal diet may impair lipid biosynthesis in mammary gland of lactating rats. **Nutrition & metabolism**, v. 46, p. 169-175, 2002.
- BAIN, T.N.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.561-575, 2011.
- BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL JUNIO, G.E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 1406–1418, 2007.

BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, p. 179-184, 2000.

BAUNGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Effects of conjugates linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science** v. 80, p. 1285-1293, 2002.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryo: facts and artifacts. **Human Reproduction**, v. 1, p. 91-148, 1995.

BROWN, J.M.; HALVORSEN, Y.D.; LEA-CURRIE, Y.R.; GEIGERMAN, C.; MCINTOSH, M. *Trans-10,cis-12* but not *cis-9,trans-11*, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2316-2321, 2001.

BRUNNER,D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHOFF, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Serum-free cell culture: The sérum-free media interactive online database. **ALTEX – Alternatives to Animal Experimentation**, v. 27, p. 1-10, 2010.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 97-105, 1999.

CAAMAÑO, J.N.; RYOO, Z.Y.; THOMAS, J.A.; YOUNGS, C.R. β -Mercaptoethanol enhances blastocysts formation rate of bovine *in vitro*-matured/*in vitro*-fertilized embryos. **Biology Reproduction**, v.57, p.11791263, 1996.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v.3, n.1, p.19-28, 2006.

CHARPIGNY, G.; GUESNET, P.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; MERMILLOD, P.; HUMBLLOT, P. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. **Les Actes du Colloque BRG**, v. 4, p. 159-172, 2003.

CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M; DODE, M.A.N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.132-142, 2008.

DALVIT, G.C.; CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species in bovine embryo *in vitro* production. **Biocell**, v.29, p.209-212, 2005.

DIAS, V.S. **Influência do suplemento de macromoléculas a da atmosfera gasosa na maturação oocitária e competência no desenvolvimento embrionário bovino**. 2003. 83f. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

DIEZ, C.; LE BOURHIS, D.; HEYMAN, Y.; RENARD, JP. Effect of partial lipid removal from *in vitro* produced bovine zygotes on further development *in vitro* and on the freezing tolerance of blastocysts. **Theriogenology**, v. 45, p.166,1996.

DIEZ, C.; HEYMAN, Y.; LE BOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J.P. Delipidating *in vitro* produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v. 55, p. 923-936, 2001.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.J.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell-membranes – a demonstration using sperm as a model. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432-437, 1993.

DUMOULIN, J.C.; MEIJERS, C.J.; BRAS, M.; COONEN, E.; GERAEDTS, J.P.; EVERS, J.L. Effect of oxygen concentration on human *in vitro* fertilization and embryo culture. **Human Reproduction**, v. 14, p. 465-469, 1999.

EDIDIN, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. **Nature Review sMolecular Cell Biology**, v. 4, p. 414-418, 2003.

ELGEMAN, D.M. Membranes are more mosaic than fluid. **NATURE**, v. 438, p. 578-580, 2005.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. Ultrastructure of Bovine Blastocysts following Cryopreservation: Effect of Method of Blastocyst Production. **Molecular Reproduction Development**, v. 58, p. 186-195, 2001.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J.; A potencial role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular Reproduction Development**, v.73, p.1195-1201, 2006.

FERGUNSON, E.M.; LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 373-378, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas ao sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 1-16, 1997.

FEUGANG, J.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; SAYOUD, H.; REES, J.F.; PAMPFER, S.; MOENS, A. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote**, v.11, p.107-125, 2003.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, p.1203-1209, 1998.

FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S.; NISHIMURA, K.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on *in vitro* development of *in vitro*-produced bovine embryos. **Journal Animal Science**, v. 75, p. 483-489, 1997.

GENICOT, G.; LEROY, J.L.M.R.; VAN SOOM, A.; DONNAY, I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 1181-1194, 2005.

GERVAIS, R.; MCFADDEN, J.W.; LENGI, A.J.; CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y. Effects of intravenous infusion of trans-10,cis-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 5167-5177, 2009.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J.N.; HIDALGO, C.O.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v.69, p.1013-1021, 2008.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryo cultured *in vitro*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.15, p.69-75, 1993.

GUERIN, P.; MOUATASSIN, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p. 175-189, 2001.

GUR, M.I.; HARWOOD, J.L. Lipid biochemistry: an introduction. London: Chapman and Hall, p. 406, 1991.

GUTIÉRREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryo. **Theriogenology**, v. 15, p. 1117-1126, 2001.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.231-255, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3ed. Press: New York: Oxford University, 1999, p. 936.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C.E. Review article: free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, p.598-620, 1992.

HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.113-128, 2007.

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro*-produced bovine morulae.

Theriogenology, v. 52, p. 497-504, 1999.

IMAI, K.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. **Theriogenology**, v.64, n.10, p.887-891, 2002.

IMAI, K.; KOBAYASHI, S.; GOTO, Y.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Cryopreservation of bovine embryos obtained by *in vitro* culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. **Theriogenology**, v. 47, p. 347, 1997.

IWATA, H.; AKAMATSU, S.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology**, v.50, p.365-375, 1998.

JUCHEM, S.O.; CERRI, R.L.A.; VILLASEÑOR, M.; GALVÃO, K.N.; BRUNO, R.G.S.; RUTIGLIANO, H.M.; DEPETERS, E.J.; SILVESTRE, F.T.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.55–62, 2010.

KEFER, J.C.; AGARWAL, A.; SABANEKH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. **Introduction Journal Urology**, v. 16, 449-457, 2009.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. **Biology Reproduction**, v. 62, p. 847-856, 2000.

KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, p. 131-138, 2001.

KIM, K.S.; KANG, J.K.; KIM, H.S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and pre-incubation before insemination on development capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.47, p.881-891, 1997.

- KIM, Y.M.; UHM, S.J.; GUPTA, M.K.; YANG, J.S.; LIM, J.G.; DAS, Z.C.; HEO, Y.T.; CHUNG, H.J.; KONG, I.K.; KONG, I.K.; LEE, H.T.; KO, D.H. Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. **Theriogenology**, V. 78, p. 1085-1093, 2012.
- KITAGAWA, Y.; SUZUKIB, K.; YONEDAA, A.; WATANABEA, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1186-1283, 2004.
- KNIJN, H.M.; GIORRET, J.O.; VOS, P.L.; HENDRIKSEN, P.J.; VAN DER WEIJDEN, B.C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S.J. Consequences of *in vivo* development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biology Reproduction**, v.69, p.1371-8, 2003.
- LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, N.M. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.81-94, 1993.
- LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; FIALHO, S.S.; SALIBA, W.P.; ALVIM, M.T.T.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Fetal calf sérum enhances *in vitro* production of *Bos Taurus indicus* embryos. **Theriogenology**, v. 75, p. 429-433, 2011.
- LEROY, J.L.M.R.; GENICOT, G.; DONNAY, I.; VAN SOOM, A. Evaluation of the lipid content in bovine oocytes and embryos with Nile red: a practical approach. **Reproduction Domestic Animal**, v.40, p.76-78, 2005.
- LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of *in vitro*-derived bovine embryos cultured in 5% de CO₂ in air ou in 5% O₂, 5% de CO₂ and 90% N₂. **Human Reproduction**, v.14, n.2, p.458-464, 1999.
- LIU, L.; TRIMARCHI, J.R.; NAVARRO, P.; BLASCO, M.A.; KEEFE, D.L. Oxidative stress contributes to arsenic-induced Telomere sttrition, chromossome instability and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 26, p. 31998-32004, 2003.

- LOMBARDO, Y.B.; CHICCO, A.G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. Review. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.17, p.1-13, 2006.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137-152, 2006.
- LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M.P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, n. 1, p.159-167, 1999.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FARIN, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction Domestic Animal**, v.38, p.259-267, 2003.
- LOPES, A.S.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization in cell cleavage in bovine zygotes. **Human Reproduction**, v.25, p. 2763-2772, 2010.
- MARTÍN-ROMERO, F.J. Contribution of culture media to oxidative stress and its effects on human oocytes. **Reproductive Biomedicine Online**, v.17, p.652-661, 2008.
- MASSIP A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction Domestic Animal**, v. 36, p. 49- 55, 2001.
- MASSIP A.; MERMILLOD, P.; DINNYES, A. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 10, n. 11, p. 3004- 3011, 1995.
- McEVOY, T.G.; ROBINSON, J.J.; SINCLAIR, K.D. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. **Reproduction**, v. 122, p. 507-518, 2001.
- MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.; MULLAART, A.P.; DE RUIGH, L.; VOS, P.L.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial

application of embryo technologies in the cattle breeding industry.

Theriogenology, v.59, p.651-674, 2003.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA E SILVA, A.A. The effect of sérum on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. **Journal of Medical and Biologycal Research**, v. 28, p.213-217, 1995.

NAGAO, Y.; LIJIMA, R.; SAEKI, K. Interaction between embryos and culture conditions during *in vitro* development of bovine early embryos. **Zygote**, v. 16, p. 127-133, 2008.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R.J.; GRUPEN, C.G.; NOTTLEN, M. Cryopreservation of porcine embryos. **Nature**, v. 374, p. 416,1995.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R.J.; GRUPEN, C.G.; SEAMARK, R.F.; NOTTLEN, M. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 113- 118, 1994.

NARS-ESFAHANI, M.H.; JOHNSON, M.H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. **Development**, v.113, p.551-611, 1991.

NARS-ESFAHANI, M.H.; AITKEN, J.R.; JOHNSON, M.H. Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stages embryos developed *in vitro* or in vivo. **Development**, v.109, p.501-508, 1990.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.

ORSI, N.M.; LEESE, H.J. Protection against reactive oxygen species during mouse preimplantation embryo development: role of EDTA, oxygen tension, catalase, superoxide dismutase and pyruvate. **Molecular Reproduction Development**, v. 59, n.1, p. 44-53, 2001.

- PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, E.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 2, p. 127-149, 1996.
- PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 283-298, 2001.
- PARK, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.
- PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169-77, 2002.
- PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, v. 9, p. 267-277, 2008.
- PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTA, P.V.; BESSA, R.J.B.; MARQUES, C.C. Post-thawing resistance of bovine embryos is improved by *trans-10;cis-12* conjugated linoleic acid (CLA). **Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction**, Porto Seguro, Bahia, Brasil, 2004.
- PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 293-301, 2007.
- PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans10, cis12* conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 322-332, 2008.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 101-106, 1994.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 287, 1993.

REIS, A.; MACCALLUM, G.J.; MCEVOY, T.G. Accumulation and distribution of neural lipid droplets is non-uniform in ovine blastocysts produced *in vitro* in either the presence or absence of serum. **Reproduction Fertility Development**, v. 17, p. 815-823, 2005.

REIS, A.; ROOKE, J.A.; McCALLUM, G.J.; EWEN, M.; STAINES, M.E.; LOMAX, M.A. Fatty acid content of polar and neutral lipids from bovine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of serum. **Reproduction**, v. 30, 2003.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v. 62, p. 320-322, 2002.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v.56, p.1-16, 2001.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryos development and quality. **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, p. 44-50, 2008.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or the absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology Reproduction**, v. 68, p.236-243, 2003.

ROCHA-FRIGONI, N.A. **Efeitos de antioxidantes e da atmosfera gasosa em diferentes etapas da produção *in vitro* sobre o desenvolvimento e**

criotolerância de embriões bovinos. 2012. 85f. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

ROCHA-FRIGONI, N.A.; LEÃO, B.C.; NOGUEIRA, E.; ACCORSI, M.F.; MINGOTI, G.Z. Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture. **Zygote**, v. 16, p. 1-10.

RUBINSKY, B. Principles of low temperature cell preservation. **Heart Failure Review**, v. 8, p. 277-284. 2003.

SANTOS, J.E.P.; BILBY, T.R.; THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; SILVESTRE, F.T. Long Chain Fatty Acids of Diet as Factors Influencing Reproduction in Cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v.43, p.23–30, 2008.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, p. 1-19, 2011.

SATA, R.; TSUJII, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOCHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing médium during early embryonic development. **Journal Reproduction Development**, v. 45, p. 97-103, 1999.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of *n*-3 and *n*-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 147-155, 2008.

SEIDEL JR, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, 228-235, 2006.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fine structure of bovine blastocyst developed either in serum free medium or in conventional co-culture epithelial cells. **Journal of Veterinar Medicine**, v. 41, p. 307-316, 1994.

SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, F.F.; NELSON, D.R.; THOMAS JUNIOR, A.J.; AGARWAL, A. The reactive oxygen species – total antioxidants capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, v. 14, n. 11, p. 2801-2807, 1999.

SOMFAI, T.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; NAKAI, M.; OZAWA, M.; KASHIWAZAKI, N.; EBERSZEGI, I.; RATKY, J.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K.

Production of good-quality porcine blastocysts by *in vitro* fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, v. 73, p. 147-156, 2010.

STROUD, B. The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. **IETS Newslet**, v. 50, p. 16-25, 2012.

STROUD,B.; BO, G.A. Estatísticas Mundiais de 2009 para Transferência Embrionária em Animais Domésticos de Fazenda, Resumo do Relatório da Comissão de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional para Transferência de Embriões (IETS). **Anais da XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Agosto, 2011.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochimica and Biophysica Acta: reviews on biomembranes**, v. 779, p. 89-137, 1984.

STURMEY, R.G.; HAWKHEAD, J.A.; BARKER, E.A.; LEESE, H.J. DNA damage and metabolic activity in the preimplantation embryo. **Human Reproduction**, v.1, p.81-91, 2008.

STURMEY, R.G.; REIS, A.; LEESE, H.J.; MCEVOY, T.G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, p.50–58, 2009.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.O.; CROCOMO, L.F.; LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, p. 1211-1220, 2011.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; DA SILVA RASCADO, T.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.; JUNIOR, A.M.; MACHADO, R.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. **Zygote**, v.11, p. 1-8, 2012.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage *in vitro*

cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, v. 54, p. 137-145, 2000.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; OKAMURA, N.; TAKAHASHI, H.; OKANO, A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology Reproduction**, v.66, p.562-569, 2002.

TARIN, J.J.; TROUNSON, A. O. Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos. **Biology Reproduction**, v.49, p.1362-1368, 1993.

THOMPSON, J.G.; PETERSON, A.J. Bovine embryo culture *in vitro*: new developments and post-transfer consequences. **Human Reproduction**, v.15, p.59-67, 2000.

THOMPSON, J.G.E.; SIMPON, A.C.; PUGH, P.A; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **Journal Reproduction Fertility**, v.89, p.573-578, 1990.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T.; ARIYOSHI, T. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of *in vitro*-produced bovine embryos at the 16 cell stage. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 62, N. 4, p. 465-467, 2000.

USHIJIMA, H.; YAMAKAWA, H.; NAGASHIMA, H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biology Reproduction**, v.60, p. 534-539, 1999.

VAJTA, G.; HYTELL, P.; CALLESEN, H. Morphological changes of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification, in straw direct reydration, and culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, n. 1, p. 9-17, 1997.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T.T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 52, p. 939-48, 1999.

- VALLKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. et al., toxicity and oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1161-1208, 2005.
- VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tension with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v. 57, p. 1453-1465, 2002.
- WAHLE, K.W.; ROTONDO, D.; HEYS, S.D. Polyunsaturated fatty acids and gene expression in mammalian systems. **Proceeding of the Nutrition Society**, v. 62, p. 349-360, 2003.
- WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, n.6, p.1272-1277, 2002.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.J.R.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 998-901, 2001.
- WRIGHT, J.M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade internacional de Transferência de Embriões**, 4 edição, p. 165-168, 2009.
- YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEEREN, A.; KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.59, p.1585-1596, 2003.
- ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O.; BOROCHOV, A.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, p. 447-454, 2001.

CAPÍTULO II

ARTIGO CIENTÍFICO**REDUCTION IN CYTOPLASMIC LIPID CONTENT IN BOVINE EMBRYOS
CULTURED *IN VITRO* WITH LINOLEIC ACID IN SEMI-DEFINED MEDIUM IS
CORRELATED WITH INCREASES IN CRYOTOLERANCE**

*Mônica F. Accorsi¹, Beatriz Caetano da Silva Leão^{1,2}, Natália Alves de Souza
Rocha-Frigoni^{1,2}, Silvia Helena Venturoli Perri¹, Gisele Zoccal Mingoti^{1,2*}*

*All correspondence to: G.Z. Mingoti, School of Veterinary Medicine, Department of Animal Health, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 16050-680, São Paulo, Brazil. Tel: +55 18 3636 1375; fax: +55 18 3636 1352; E-mail: gmingoti@fmva.unesp.br

¹ School of Veterinary Medicine, Laboratory of Reproductive Physiology, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP 16050-680, Brazil

² School of Agrarian and Veterinarian Sciences, Department of Animal Reproduction, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP 16050-680, Brazil

Running title: Linoleic Acid and Cryotolerance of Bovine Embryos

maccorsi@hotmail.com beatriz_csl@yahoo.com.br naniasrocha@hotmail.com
shvperri@fmva.unesp.br gmingoti@fmva.unesp.br

SUMMARY

This study tested the hypothesis that culturing bovine embryos *in vitro* with linoleic acid (LA) in medium free of fetal calf serum (FCS) will reduce lipid accumulation and improve cryosurvival after vitrification. We first tested the effects on embryo development resulting from addition of different sources of macromolecules [undefined: FCS, or semi-defined: bovine serum albumin (BSA)] to the *in vitro* maturation (IVM) media [(TCM199 with 10% (v/v) FCS or 8 mg/ml fraction fatty acid-free BSA (FAF-BSA)] or to the embryonic *in vitro* culture (IVC) media [SOF with 8 mg/ml FAF-BSA or with 4 mg/ml FAF-BSA + 2.5% FCS (v/v)]. Blastocyst rates at Day-7 of IVC differ among treatments ($P < 0.05$), being higher when media were supplemented with FCS during both IVM and IVC (26.7%), intermediate when medium was supplemented with FCS during IVM and BSA during IVC (16.8%) and lower when media were supplemented with BSA during IVM and IVC (5.8%). In the second experiment, the effect of LA (100 μ M) during IVC has been tested and we opted to replace FCS by BSA only during IVC, aiming the maintenance of high levels of embryo production, which could be consistent with commercial production. We found that culturing *in vitro*-produced embryos in semi-defined medium supplemented with LA leads to a reduction ($P < 0.05$) in the rate of embryo development to the blastocyst stage (Control: 25.8% vs LA: 18.5%). On the other hand, the proposed system was effective in promoting the decrease ($P < 0.05$) in the intracellular lipid content (Control: 24.6 ± 0.7 vs LA: 27.3 ± 0.7), consequently increasing ($P < 0.05$) the rate of *in vitro* embryo survival after 24h of culture post-warming (Control: 50.0% vs LA: 71.7%). The present results question the commonly used criteria to evaluate the efficiency of an IVP system specifically with relation to the maximum number of blastocyst produced and suggest that might be more appropriate to establish a suitable culture system that could improve the desired characteristics of embryos generated according to the specific purpose of commercial or scientific utilization.

Keywords: Bovine embryo, Vitrification, *In Vitro* Production, Linoleic Acid; Lipid.

INTRODUCTION

The *in vitro* culture (IVC) systems used for embryo production still do not reach the level of effectiveness obtained *in vivo* (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001). In several studies involving *in vitro* production (IVP) of cattle embryos, better results were obtained when undefined or semi-defined macromolecules of animal origin are used (RIZOS et al., 2003). Among them, the most common supplements are bovine serum albumin (BSA) and fetal calf serum (FCS). These supplements supply the medium with growth factors, hormones, amino acids and proteins, which are beneficial to embryonic development (GÓMEZ et al., 2008). On the other hand, the use of these macromolecules has been associated with several abnormalities on the oocyte and embryo physiology, such as changes in cell organelles, altered patterns of gene expression (LONERGAN et al., 2003), changes in the cellular metabolism (REIS et al., 2005; RIZOS et al., 2008) and changes in the fluidity and function of the plasma membrane (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2003). In addition, bovine embryos cultured in serum-containing medium tend to present an excessive accumulation of cytoplasmic lipid droplets and fatty acid content when compared to those cultured in serum-free media (ABE et al., 2002; PEREIRA et al., 2008; REIS et al., 2003; STURMEY et al., 2009). While triacylglycerols represent 40-50% of the total lipid mass of *in vivo* produced bovine embryos, they can reach 88% in *in vitro* embryos (CHARPIGNY et al., 2003).

The excessive lipid content in *in vitro* produced embryos has been associated to their high susceptibility to cryopreservation (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2002, 2003; SUDANO et al., 2011). Although the mechanisms that lead to this lipid accumulation remain unclear, it occurs as a result of FCS supplementation in culture media or abnormalities in energy metabolism. In order to avoid the detrimental effects of embryonic lipids accumulation, some strategies have been proposed, such as the full withdrawal of serum from the *in vitro* culture media (LIM et al., 2007), the addition of antioxidants (GUPTA et al.,

2010) or molecules capable of modulating the molecular mechanisms of lipid uptake, such as the linoleic acid (TOMINAGA et al., 2000), and the use of inhibitors of fatty acid synthesis (SUDANO et al., 2011). These strategies are an attempt to change the embryos themselves to make them more cryotolerantes (SEIDEL JR., 2006), which can be considered the best approach to increase the success of cryopreservation.

One of the biologically active substances capable of modulating these molecular mechanisms is the linoleic acid (LA), which is a polyunsaturated fatty acid (PUFA) of the omega-6 family and is so-called essential because it cannot be synthesized by organisms (SCHMITZ; ECKER, 2008). PUFAs act as important regulators of cellular functions in the formation of membranes, gene expression, cell adhesion and proliferation, intra- and intercellular transport, and the correct functioning of the immune system and inflammation (WAHLE et al., 2003).

It was previously reported that ninety-five percent of those fatty acids present in the culture media of IVP are metabolized by oocytes and embryos (AARDEMA et al., 2011). Inside the cells, fatty acids can be oxidized to generate energy, can be stored as triglycerides and can be used in the synthesis of plasma membrane (SCHMITZ; ECKER, 2008). The incorporation of PUFAs in the phospholipid bilayer of the plasma membrane alters its fluidity and is one mechanism by which fatty acids may interfere with cellular metabolism (JUCHEM et al., 2010). Moreover, according to previous reports, the addition of LA to serum-containing media reduces embryo lipid accumulation during *in vitro* culture and improves cryopreservation survival (PEREIRA et al., 2007, 2008). However, to our knowledge, LA has never been tested in IVP systems for embryo production without FCS.

Thus, our objective was to test the hypothesis that culturing bovine embryos *in vitro* with LA in medium free of FCS will reduce lipid accumulation and improve cryosurvival after vitrification.

MATERIAL AND METHODS

REAGENTS AND MEDIA

Chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), unless otherwise stated. The medium for *in vitro* maturation (IVM) consisted of tissue culture medium (TCM)-199 (Gibco®, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) supplemented with macromolecule [10% (v/v) FCS (Gibco®, Invitrogen Co.) or 8 mg/ml fraction fatty acid-free BSA], 0.2 mM sodium pyruvate, 25 mM sodium bicarbonate, 50 µg/ml amikacin, 0.5 µg/ml FSH (Pluset®; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brazil), and 100 IU/ml hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil). IVF medium consisted of Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) previously described by (PARRISH et al., 1988), containing 0.2 mM Na-pyruvate, 6 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), 25 mM sodium bicarbonate, 13 mM Na-lactate, 50 µg/ml amikacin, 40 µl/ml PHE solution (1 mM hypotaurine, 2 mM penicillamine and 250 µM epinephrine) and 10 µg/ml heparin. Embryo culture (IVC) medium consisted of modified synthetic oviductal fluid (SOF) previously described by (VAJTA et al., 1999), supplemented with 50 µg/ml amikacin and macromolecule [8 mg/ml fraction fatty acid-free BSA or 4 mg/ml fraction fatty acid-free BSA + 2.5% FCS (v/v)].

OOCYTE COLLECTION AND MATURATION

Bovine oocytes from slaughtered cows were obtained in a local abattoir and transported to the laboratory. Intact cumulus–oocyte complexes were aspirated from antral follicles (2–8 mm in diameter). Oocytes with at least four layers of cumulus cells were selected for the experiments. Oocytes were washed and cultured in 500 µl of IVM medium (50 oocytes per well) in a 4-well dish (Nunc®, Nunclon Delta Treated 4-Well IVF Dish, Denmark), without

mineral oil covering. Culture was carried out during 22 h, at 38.5°C under an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity.

SPERM SEPARATION AND *IN VITRO* FERTILIZATION

Motile spermatozoa were obtained by centrifugation of frozen–thawed semen on a Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Uppsala Country, Sweden) discontinuous density gradient (250 µl of 45% Percoll over 250 µl of 90% Percoll, in a 1.5 ml microtube) for 5 min at 2500 *g* at room temperature. The supernatant was discarded and the spermatozoa were counted on a haemocytometer and then resuspended in IVF medium to obtain a final concentration of 2×10⁶ cells/ml. Finally, 4 µl of the sperm suspension were added to each 90 µl droplet. Oocytes (25 per droplet) and sperm were co-incubated for 18 h under the same temperature and atmosphere conditions used for IVM. The day of fertilization was defined as Day 0.

EMBRYO CULTURE

Following fertilization, the presumptive zygotes were stripped from cumulus cells via vortex and randomly assigned to the different culture systems. They were transferred to 500 µl of SOF medium (50 oocytes per well) in a 4-well dish (Nunc®, Nunclon Delta Treated 4-Well IVF Dish, Denmark), without mineral oil covering. Embryos were cultured inside a plastic bag (low-density polyethylene, LDPE) at 38.5°C and gaseous mixture of 5% CO₂, 7% O₂ and 88% N₂, in a humidified atmosphere, without cumulus cells. Humidification in the plastic bag was achieved by filling a 10-cm plastic plate with 5 ml of sterile water that was introduced inside the bag. The gazing procedure was performed by filling the plastic bag with the gas mixture and then by closing the system with heat sealing. All culture systems were kept inside the water jacketed CO₂ incubator during the entire culture period, except for cleavage assessment.

Zygotes were incubated up to 72 hours post-insemination (hpi) for assessment of cleavage rates under stereoscopic microscopy (at a magnification of 40×). Blastocyst development rates were recorded at Day 7 (168 hpi) and at Day 8 of IVC (192 hpi).

QUANTIFICATION OF INTRACELLULAR REACTIVE OXYGEN SPECIES BY DICHLOROFLUORESCEIN ASSAY

Intracellular reactive oxygen species [ROS: hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$), and peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$)] levels in Day 7 blastocysts were quantified using the fluorescent probe 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA ; Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA). The H_2DCFDA probe is oxidized directly by H_2O_2 , its derivatives and other peroxides, and is also oxidized indirectly by the superoxide anion, thus providing a reliable tool to assess the intracellular ROS production (GOMES et al., 2006). A stock solution of H_2DCFDA dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) to a working concentration of 5 μM (BAIN et al., 2011). Embryos were washed twice in PBS and placed into a 24-well cell culture cluster (Costar®) containing 500 μl of 5 μM H_2DCFDA . Embryos were incubated at 38.5°C in a dark, humidified 5% CO_2 atmosphere for 30 min. Stained embryos were washed twice with fresh PBS and imaged immediately using an Olympus, IX51 inverted microscope running image Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26), at excitation wavelength of 495 nm and emission wavelength of 520 nm to quantify the fluorescent signal intensities (pixels). The background signal intensity was subtracted from the measured values of the treatment micrographs. The results were expressed in arbitrary units of fluorescence.

QUANTIFICATION OF INTRACELLULAR LIPID CONTENT BY NILE RED STAINING

The intracellular lipid content of single Day 7 blastocysts was quantified using the fluorescent probe Nile red. Staining was performed according to Genicot et al. (2005), with some modifications. Briefly, embryos were fixed during 1 h in 1 ml of 3.7% paraformaldehyde and 10% triton X-100 solution. Then, they were transferred to plates containing 1 ml of a 10 µg/ml Nile red solution dissolved in physiological saline (0.9% NaCl) with 1 mg/ml polyvinylpyrrolidone. Embryos were stained during 3 h in the dark and at room temperature. Stained embryos were washed twice with fresh PBS and imaged immediately using an Olympus, IX51 inverted microscope running image Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) to quantify the fluorescent signal intensities (pixels). The background signal intensity was subtracted from the measured values of the treatment micrographs. The results were expressed in arbitrary units of fluorescence.

TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE dUTP NICK-END LABELLING

The terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL) assay was performed using the *In Situ* Cell Death Detection Kit (Fluorescein; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), as described previously (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Briefly, Day 7 blastocysts were washed three times in 100-ml drops of PBS with 1 mg/ml polyvinylpyrrolidone (PBS-PVP) and fixed in 100-ml drops of 4% (w/v) paraformaldehyde solution for 1 h at room temperature. Afterwards, embryos were incubated in a permeabilisation solution (0.5% v/v triton X-100 and 0.1% w/v sodium citrate) for 30 min at room temperature. After washing three times in PBS-PVP, the positive control was incubated in a 50-ml drop of DNase I (50 IU/ml), whereas embryos from the experimental groups were incubated in 100-ml drops of PBS-PVP in the dark in a humidified chamber for 1 h at 37°C. Subsequently, embryos were washed twice in PBS-PVP and incubated in 15 µl TUNEL reaction mixture (proportion of 1:9, enzymatic and label solution) for 1 h in a

humid chamber at 37°C in the dark. The negative control was incubated in 15 µl containing labeled solution only. Following the TUNEL reaction, embryos were washed twice in PBS-PVP and stained with Hoechst 33342 (1 µg/ml) for 30 min at room temperature. After washing with PBS-PVP, embryos were transferred to glass slides with mounting glycerol and observed under an epifluorescence inverted microscope (IX51; Olympus) at excitation and emission wavelengths of 510 and 590 nm, respectively. Nuclei with green–yellow fluorescence were considered TUNEL positive (fragmented DNA), whereas blue fluorescence (Hoechst 33342) indicated the total number of cells. To avoid considerable variability in the number of cells, only early blastocysts and blastocysts were stained for TUNEL.

VITRIFICATION, WARMING AND SUBSEQUENT CULTURE OF EMBRYOS

All the materials used for vitrification/thawing procedures were supplied from Ingámed Ltda (Perobal, PR, Brazil), including the vitrification solutions (VI-I and VI-II), the thawing solutions (DV-I, DV-II and DV-III), the vitrification strips (Vitri-Ingá) and their plastic sheaths. A two-step technique was used for vitrification of blastocysts. Briefly, expanded blastocysts (grades 1 and 2) were washed twice in holding medium (SOF supplemented with 250 mM of HEPES and 20% of FCS) and transferred to VI-I for 5 min at 37.0°C. Then, embryos were transferred to a 10 µl drop of VI-II for 60 s at room temperature. Afterwards, embryos were placed into the hole in the tip of a Vitri-Ingá strip with a minimum amount of vitrification solution, and then directly immersed in liquid nitrogen (N₂). The plastic sheaths, which had been previously cooled in N₂ liquid vapor for 1 min, were vertically immersed into N₂ liquid. The Vitri-Ingá strip was then inserted into plastic sheaths for safe storage.

For thawing procedures, Vitri-Ingá strips were withdrawn from the liquid N₂ and transferred to thawing solution DV-I for 1 min, at 37.0°C. After that, embryos were transferred to DV-II for 3 min at room temperature and washed twice in DV-III, for 5 min each. Then, embryos were washed twice and cultured

in SOF supplemented with 2.5% of FCS and 5 mg/ml of BSA in saturated humidity and an atmosphere of 5% CO₂ in air, up to 48 h. The re-expansion rates were assessed immediately after thawing and after 24 h of culture, and hatching was recorded after 48 h.

EXPERIMENTAL DESIGN

In all the experiments, the oocytes were matured *in vitro* for 22 h, as described above. The oocytes were then inseminated and the presumptive zygotes were stripped from their cumulus cells and cultured inside a plastic bag filled with a gaseous mixture of 5% CO₂, 7% O₂ and 88% N₂. The experiments were replicated at least five times.

Experiment I - The effects of macromolecule supplementation during different moments of the in vitro culture system on the development of IVP bovine embryos

In this experiment, the effects on embryo development resulting from addition of different sources of macromolecules to the *in vitro* maturation media or to the embryonic culture media during the entire 7-day IVC period were evaluated. Our objective was to evaluate the effect of replacing FCS by BSA at different stages of IVP, aiming the maintenance of high levels of embryo production, consistent with commercial production. Oocytes ($n = 803$, in 5 replicates) were matured in TCM199 supplemented with 10% (v/v) FCS or 8 mg/ml fraction fatty acid-free BSA. Following IVM and IVF, the presumptive zygotes were transferred to IVC medium (SOF) supplemented with 8 mg/ml fraction fatty acid-free BSA or with 4 mg/ml fraction fatty acid-free BSA + 2.5% FCS (v/v). Three treatments were evaluated: 1) FCS (MIV) / BSA+FCS (CIV); 2) FCS (MIV) / BSA (CIV); 3) BSA (MIV) / BSA (CIV). On day 7 of culture, the embryo development to the blastocyst stage was evaluated.

Experiment II - The effects of linoleic acid supplementation during in vitro culture on the development, lipid content, intracellular ROS levels and cryotolerance of IVP bovine embryos cultured in serum-free media during IVC

In this experiment, the effects on embryo development, cryotolerance, intracellular lipid content and the production of intracellular ROS resulting from LA addition to the semi-defined culture media during IVC were assessed. The

macromolecular supplementation of media was chosen based on the results of the Experiment I. Then, oocytes ($n = 3100$, in 30 replicates) were matured in TCM199 supplemented with 10% (v/v) FCS. Following IVF, the presumptive zygotes were transferred to IVC medium (supplemented with 8 mg/ml fraction fatty acid-free BSA) that lacked LA supplementation (Control group) or that had been supplemented with 100 μM of LA, whose concentration was previously established by Pereira et al. (2007). The embryos were then cultured until day 7, when their development to the blastocyst stage was evaluated. The intracellular ROS levels of the blastocysts and early blastocysts were quantified using the H_2DCFDA assay and the intracellular lipid content was quantified using the Nile Red fluorescent probe. The TUNEL assay was performed in early blastocysts to evaluate the rates of apoptosis. The expanded blastocysts were vitrified and, after warming, the re-expansion rates and hatching were evaluated following 24 h and 48 h of IVC, respectively.

STATISTICAL ANALYSIS

Within each replicate, one well of a cell culture plate with 50 oocytes was considered the experimental unit for each group. Blastocyst production rates were estimated considering the total number of oocyte in each maturation well.

Data were analysed with ANOVA, using the general linear model (GLM) procedure with the SAS statistical software package 9.0 (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). The arcsine transformation was applied to percentage data. If the ANOVA was significant, the means were compared by a Tukey's test. The comparative study between binomial variables was evaluated by Chi-square. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$. A P value between 0.051 and 0.1 was considered as tendency.

RESULTS

EXPERIMENT I

The effects of supplementation with different macromolecules (BSA and/or FCS) at different times during *in vitro* production on embryonic development to the blastocyst stage are shown in Table 1. Blastocyst rates differ among all treatments ($P < 0.05$), being higher in the treatment FCS (MIV) / BSA+FCS (CIV) (26.7% and 30.2%, respectively in Days 7 and 8 of IVC), intermediate in the treatment FCS (MIV) / BSA (CIV) (16.8% and 21.3%, respectively in Days 7 and 8) and lower in the treatment BSA (MIV) / BSA (CIV) (5.8% and 10.0%, respectively in Days 7 and 8).

EXPERIMENT II

The effects of supplementation with LA on the cleavage and blastocyst rates are given in Table 2. There was no effect ($P > 0.05$) of LA supplementation on cleavage rates (72.7% vs 74.1%, respectively for Control and LA groups). However, embryonic development to the blastocyst stage was higher ($P < 0.05$) in the Control group (25.8% and 30.7%, respectively in Day 7 and Day 8) compared to LA group (18.5% and 22.4%, respectively in Day 7 and Day 8). Nevertheless, although we have not made a morphological classification of the embryos, it was noted that blastocysts from the LA group showed higher morphological quality (according to the IETS Manual; Wright, 2009; data not shown).

Regarding the results of the mean fluorescence intensity of bovine embryos after Nile red staining (Table 3), we found a significant reduction ($P < 0.05$) in intracellular lipid content in LA group (27.3 ± 0.7) compared to Control group (24.6 ± 0.7).

Intracellular ROS levels (Table 4), expressed as arbitrary units of fluorescence, were unaffected ($P > 0.05$) in the LA group (3.1 ± 0.2) compared to Control (2.7 ± 0.2).

The effects of LA supplementation during IVC on the total number of cells and the percentage of apoptotic cells are given in Table 5. There was no significant difference ($P > 0.05$) among groups with respect to the total number of cells in Day 8 blastocysts (114.9 ± 5.5 and 107.5 ± 5.3 , respectively for Control and LA groups) or the percentage of apoptotic cells (1.8 ± 0.2 and 2.0 ± 0.3 , respectively for Control and LA groups).

The re-expansion rates of blastocysts after warming are shown in Table 6. There was no difference ($P > 0.05$) among groups immediately after warming (59.5% and 63.0%, respectively for Control and LA groups). However, supplementation with LA during IVC resulted in a higher ($P < 0.05$) rate of *in vitro* embryo survival (71.7%) compared to the Control (50.0%) after 24h of culture post-warming. The hatching rate after 48h of culture was similar among groups (35.7% and 56.5%, respectively for Control and LA groups), but there was a tendency of obtaining higher hatching rate for LA group ($P = 0.0577$).

Aiming to evaluate the efficiency of the proposed system of IVP embryo culture for commercial purposes, we estimated the success rate by calculating the expected number of surviving (re-expanded) embryos after warming based on the total number of oocytes matured for each treatment. The estimated data were analysed by Chi-square and results are presented in Figure 1. Based on this estimation, the success rate (% of expected viable blastocysts after warming) immediately after warming was higher ($P < 0.05$) in Control group (18.3%) than in LA group (14.1%), but were similar ($P > 0.05$) between groups after 24 h of culture post-warming (15.4% and 16.0%, respectively for Control and LA groups). Similarly, the success rate of hatching expected after 48 h of culture post-warming was similar ($P > 0.05$) between groups (11.0% and 12.7%, respectively for Control and LA groups).

DISCUSSION

To avoid the excessive accumulation of cytoplasmic lipid droplets and fatty acid content in *in vitro*-produced bovine embryos, which has deleterious effects on their cryotolerance, strategies that have been applied include the full withdrawal of serum from the *in vitro* culture media (LIM et al., 2007) or the supplementation with PUFAs during the *in vitro* culture, like LA (HOCHI et al., 1999; TOMINAGA et al., 2000). However, it is unclear whether LA supplementation during embryo culture in serum-free medium is necessary and whether LA will affect the embryonic development in this condition.

Some studies have reported positive effects of oocyte and/or embryo culture in serum-free media (ABE et al., 2002; LIM et al., 2007; PEREIRA et al., 2007, 2008; REIS et al., 2003; STURMEY et al., 2009) on the reduction of the cytoplasmic lipids content. However, despite this beneficial effect, culturing embryos in a chemically-defined medium (supplemented with polyvinyl alcohol instead of FCS or BSA) leads to a lower rate of embryo production (PEREIRA et al., 2007), since undefined (FCS) or semi-defined (BSA) supplements carry beneficial compounds that enhance embryo development (ZUELKE; BRACKETT, 1990). Although we have used a semi-defined culture medium, we also found a decrease on embryonic development as an undesirable effect of withdrawal of serum from the *in vitro* culture media (both IVM and IVC). On the other hand, results from this study and others (BAVISTER, 1995; WRENZYCKI et al., 2001) demonstrated that serum supplementation leads to a higher proportion of blastocysts.

Culture systems that lead to low rates of embryo production restrict its application in commercial programs of assisted reproduction. However, our intention was to establish an IVP protocol that could, at the same time, allow suitable embryo production and decrease the lipid content of cultured embryos. Due to this purpose, and based on the results of the present study, we chose to supplement the media with FCS during IVM and replace FCS by BSA during

embryonic culture, at which time media was supplemented with LA. This protocol yielded reasonable production rates of embryos while, according to the literature (ABE et al., 2002; LIM et al., 2007; PEREIRA et al., 2008; REIS et al., 2003; STURMEY et al., 2009), could reduce lipid accumulation in embryos.

In vitro production of bovine embryos is influenced by several factors including media supplements and culture conditions. In the present study, supplementation of IVC medium with LA did not affect cleavage, but embryonic development until blastocyst stage was decreased. These findings differ from previous studies (PEREIRA et al., 2007, 2008; TOMINAGA et al., 2000) that reported no impairment in developmental rates of embryos cultured in the presence of PUFAs, although these authors have used CLA instead of LA, and embryos were cultured in medium supplemented with FCS and under high oxygen tension. Al Darwich et al. (2010) reported no decrease in blastocysts rates of embryos cultured with LA, however medium was supplemented with FCS and antioxidants (β -mercaptoethanol). So, the differences between results from present work and previous studies can be attributed to the different culture conditions used among different laboratories, and it is reasonable to assume that the addition of LA in serum-free medium impaired the embryos ability to reach their full capacity of development.

A possible explanation for the decreased developmental capacity of embryos cultured with LA in serum-free medium could be an excessive or unbalanced reduction of its intracellular lipid content. This effect was expected, since LA can decrease the intracellular lipid content in different cell types by reducing the uptake and synthesis of fatty acids (BAUMGARD et al., 2000; BROWN et al., 2001; LOOR; HERBEIN, 1998; PARIZA et al., 2001). Previous studies suggested that the molecular mechanisms involved in the reduction of lipid synthesis involve the coordinated reduction in the mRNA expression of important lipogenic enzymes associated with fat synthesis (BAUMGARD et al., 2002; GERVAIS et al., 2009). Although previous reports demonstrated that the addition of CLA to serum-containing media reduces embryo lipid accumulation during *in vitro* culture and improves cryopreservation survival (PEREIRA et al.,

2007, 2008), it is unclear what would be a reasonable decrease in cytoplasmic lipid content of embryos produced *in vitro*, and which lipids should be decreased or incorporated in the cytoplasmic membrane. So, it can be supposed that supplementation with LA in medium without FCS may have led to a marked or unbalanced reduction in lipid content or even have modified the embryo metabolism, which may have affected their developmental capacity.

Although it is well reported that the excessive accumulation of intracellular lipid droplets during *in vitro* embryonic development impairs the quality of IVP embryos by increasing their sensitivity to oxidative stress and cryopreservation (AL DARWICH et al., 2010; PEREIRA et al., 2008), it is important to mention that the lipids have an important role in cell physiology. Lipids are known to play key roles in energy metabolism during oocyte maturation, fertilization and early embryonic development because they provide energy for early preimplantation development before the activation of the embryo's own genome (FERREIRA et al., 2012; PAULA-LOPES; HANSEN 2002). Lipids also determine the structure and the fine-tuning of the physical properties and functions of biological membranes. Additionally, they have potent signaling effects during cell-cell interactions, cell proliferation and intra- and inter-cellular transport (KIM et al., 2001). Thus, there appears to be required a delicate balance between the processes of synthesis, storage and utilization of intracellular lipids that can maintain the cellular activities in appropriated physiological levels.

Although decreasing the embryo development, LA supplementation in serum-free medium did not affect embryo quality, evaluated by the total number of blastomeres, apoptosis rate and ROS production (determined by the fluorescent probe H₂DFCDA). It was important to assess the ROS production in the present work because the medium was supplemented with a fatty acid (LA) which could increase lipid peroxidation in the culture system. As an attempt to prevent this undesired effect, the embryos were cultured under low oxygen tension, which prevents the formation of free radicals that lead to lipid peroxidation in embryos, thus avoiding cell damage (NAGAO et al., 2008).

ROS are naturally produced by the cells as a result of aerobic cellular metabolism, as byproducts of the cellular respiration process that occurs in the mitochondria. Physiological concentrations of ROS, especially H_2O_2 , are known to signal various cellular functions, such as energy production, cellular proliferation during early embryonic development, cellular differentiation and gene expression correlated with changes in the oxidative response (HARVEY, 2007). However, the oxidative stress occurs when the generation of ROS is higher than the efficiency of the endogenous protective mechanisms (FEUGANG et al., 2003; GUÉRIN et al., 2001). As a consequence, high amounts of ROS will adversely affect the success of the IVP of mammalian embryos (CORRÊA et al., 2008), leading to a decrease in embryo development, metabolic disorders and increase in the incidence of apoptosis (CORRÊA et al., 2008; GUÉRIN et al., 2001). Additionally, excessive amounts of ROS can promote lipid peroxidation and spatial modifications of plasma membrane structures (GUÉRIN et al., 2001; NEDAMBALE et al., 2006). This process results in changes in the structure and permeability of cell membranes, leading to the loss of ion selectivity, release of the contents of organelles and formation of cytotoxic products, and culminating in cell death (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; UFER et al., 2010).

Additionally, oxidative stress may delay the development of embryos and increase the frequency of DNA fragmentation due to formation of intracellular hydrogen peroxide (GUÉRIN et al., 2001). However, as no increase in ROS levels was observed in the present study, the total number of cells did not differ among the treatment groups, as well as the proportion of TUNEL-positive cells (cells undergoing apoptosis). Although apoptosis is a physiological phenomenon that occurs, for example, during embryogenesis, with the purpose of eliminating damaged and unviable cells that could compromise embryo development (FEUGANG et al., 2004), excessive production of ROS can lead to cell death by apoptosis, resulting in embryonic development failure (MATWEE et al., 2000). Thus, the results of this study demonstrate that the proposed strategy of LA supplementation in serum-free medium under low

oxygen tension was effective in preventing the formation of intracellular ROS and therefore prevent increased rates of cell death by apoptosis.

The strategy used in this study, serum-free semi-defined culture medium with LA, reduced embryo lipid content and improved cryosurvival. The positive effect of PUFAs on embryo freezability was first explained by HOCHI et al. (1999) who reported that supplementation of embryonic cultures with LA bound to albumin (LAA) resulted in an increase in the membrane fluidity (lipid unsaturation level) due to the direct incorporation of LA into the lipid bilayer. More recently, PEREIRA et al. (2007, 2008) demonstrated that addition of CLA to serum-containing media reduced embryo lipid accumulation during *in vitro* embryo culture and significantly improved cryopreservation survival. Authors suggested that a direct incorporation of CLA into the membrane during culture might contribute to an increase in the membrane fluidity (unsaturation level) and so improving embryo cryotolerance. In fact, CLA is responsible for inducing modifications in fatty acid profile and composition of tissues namely by reducing triacylglycerols content or interfering in saturated and unsaturated fatty acids levels (ALASNIER et al., 2002; AL DARWICH et al., 2010; PARK et al., 1999). However, further studies are needed to fully understand the role of PUFAs-mediated protection of *in vitro*-produced bovine embryos cryoinjury. Typification and monitoring of some lipid changes during the developmental stages and/or culture conditions should contribute to improve cryopreservation and *in vitro* culture conditions of mammalian embryos.

In summary, we demonstrated that culturing *in vitro*-produced embryos in serum-free medium supplemented with LA and under low oxygen tension leads to a reduction in the rate of embryo development to the blastocyst stage. On the other hand, the proposed system was effective in promoting the decrease in the intracellular lipid content, consequently increasing the cryopreservation survival. Thus, aiming to evaluate the efficiency of the proposed system of IVP embryo culture for commercial purposes, we estimated the success rate by calculating the expected number of surviving (re-expanded) embryos after warming based on the total number of oocytes matured for each treatment. Based on this

estimation, the success rate, i.e., the percentage of expected viable embryos for transfer after warming was similar between Control and LA groups after 24 h of culture post-warming, as well as the success rate of hatching expected after 48 h of culture post-warming. Then, it seems obvious that although the proposed system has provided minor conditions to allow the full embryonic development, the embryos presented higher qualities that enabled them to withstand the freezing stress.

In conclusion, the combined use of serum-free semi-defined culture medium under low oxygen tension and supplementation with LA was found to adversely affect the rates of embryo development to the blastocyst stage, but significantly reduced the intracellular lipid content, and improved survival after cryopreservation. The present results question the commonly used criteria to evaluate the efficiency of an IVP system specifically with relation to the maximum number of blastocyst produced and suggest that might be more appropriate to establish a suitable culture system that could improve the quality of embryos generated according to the specific purpose of commercial or scientific utilization.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by FAPESP, Brazil. MFA was supported by a PhD scholarship from CNPq, Brazil. The authors wish to thank Alta Genetics Brazil Ltda for the donation of the straws of bull semen.

REFERENCES

- AARDEMA, H.; VOS, P.L.A.M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B.A.J.; KNIJN, H.M.; VAANDRAGER, A.B.; HELMS, J.B.; GADELLA, B.M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.85, p. 62-69, 2011.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. 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 Development**, v. 61, p. 57-66, 2002.
- AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M.H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v.93, p.30-36, 2010.
- ALASNIER, C.; BERDEAUX, O.; CHARDIGNY, J.M.; BEBEDIO, J.L. Fatty acid composition and conjugated acid content the different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols small star, filled. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 337-345.
- BAIN, T.N.; MADAN, P.; BETTS, D.H. The early embryo response to intracellular reactive oxygen species is developmentally regulated. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.561-575, 2011.
- BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, p. 179-184, 2000.
- BAUNGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Effects of conjugates linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science** v. 80, p. 1285-1293, 2002.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryo: facts and artifacts. **Human Reproduction**, v. 1, p. 91-148, 1995.

BROWN, J.M.; HALVORSEN, Y.D.; LEA-CURRIE, Y.R.; GEIGERMAN, C.; MCINTOSH, M. *Trans-10,cis-12* but not *cis-9,trans-11*, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 2316-2321, 2001.

CHARPIGNY, G.; GUESNET, P.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; MERMILLOD, P.; HUMBLLOT, P. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. **Les Actes du Colloque BRG**, v. 4, p. 159-172, 2003.

CORRÊA, G.A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M; DODE, M.A.N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.132-142, 2008.

FERREIRA, C.R.; EBERLIN, L.S.; HALLETT, J.E.; COOKS, R.G. Single oocyte and single embryo lipid analysis by desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 29-33, 2012.

FEUGANG, J.M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LEONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, L. Addition of β -mercaptoethanol or trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, p. 71-90, 2004.

FEUGANG, J.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; SAYOUD, H.; REES, J.F.; PAMPFER, S.; MOENS, A. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote**, v.11, p.107-125, 2003.

GENICOT, G.; LEROY, J.L.M.R.; VAN SOOM, A.; DONNAY, I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 1181-1194, 2005.

GERVAIS, R.; MCFADDEN, J.W.; LENGI, A.J.; CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y. Effects of intravenous infusion of trans-10,cis-12 18:2 on mammary lipid

metabolism in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 92, p. 5167-5177, 2009.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J.L.F.C. Use of fluorescence probes for detection of reactive oxygen species: a review. **Journal Fluorescence**, v. 16, p. 119-139, 2006.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J.N.; HIDALGO, C.O.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v.69, p.1013-1021, 2008.

GUERIN, P.; MOUATASSIN, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p. 175-189, 2001.

GUPTA, M.K.; UHM, S.J.; LEE, H.T. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and *in vitro* development of oocytes vitrified before or after *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 8, p. 2602-2607, 2010.

GUTIÉRREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryo. **Theriogenology**, v. 15, p. 1117-1126, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3ed. Press: New York: Oxford University, 1999, p. 936.

HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.113-128, 2007.

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro*-produced bovine morulae. **Theriogenology**, v. 52, p. 497-504, 1999.

JUCHEM, S.O.; CERRI, R.L.A.; VILLASEÑOR, M.; GALVÃO, K.N.; BRUNO, R.G.S.; RUTIGLIANO, H.M.; DEPETERS, E.J.; SILVESTRE, F.T.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-

octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.55–62, 2010.

KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, p. 131-138, 2001.

LIM, K.T.; JANG, G.; KO, K.H.; LEE, W.W.; PARK, H.J.; KIM, J.J.; LEE, S.H.; HWANG, W.S.; LEE, B.C.; KANG, S.K. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. **Theriogenology**, v. 67, p. 293-302, 2007.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FARIN, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction Domestic Animal**, v.38, p.259-267, 2003.

LOOR, J.J.; HERBEIN, J.H. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. **Journal Nutrition**, v. 128, p. 2411-2419, 1998.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v. 8, p. 57-68, 2000.

NAGAO, Y.; LIJIMA, R.; SAEKI, K. Interaction between embryos and culture conditions during *in vitro* development of bovine early embryos. **Zygote**, v. 16, p. 127-133, 2008.

NEDAMBALE, T.L.; DU, F.; YANG, X.; TIAN, X.C. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocyst following culture in defined médium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 61-75, 2006.

PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 283-298, 2001.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.

PARK, Y., STORKSON, J.M.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W.; PARIZA, M.W. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, v. 34, p. 235-241, 1999.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon.

Biology of Reproduction, v. 66, p. 1169-77, 2002.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (10*t*, 12*c* CLA). **Animal Reproduction Science**, v. 98, p. 293-301, 2007.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans*10, *cis*12 conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 322-332, 2008.

REIS, A.; MACCALLUM, G.J.; MCEVOY, T.G. Accumulation and distribution of neural lipid droplets is non-uniform in ovine blastocysts produced *in vitro* in either the presence or absence of serum. **Reproduction Fertility Development**, v. 17, p. 815-823, 2005.

REIS, A.; ROOKE, J.A.; McCALLUM, G.J.; EWEN, M.; STAINES, M.E.; LOMAX, M.A. Fatty acid content of polar and neutral lipids from bovine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of serum. **Reproduction**, v. 30, 2003.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular Reproduction Development**, v. 62, p. 320-322, 2002.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryos development and quality. **Reproduction Domestic Animal**, v. 43, p. 44-50, 2008.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or

the absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology Reproduction**, v. 68, p.236-243, 2003.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of *n*-3 and *n*-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 147-155, 2008.

SEIDEL JR, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, 228-235, 2006.

STURMEY, R.G.; REIS, A.; LEESE, H.J.; MCEVOY, T.G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, p.50–58, 2009.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.O.; CROCOMO, L.F.; LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, p. 1211-1220, 2011.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T.; ARIYOSHI, T. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of *in vitro*-produced bovine embryos at the 16 cell stage. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 62, N. 4, p. 465-467, 2000.

UFER, C.; WANG, C.C.; BORCHERT, B.; HEYDECK, D.; KUH, H. Redox control in mammalian embryo development. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, p. 833-875, 2010.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T.T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 52, p. 939-48, 1999.

WAHLE, K.W.; ROTONDO, D.; HEYS, S.D. Polyunsaturated fatty acids and gene expression in mammalian systems. **Proceeding of the Nutrition Society**, v. 62, p. 349-360, 2003.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.J.R.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and

protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 998-901, 2001.

WRIGHT, J.M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade internacional de Transferência de Embriões**, 4 edição, p. 165-168, 2009.

ZUELKE, K.A.; BRACKETT, B.G. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 784-787, 1990.

Table 1 - Effects of supplementation with different macromolecules [bovine serum albumin (BSA) and/or fetal calf serum (FCS)] at different times during *in vitro* production on embryonic development to the blastocyst stage

Macromolecule supplement		Oocytes (n)	Blastocysts (D7) n (%)	Blastocysts (D8) n (%)
IVM	IVC			
FCS	BSA+FCS	202	54 (26.7%) ^a	61 (30.2%) ^a
FCS	BSA	291	49 (16.8%) ^b	62 (21.3%) ^b
BSA	BSA	310	18 (5.8%) ^c	31 (10.0%) ^c

Data are the mean $\pm$ s.e.m. Within columns, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$) the χ^2 test. Oocytes were *in vitro* matured in medium supplemented with BSA (8 mg/ml fraction fatty acid-free BSA) or FCS (10%). Embryos were *in vitro* cultured in medium supplemented with BSA (8 mg/ml fraction fatty acid-free BSA) or with FCS+BSA (4 mg/ml fraction fatty acid-free BSA + 2.5% FCS). Embryonic development to the blastocyst stage was evaluated at Day 7 (168 h.p.i.) and Day 8 (192 h.p.i.). Treatments were repeated in five replicates.

Table 2 - Effects of linoleic acid supplementation during *in vitro* culture of bovine embryos on cleavage rates and embryonic development to the blastocyst stage

Group	Oocytes (n)	Cleavage	Blastocysts (D7)	Blastocysts (D8)
		n (%)	n (%)	n (%)
Control	1504	1094 (72.7) ^a	388 (25.8) ^a	462 (30.7) ^a
LA	1596	1183 (74.1) ^a	296 (18.5) ^b	357 (22.4) ^b

Within columns, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$) by the χ^2 test. Cleavage (72 h post-insemination (h.p.i.)) and embryonic development to the blastocyst stage at Day 7 (168 h.p.i.) and Day 8 (192 h.p.i.) in bovine embryos produced *in vitro* in medium supplemented with linoleic acid (LA; 100 μ M) or without supplementation (Control).

Table 3 - Effects of linoleic acid supplementation during *in vitro* culture of bovine embryos on intracellular lipid content in Day 7 blastocysts

Group	Embryos	Arbitrary fluorescence
	evaluated (n)	Units
Control	74	27.3 $\pm$ 0.7 ^a
LA	58	24.6 $\pm$ 0.7 ^b

Data are the mean $\pm$ s.e.m. Within columns, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$). Embryos were *in vitro* cultured in medium supplemented with linoleic acid (LA; 100 μ M) or without supplementation (Control). Treatments were repeated in five replicates.

Table 4 - Effects of linoleic acid supplementation during *in vitro* culture of bovine embryos on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in Day 7 blastocysts

Group	Embryos evaluated (<i>n</i>)	Arbitrary fluorescence Units
Control	58	2.7 ± 0.2
LA	52	3.1 ± 0.2

Data are the mean ± s.e.m. There was no significant difference between treatments ($P > 0.05$). Embryos were *in vitro* cultured in medium supplemented with linoleic acid (LA; 100 µM) or without supplementation (Control). Treatments were repeated in five replicates.

Table 5 - Effects of linoleic acid supplementation during *in vitro* culture of bovine embryos on total number of cells and the percentage of apoptotic cells in Day 7 blastocysts

Group	Embryos evaluated (<i>n</i>)	Total number of cells	% Apoptotic cells
Control	66	114.9 ± 5.5	1.8 ± 0.2
LA	58	107.5 ± 5.3	2.0 ± 0.3

Data are the mean ± s.e.m. There was no significant difference between treatments ($P > 0.05$). Embryos were *in vitro* cultured in medium supplemented with linoleic acid (LA; 100 µM) or without supplementation (Control). Treatments were repeated in five replicates.

Table 6 - Effects of linoleic acid supplementation during *in vitro* culture of bovine embryos on the re-expansion rates of vitrified/thawed expanded blastocysts

Group	Embryos evaluated (<i>n</i>)	Blastocoele re-expansion [<i>n</i> (%)]		Hatching (48h) * <i>n</i> (%)
		Immediately	24h	
Control	42	25 (59.5) ^a	21 (50.0) ^a	15 (35.7) ^a
LA	46	29 (63.0) ^a	33 (71.7) ^b	26 (56.5) ^a

Data are the mean $\pm$ s.e.m. Within columns, values with different superscript letters differ significantly ($P < 0.05$). * Considered as tendency ($P = 0.0577$). Embryos were *in vitro* cultured in medium supplemented with linoleic acid (LA; 100 μ M) or without supplementation (Control). Treatments were repeated in five replicates.

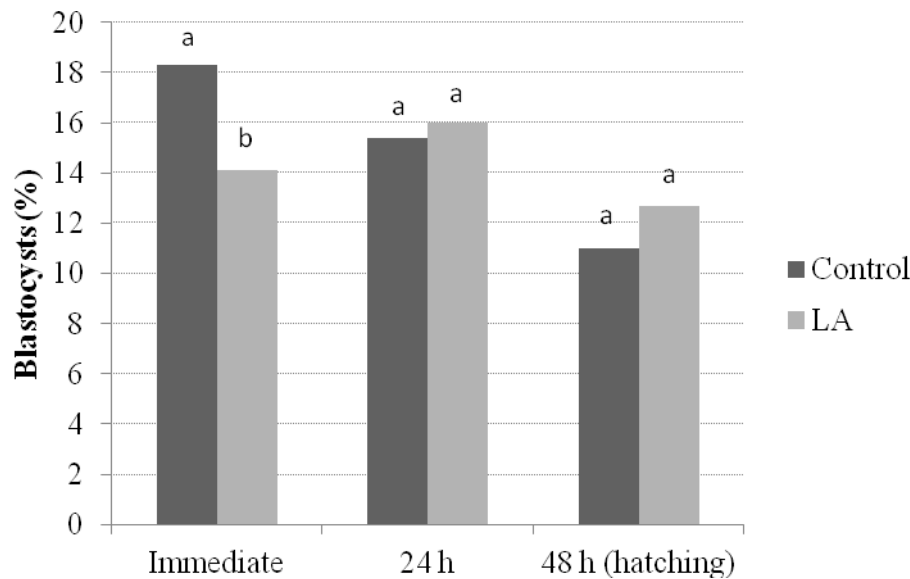


Figure 1- Estimated success rate (% of expected viable blastocysts after warming) calculated based on the total number of oocytes matured *in vitro* for each treatment. The data represent the means. The total numbers of oocytes used for each treatment group were as follows: Control: $n=1504$ [based on results presented in Tables 2 and 6, blastocyst rate at D8 was 30.7%; re-expansion rates of vitrified/warmed expanded blastocysts was 59.5% (immediately) and 50.0% (after 24 h of culture); and hatching rate after 48 h of culture was 35.7%], and LA: $n=1596$ [blastocyst rate at D8 was 22.4%; re-expansion rates of vitrified/warmed expanded blastocysts was 63.0% (immediately) and 71.5% (after 24 h of culture); and hatching rate after 48 h of culture was 56.5%]. Thirty replicates were performed. ^{a,b}Different letters above the bars indicate significantly different means ($P < 0.05$).