

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DE REGULADORES DO METABOLISMO LIPÍDICO
NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS E NA SOBREVIVÊNCIA À VITRIFICAÇÃO**

Marina Ragagnin de Lima
Médica Veterinária

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DE REGULADORES DO METABOLISMO LIPÍDICO
NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
BOVINOS E NA SOBREVIVÊNCIA À VITRIFICAÇÃO**

Marina Ragagnin de Lima

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Coorientadora: Dra. Naiara Zoccal Saraiva

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

2015

L732e Lima, Marina Ragagnin de
Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos e na sobrevivência à vitrificação. / Marina Ragagnin de Lima. -- Jaboticabal, 2015
xvii, 74 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Banca examinadora: Maria Emilia Franco Oliveira, Paulo Henrique Franceschini, Clara Slade Oliveira, Fabio Morato Monteiro

Bibliografia

1. Embriões. 2. Reguladores metabólicos. 3. Vitrificação. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:591.3:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARINA RAGAGNIN DE LIMA – nascida em Caçapava do Sul – RS, aos 27 dias do mês de março de 1983; concluiu o ensino médio na Escola Estadual de Primeiro e Segundo Graus Nossa Senhora da Assunção, na cidade de Caçapava do Sul, em dezembro de 2000; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Passo Fundo – UPF, em março de 2003, sendo bolsista de iniciação científica Pibic-UPF durante dois anos; realizou estágio curricular de graduação na Washington State University durante quatro meses em 2007, concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em fevereiro de 2008; em fevereiro de 2011 obteve o grau de Mestre em Reprodução Animal, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de Mestrado do CNPQ, ingressou, em março de 2011, no curso de pós-graduação, em nível de Doutorado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa CAPES.

EPÍGRAFE

“Quem tem consciência para ter coragem,
quem tem a força de saber que existe,
e no centro da própria engrenagem,
inventa a contra mola que resiste,
quem não vacila mesmo derrotado,
quem já perdido nunca desespera,
e envolto em tempestade, decepado,
entre os dentes segura a primavera...”

(João Ricardo/João Apolinário)

DEDICATÓRIA

Dedico a ti,
Que de perto ou de longe sempre se fez presente
em minha vida,
Que nunca me deixou esmorecer frente as
adversidades,
Que inspira minhas ideias,
Que me faz ter fé, força, coragem e dedicação,
Que me auxilia e estimula na busca de sabedoria,
Que sonha o meu sonho,
Que me ampara a qualquer momento,
Que me ensinou a grandeza em ser humilde para
recomeçar,
Que faz a minha vida ser trilhada com alegria,
motivação e amor,
A ti, eu dedico...

AGRADECIMENTOS

A eterna gratidão a todos os que de alguma forma contribuíram na realização deste projeto e na minha evolução durante esta jornada. Peço desculpas se a minha memória falhar ao citar nomes.

A minha profunda gratidão por mais esta oportunidade de evolução que me deste, pai querido. Sem a tua permissão e a tua benção eu não seria nada. Meu Deus, muito obrigada!

Jesus, pelo teu exemplo de fé, amor e superação.

Ao meu São Jorge guerreiro e Anjo de Guarda pela proteção, fé, força e coragem.

À toda minha família: pelo amor, paciência e carinho dedicados durante toda a minha vida.

Aos meus avós (Romeu, Eline, Elcí e Alcí), sinônimos de aconchego, de sabedoria, de serenidade, amizade e de saudade.

Aos meus pais (Erú e Roseline), sou grata, pelo amparo e amor, pela educação, pelo lar, pela família, pelo incentivo para buscar meus ideais, sempre serão o porto seguro da minha vida.

Ao meu carinhoso tio Neco e à tia Dedê, exemplo de fé e resignação.

À grande amiga Margarete Mello Matte, minha “mãezinha”.

Ao meu amado Joaquim, por todo incentivo, companheirismo, zelo, força, compreensão e paciência (infinita)... a minha contra mola.

As minhas cachorrinhas Nina e Lilica, pelo companheirismo.

A minha égua Cigana, pela terapia.

A equipe da Bioklone reprodução animal, André Santana, Maria Aparecida D'Aquila e Adriana Menezes pela amizade, compreensão e auxílio no desenvolvimento dos trabalhos.

Ao professor orientador Joaquim Mansano Garcia, pelo exemplo de mestre sábio e dedicado, pela confiança, amparo, oportunidade e ensinamentos transmitidos ao longo destes sete anos de convivência.

A co-orientadora Dra. Naiara Zoccal Saraiva, pelo exemplo de pesquisadora dedicada e ética, pelos ensinamentos transmitidos e amizade.

A todos os professores os quais tive disciplina, em especial aos do departamento de reprodução animal, pelo conhecimento transmitido e oportunidades proporcionadas.

Ao Professor Paulo Henrique Franceschini pela oportunidade do primeiro contato com o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal como estagiária extracurricular.

Ao professor João Ademir pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos funcionários, Edson de Aguiar, Ivo Luiz de Almeida Jr, Isabel Aparecida Penariol Natarelli e Roberta Vantini pela amizade e auxílio.

Aos meus estimados colegas e ex-colegas de pós-graduação: Aderson Ifran, Anelise Peres, Aline da Costa Lúcio, Carmen Zilda Pereira de Toledo, Danillas Slinet de Melo, Fábio Morato Monteiro, Felipe Barros, Guilherme Fazan Rossi, Letícia Zoccolaro de Oliveira, Luciana Padilha, Ludmila Zavarez, Mabel Cordeiro, Marcela Maria de Souza, Marcelo Bezerra, Marcos Brandão Dias Ferreira, Maria Emilia Franco Oliveira, Pedro e Paulo Maia Teixeira, Rafael Correa, Ricardo Perecin, Tatiane Almeida Drummond Tezner, Verônica Gonzales Cadavid, pela convivência e ajuda.

A Dra. Clara Slade de Oliveira, pelos conhecimentos transmitidos e amizade.

A mototaxista Joelma Navarro, pela busca e coleta de ovários no frigorífico.

A CAPES pelo suporte financeiro.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – UNESP, em especial, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal e à Pós-graduação, pelas instalações, condições de trabalho, acolhimento e oportunidade.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	3
2.2. Metabolismo energético embrionário.....	5
2.2.1. Metabolização da glicose.....	7
2.2.2. Metabolização dos ácidos graxos.....	8
2.2.3. Metabolização dos Aminoácidos.....	10
2.2.4. Ciclo de Krebs e cadeia respiratória.....	10
2.3. Os lipídios.....	12
2.3.1. Biossíntese dos ácidos graxos.....	13
2.3.2. A importância dos lipídios na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário.....	17
2.4. O uso de reguladores metabólicos na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	21
2.4.1. L-Carnitina	22
2.4.2. Forskolina.....	24
2.4.3. Ácido linoleico.....	25
2.5. Criopreservação dos embriões.....	27
2.5.1. Crioprotetores.....	29
2.5.2. Vitrificação de embriões.....	31
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. HIPÓTESE.....	35
5. MATERIAL E METODOS.....	36
5.1. Local do experimento.....	36
5.2. Obtenção dos oócitos.....	36
5.3. Busca e seleção dos oócitos.....	37
5.4. Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos (MIV).....	37

5.5. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	38
5.6. Cultivo de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> (CIV).....	38
5.7. Suplementação dos embriões com reguladores metabólicos.....	39
5.8. Criopreservação e reaquecimento dos embriões.....	40
5.9. Avaliação da criotolerância embrionária.....	40
5.10. Delineamento experimental	41
5.10.1. Experimento 1: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com L-carnitina sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação.....	41
5.10.2. Experimento 2: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com forskolina sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação.....	42
5.10.3. Experimento 3: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com ácido linoleico conjugado <i>trans-10 cis-12</i> , sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação.....	42
5.10.4. Experimento 4: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com os reguladores metabólicos, L-carnitina, forskolina e ácido linoleico conjugado, sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação.....	42
5.11. Análise estatística.....	43
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6.1. Experimento 1 - Efeitos da suplementação do meio de cultivo com L-carnitina sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação.....	44
6.2. Experimento 2 - Efeitos da suplementação do meio de cultivo com forskolina sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação.....	47
6.3. Experimento 3: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com ácido linoleico conjugado <i>trans-10 cis-12</i> , sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação.....	49
6.4. Experimento 4: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com os reguladores metabólicos, L-carnitina, forskolina e ácido linoleico conjugado <i>trans-10 cis-12</i> , sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação.....	52
7. CONCLUSÕES.....	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Resultados de produção, expansão e eclosão <i>in vitro</i> de embriões bovinos produzidos em meio suplementado no quarto ou sexto dia do desenvolvimento, com diferentes concentrações de L-carnitina.....	46
Tabela 2: Resultados de produção, expansão e eclosão <i>in vitro</i> de embriões bovinos produzidos em meio suplementado com diferentes concentrações de L-carnitina, no quarto ou sexto dia do desenvolvimento.....	47
Tabela 3: Resultados de produção, expansão e eclosão <i>in vitro</i> de embriões bovinos produzidos em meio suplementado no quarto ou sexto dia do desenvolvimento, com diferentes concentrações de Forskolina.....	48
Tabela 4: Resultados de produção, expansão e eclosão <i>in vitro</i> de embriões bovinos produzidos em meio suplementado com diferentes concentrações de Forskolina, no quarto ou sexto dia do desenvolvimento.....	49
Tabela 5: Resultados de produção, expansão e eclosão <i>in vitro</i> de embriões bovinos produzidos em meio suplementado no quarto ou sexto dia do desenvolvimento, com diferentes concentrações de ácido linoleico conjugado <i>trans</i> -10; <i>cis</i> -12.....	51
Tabela 6: Resultados de produção, expansão e eclosão <i>in vitro</i> de embriões bovinos produzidos em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido linoleico conjugado <i>trans</i> -10; <i>cis</i> -12, no quarto ou sexto dia do desenvolvimento.....	52
Tabela 7: Resultados de produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos utilizando reguladores de metabolismo lipídico a partir do quarto dia do desenvolvimento embrionário.....	54
Tabela 8: Resultados de expansão e eclosão, de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> , em meio suplementado com reguladores de metabolismo lipídico a partir do quarto dia do desenvolvimento embrionário.....	55

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Esquema representativo do metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos.....	6
Figura 2: O circuito da carnitina.....	9
Figura 3: Etapas da oxidação dos ácidos graxos.....	9
Figura 4: Produtos do metabolismo dos aminoácidos.....	10
Figura 5: Reações do ciclo de krebs.....	11
Figura 6: Transferência dos grupamentos acetil, da mitocôndria para o citosol celular.....	15
Figura 7: Sequência de eventos durante a síntese dos ácidos graxos.....	16
Figura 8: Esquema representativo da cronologia de produção e momentos de avaliação de clivagem, alimentação com os reguladores de metabolismo no meio de cultivo <i>in vitro</i> , avaliação da produção e vitrificação dos embriões bovinos.....	39

ABREVIATURAS

aa – Aminoácidos
ADP - Adenosina difosfato
AMP - Adenosina monofosfato
ATP - Adenosina trifosfato
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
Bi - Blastocisto inicial
BI - Blastocisto
BSA - Albumina sérica bovina
Bx - Blastocisto expandido
°C - Grau celsius (centígrado)
CA – Carnitina
Ca²⁺ - Íon cálcio
CIV - Cultivo embrionário *in vitro*
CLA - Ácido linoleico conjugado
CoA – coenzima A
CO₂ - Dióxido de carbono
Dr – Doutor
Dra - Doutora
FAD - dinucleótido de flavina e adenina
FIV - Fertilização *in vitro*
FO - Forskolina
FSH - Hormônio folículo estimulante
G - Gauge
g – Força centrífuga
h - horas
hCG - Gonadotrofina coriônica humana
hpf – horas após a fertilização
K⁺ - Íon potássio
LH - Hormônio luteinizante
M - Molar
mg - Miligramas
min - Minutos

MIV - Maturação oocitária *in vitro*

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

Na⁺ - Íon sódio

NAD – nicotina adenina dinucleotídeo

NAD⁺ - nicotina adenina dinucleotídeo (oxidado)

NADH - nicotina adenina dinucleotídeo (reduzido)

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

N₂ - Nitrogênio

OPU - Punção folicular guiada por ultrassom

O₂ - Oxigênio

PBS - Tampão salina fosfato

pH - Concentração do íon hidrogênio

PHE - Penicilina, hipotaurina, epinefrina

PIV - Produção *in vitro*

rpm - Rotações por minuto

SD – Desvio padrão

SFB - Soro fetal bovino

-SH – grupamento tiol

SOF - Fluido sintético de oviduto

TAG - Triacilgliceróis

TCM - 199 – “Tissue culture médium 199”

UI - Unidades internacionais

μ - Micro

μg - Micrograma

μl - Microlitro

μM - Micromolar

/ - Por

% - Porcentagem

χ² - Qui-quadrado

= - Igual

< - Menor

> - Maior

EFEITOS DE REGULADORES DO METABOLISMO LIPÍDICO NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS E NA SOBREVIVÊNCIA À VITRIFICAÇÃO

RESUMO: Embriões produzidos *in vitro* (PIV) apresentam baixa sobrevivência aos métodos convencionais de criopreservação. Na tentativa de melhorar a produção e taxa de sobrevivência embrionária após a vitrificação foram utilizados reguladores metabólicos L-carnitina (CA), Forskolina (FO) e Ácido linoleico conjugado *trans*-10; *cis*-12 (CLA), separadamente ou em associação em diferentes doses, à partir do quarto (D4) ou sexto (D6) dia do cultivo de desenvolvimento embrionário. No experimento 1 o uso de 2,5 mM de CA influenciou positivamente na produção ($62,0 \pm 12,5\%$, $P=0,02$), expansão ($60,7\%$, $P=0,009$) e eclosão ($41,1\%$, $P=0,04$). No experimento 2, a produção de embriões não foi influenciada pela suplementação com FO ($P=0,2$), entretanto, a dose de $15,0 \mu\text{M}$ afetou positivamente a expansão ($53,2\%$, $P=0,001$) e eclosão ($46,8\%$, $P=0,001$). No experimento 3, a produção de embriões não foi influenciada pela suplementação do meio de cultivo com CLA ($P=0,4$), no entanto a dose de $150,0 \mu\text{M}$ afetou positivamente a expansão ($85,5\%$, $P=0,001$) e eclosão ($70,9\%$, $P=0,001$) dos embriões reaquecidos e cultivados por 48 horas. No experimento 4, a associação dos reguladores de metabolismo lipídico utilizados não influenciou a produção de embriões ($P=0,16$), entretanto o melhor resultado de produção observado foi no tratamento com $15,0 \mu\text{M}$ de FO individualmente. As taxas de expansão e eclosão foram influenciadas pela suplementação com reguladores de metabolismo adicionados individualmente ou em associação ($P=0,001$). A melhor taxa de expansão foi observada na suplementação associando CA+FO+CLA, com $90,05\%$, que não diferiu ($P>0,05$) da suplementação com CLA ($86,4$) e da associação CA+CLA ($87,9\%$). Entretanto, a melhor taxa de eclosão foi obtida com CLA ($71,8\%$, $P=0,01$), superior aos demais tratamentos. Foi concluído que o uso dos reguladores do metabolismo lipídico CA, FO e CLA a partir do quarto dia do cultivo de desenvolvimento *in vitro* de embriões aumentou a criosobrevivência embrionária.

Palavras Chave: embriões, bovinos, reguladores do metabolismo, criopreservação

EFFECTS OF THE LIPID METABOLIC REGULATORS DURING IN VITRO DEVELOPMENT OF THE BOVINE EMBRYOS AND THE SURVIVAL TO THE VITRIFICATION.

ABSTRACT: Embryos produced *in vitro* (IVP) have low survival to conventional cryopreservation methods. In attempt to improve the production and the rate of embryo survival to the cryopreservation process, was used the metabolic regulators, L-carnitine (CA), forskolina (FO) and the conjugated linoleic acid isomers *trans*-10, *cis*-12 (CLA), separately or in combination in different doses, starting the fourth (D4) or sixth (D6) days of the embryo culture development in vitro. In experiment 1, the best results of production ($62,0 \pm 12,5\%$, $P = 0,02$), expansion ($60,7\%$, $P = 0,009$), and hatching ($41,1\%$, $P = 0,04$) was obtained using $2,5\text{ mM}$ of CA. In experiment 2, the production of embryos was not influenced by supplementation with FO ($P=0,2$), however, the dose of $15,0\mu\text{M}$ was the best result of expansion ($53,2\%$) and hatching ($46,8\%$) ($P=0,001$). In experiment 3, the production of embryos was not influenced by supplementation with CLA ($P=0,4$), however, the dose of $150,0\mu\text{M}$ resulted in higher rates of expansion ($85,5\%$, $P=0,001$) and hatching ($70,9\%$, $P=0,001$). In the experiment 4, the embryo production was not influenced by the supplementations ($P=0,16$), however the best result of the production was using $15,0\mu\text{M}$ of FO individually. The expansion and hatching rates was influenced by supplementation with the metabolism regulators added individually or in a combination ($P=0,001$). The best expansion rate was observed with the association CA+FO+CLA ($90,05\%$), that was not different ($P>0,05$) of the CLA ($86,4\%$) or CA+CLA ($87,9\%$) groups. However, the best hatching rate was obtained with CLA ($71,8\%$), which was higher to the other treatments ($P=0.01$). In conclusion, the use of the metabolic regulators CA, FO and CLA from the fourth day of the embryo culture *in vitro* increase the embryo resistance to the cryopreservation.

Keywords: embryos, bovine, metabolism regulators, cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma ferramenta importante no aproveitamento do potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos, possibilita acelerar a produção de animais geneticamente superiores. Além disso, a PIV permite ampliar a vida reprodutiva das fêmeas, sendo possível a utilização dos oócitos de fêmeas pré-púberes, vacas gestantes, idosas, e até mesmo de animais com infertilidade adquirida (GONÇALVES, et al., 2007; WATANABE et al., 2008).

Nos atuais sistemas comerciais de produção *in vitro* de embriões, um dos maiores entraves é a obtenção e sincronização das receptoras, as quais devem ser proporcionais ao número de embriões produzidos. Uma solução para este problema seria a utilização das técnicas de criopreservação dos embriões excedentes. A evolução da criopreservação de embriões bovinos propicia também uma série de outros benefícios, tais como: a otimização do uso das receptoras em estro natural, planejamento do período de nascimento dos bezerros de acordo com o manejo da propriedade, a formação de bancos de germoplasma e principalmente, facilitar a comercialização dos embriões (importação e exportação). Assim, a criopreservação de embriões tem se tornado parte integrante da reprodução assistida em animais, especialmente de espécies domésticas (KULESHOVA; LOPATA, 2002).

No entanto, a característica que persiste no mercado internacional e nacional é o predomínio das transferências realizadas a “fresco” dos embriões PIV (STROUD, 2011), em função dos resultados insatisfatórios obtidos com a criopreservação dos embriões zebuínos e taurinos produzidos *in vitro*, que apresentam taxas de concepção inferiores a 30% (HASLER et al., 2003).

Os embriões PIV apresentam marcantes características morfológicas e moleculares, que são diferentes daquelas observadas em embriões produzidos *in vivo* (WRIGHT; ELLINGTON, 1995), uma delas é o excessivo acúmulo de lipídio citoplasmático (SUDANO et al., 2011). Entretanto, os mecanismos de deposição lipídica nestes embriões PIV ainda não estão bem esclarecidos. As duas hipóteses sugeridas são de que as lipoproteínas contidas no soro fetal bovino (SFB) utilizado como fonte proteica durante a produção *in vitro* são absorvidas pelas células embrionárias (ABE et al., 2004; DIEZ et al., 2001), e de que nos embriões PIV a eficiência mitocondrial em β -oxidar os ácidos graxos é reduzida, dessa maneira, os lipídios que deveriam ser utilizados como fonte energética ficam acumulados

(CROSIER et al., 2001). De qualquer forma, a total substituição do SFB na PIV de embriões bovinos ainda é um grande desafio, visto que de maneira geral os meios suplementados com esta fonte proteica ainda são os que apresentam as melhores taxas de produção embrionária (DUQUE et al., 2003).

Tendo em vista o desafio de produzir embriões bovinos *in vitro* que sejam mais resistentes aos processos de criopreservação, mantendo as taxas de produção embrionária. Foi utilizado no meio de cultivo de desenvolvimento embrionário os reguladores do metabolismo lipídico L-carnitina (DUNNING, et al., 2012; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), forskolina (PASCHOAL et al., 2010; SANCHES et al., 2013) e ácido linoleico conjugado *trans*-10; *cis*-12 (Pereira et al., 2007;2008) isoladamente e em associação, em diferentes doses e momentos do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos

A produção *in vitro* de embriões bovinos envolve três etapas: a maturação oocitária, a fertilização e o cultivo de desenvolvimento embrionário.

A maturação *in vitro* de oócitos bovinos tem duração de aproximadamente 24 horas, durante esse período os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: a quebra da vesícula germinativa, o desaparecimento do nucléolo, a condensação da cromatina, a extrusão do primeiro corpúsculo polar e a formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001). Os eventos citoplasmáticos incluem: síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001) e maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG et al., 2003).

Considera-se que esta etapa de maturação dos oócitos seja de fundamental importância para que haja adequada aquisição da competência oocitária. É neste período que estes gametas adquirem capacidade para serem fecundados, expressando o seu potencial máximo durante o desenvolvimento embrionário inicial, até que ocorra a transição materno-zigótica quando o genoma embrionário é ativado (FERREIRA et al., 2009). O processo de maturação oocitária está diretamente relacionado com a taxa de blastocistos produzidos (RUSSELL et al., 2006).

Geralmente, na fertilização *in vitro*, os oócitos bovinos após a maturação são incubados com os espermatozoides por um período de 18 a 24 horas. A fecundação propriamente dita se dá quando ocorre a penetração do espermatozoide no oócito, este por sua vez retoma a meiose e completa a extrusão do segundo corpúsculo polar, em seguida há a formação dos pronúcleos masculino e feminino, e a singamia restabelecendo-se o número de cromossomos (GORDON, 2003).

A terceira etapa da produção *in vitro* consta no cultivo de desenvolvimento embrionário, que ocorre após a singamia. Formam-se os novos indivíduos chamados zigotos que multiplicam suas células (blastômeros) por sucessivas divisões mitóticas. A partir desse momento ocorre a transição materno-zigótica quando há a ativação do

genoma embrionário (com 8 a 16 células), compactação (mórula com 32-64 células), diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, e a blastulação com a formação do blastocisto (GONÇALVES, et al., 2008).

Nos sistemas habituais de produção *in vitro*, 80% dos oócitos imaturos completam a metáfase II da meiose II (DOMINKO; FIRST, 1997), no entanto, só aproximadamente 40% dos oócitos fertilizados alcançam o estágio de blastocisto (WARD et al., 2002; SIRARD et al., 2006).

Embora a taxa de produção de blastocistos seja influenciada pela origem e qualidade dos oócitos utilizados na produção *in vitro*, sabe-se que a qualidade dos embriões produzidos está diretamente relacionada ao cultivo embrionário (RIZOS et al., 2002; LONERGAN, 2006).

O sistema de produção *in vitro* dos embriões não apresenta a mesma eficiência que *in vivo*. Na maioria das vezes os embriões *in vitro* apresentam marcantes características morfológicas e moleculares diferentes dos embriões produzidos *in vivo* (WRIGHT; ELLINGTON, 1995). Os embriões produzidos *in vitro* apresentam desenvolvimento mais acelerado, diâmetro menor a partir da fase de blastocisto e geralmente anormalidades mitocondriais (CROSIER et al., 2001) como cristas periféricas e formato circular (FAIR et al., 1997), redução na quantidade de microvilosidades que recobrem a membrana plasmática e das junções GAP, diminuindo o contato entre as células do trofoblasto (BONI et al., 1999; FAIR et al., 2001), e diferenças metabólicas (KHURANA et al., 2000; THOMPSON, 2000).

Além destas, ainda relata-se o excessivo acúmulo lipídico no citoplasma destes embriões que está intimamente relacionado à reduzida criotolerância dos mesmos e conseqüentemente à baixa sobrevivência após a descongelação, principalmente quando o soro fetal bovino (SFB) é utilizado como fonte proteica durante o cultivo de desenvolvimento embrionário (ABD EL et al., 2000; ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006).

Os principais problemas do acúmulo lipídico em excesso nos embriões seriam alterações na fluidez e função da membrana plasmática (KIM et al., 2001; SUDANO et al., 2012), aspecto escurecido e baixa densidade dos mesmos, influenciando negativamente na sobrevivência embrionária nos processos de criopreservação (MUCCI et al., 2006). Também, sugere-se que em decorrência da criopreservação haja uma acentuada peroxidação dos lipídios poli-insaturados contidos nestes embriões, aumentando a produção de radicais livres. Dessa forma, o excesso de

lipídios nos embriões aumentaria ainda mais esta produção de radicais livres e acentuaria o processo de morte embrionária (BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL Jr, 2007b).

Alguns estudos têm relatado eficiência na substituição do SFB por albumina sérica bovina (BSA) durante as etapas de maturação e/ou cultivo de desenvolvimento, na produção de embriões mais viáveis à criopreservação (ABE et al., 2002; KRISHER et al., 1999; RIZOS et al., 2003). No entanto, ao utilizar separadamente SFB ou BSA durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, o grupo do SFB apresentou melhores resultados na taxa de maturação nuclear e expansão das células do cumulus, taxa de expansão e eclosão dos blastocistos, maior massa celular interna e número total de células nos embriões. Porém, tanto os oócitos após a maturação quanto os embriões produzidos com SFB apresentaram aspecto escurecido (indicando acúmulo lipídico) em relação aos grupos onde foi utilizado o BSA (RUSSELI et al., 2006).

Leivas et al. (2010) também observaram a associação de SFB e BSA, no meio de cultivo de desenvolvimento embrionário como sendo benéfica tanto na taxa de embriões produzidos quanto na qualidade embrionária, ao contrário de quando foi usado somente o BSA como fonte proteica.

Pelo fato de tanto o SFB quanto o BSA não terem a sua composição totalmente definida não se sabe exatamente se existem e quais são os fatores essenciais presentes nestas fontes proteicas que atendam às necessidades dos embriões PIV. Várias foram as tentativas de substituir totalmente o SFB na produção *in vitro* de embriões bovinos por outras fontes de macromoléculas definidas (KATO; NAGAO, 2009; LIM et al., 2007), mas de maneira geral os meios suplementados com SFB ainda são os que apresentam as melhores taxas de produção embrionária (DUQUE et al., 2003). Contudo, a reserva lipídica presente nos oócitos e embriões é de suma importância na sobrevivência e viabilidade dos mesmos, principalmente como reserva energética (STURMEY et al., 2009).

2.2. Metabolismo energético embrionário

Geralmente, durante o desenvolvimento inicial embrionário o metabolismo energético é relativamente baixo (THOMPSON et al., 1996). No entanto a partir da ativação do genoma embrionário esta demanda aumenta gradativamente e atinge seu

ápice durante a blastulação, em função da intensificação na síntese proteica e atividade dos sistemas de transportes de íons (bomba Na^+/K^+) envolvidos nesta etapa do desenvolvimento embrionário (THOMPSON et al., 1998, 2000), sendo necessário maior produção de adenosina trifosfato (ATP). O principal substrato para produção de energia nas células é a acetilcoenzima A (acetil-coA), que pode ser produzida a partir do metabolismo dos carboidratos, aminoácidos e também dos ácidos graxos (Figura 1).

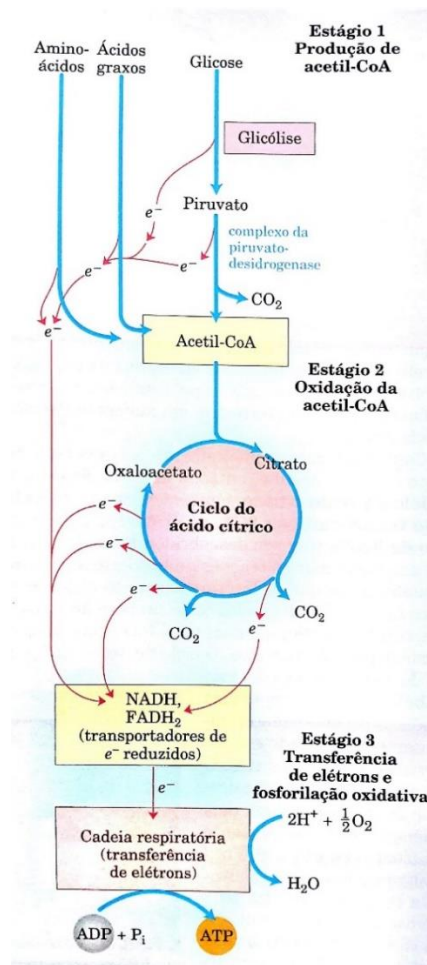


Figura 1: Esquema representativo do metabolismo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos (NELSON; COX, 2011).

2.2.1. Metabolização da glicose

A glicose é um dos substratos mais utilizados na produção de energia durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário pós-compactação (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), ao ser oxidada via glicólise ou via pentose-fosfato (KHURANA; NIEMANN, 2000). A via de metabolização irá depender das relações ATP/ADP e NADPH/NADP existentes no citosol celular. Quando a relação ATP/ADP é baixa e a relação NADPH/NADP é alta, a glicose vai ser degradada pela via glicolítica, produzindo ATP. A via das pentoses é inibida e não há síntese de ácidos graxos. Porém, se a relação ATP/ADP é alta, a via glicolítica é inibida. A glicose é oxidada pela via das pentoses, favorecendo a síntese de ácidos graxos.

A oxidação da glicose via pentose-fosfato ocorre no citosol celular e tem como principais produtos a ribose-5-fosfato e o NADPH (BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL Jr, 2007). A ribose-5-fosfato é a pentose constituinte dos nucleotídeos que compõe os ácidos nucleicos, e de muitas coenzimas, como o ATP, NADH, FADH₂ e coenzima (KHURANA; WALES, 1989). Já o NADPH⁺, é necessário na redução das vias biossintéticas como aceptor de elétrons (recebe elétrons), participa na transformação do malato em piruvato (na síntese de ácidos graxos), e também atua contrapondo os efeitos deletérios de radicais livres (WALES; DU, 1993; HARVEY et al., 2002).

Na via da glicólise, cada molécula de glicose (com seis carbonos) é oxidada em uma sequência de dez reações, tendo como produtos duas moléculas de piruvato (com três carbonos), duas moléculas de ATP e duas moléculas de NADH⁺. Sob ação do complexo piruvato desidrogenase, os piruvatos formados são novamente oxidados, perdem um grupamento carboxil na forma de CO₂, e os outros dois carbonos remanescentes são convertidos a acetil, da acetil-coA. Desta maneira, à partir de cada piruvato, produz-se uma molécula de acetil-CoA. (NELSON; COX, 2011; MARZZOCO; TORRES, 2007).

A acetil-coA formada entra em uma via de oxidação final comum, seja para a acetil-coA derivada glicólise e da oxidação do piruvato ou dos ácidos graxos, quando são oxidadas à CO₂ no ciclo de Krebs (FERNIE et al., 2004).

2.2.2. Metabolização dos ácidos graxos

Os triacilgliceróis (TAG) são os principais lipídios fornecedores de energia às células, cerca de 95% desta energia provem dos três ácidos graxos que os compõe e somente 5% são fornecidos pelo glicerol. Primeiramente a lipase atua liberando o grupamento glicerol, este é fosforilado pela glicerol-cinase e origina o glicerol-3-fosfato que é oxidado a diidroxiacetona-fosfato. Então, a triose-fosfato-isomerase age convertendo-a em gliceraldeído-3-fosfato que é oxidado na glicólise. Já os ácidos graxos serão oxidados nas mitocôndrias (DUNNING et al., 2012; NELSON; COX, 2011).

Para que os ácidos graxos sejam oxidados, é necessário que sejam convertidos em uma forma ativada (acil graxo-coA). Para tal, as enzimas acil-coA-sintases catalisam a formação da ligação tioéster entre o carboxil do ácido graxo e o tiol (-SH) da coenzima, produzindo uma acil graxo-coA, AMP e pirofosfato (MARZZOCO; TORRES, 2007).

A próxima etapa consiste na passagem da acil graxo-coA para dentro da mitocôndria, que ocorre por intermédio do circuito da carnitina (Figura 2) (KERNER; HOPPEL, 2000). Dessa maneira, a acil graxo-coA se liga ao grupo hidroxil da carnitina e por ação da carnitina-acil-transferase I que passa para o espaço intermembrana da mitocôndria, logo atravessa a membrana interna por difusão facilitada através do transportador acil-carnitina/carnitina. Finalmente, a carnitina-acil-transferase II faz com que o acil graxo-coA seja regenerado, liberando a carnitina que retorna ao espaço intermembrana (DUNNING et al., 2012; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012).

A oxidação mitocondrial dos ácidos graxos também ocorre em três etapas (Figura 3). A primeira delas é a beta-oxidação, nesta fase os ácidos graxos sofrem ciclos de remoção oxidativa da sua cadeia carbonada, cada ciclo é formado por uma sequência de quatro reações que no final gera uma molécula de acetil-coA. Portanto a cada ciclo é gerada uma molécula de acetil-coA. A quantidade de acetil-coA gerado vai depender do tamanho da cadeia de carbonos, pois é isso que determina a quantidade de ciclos. Em cada ciclo são retirados dois carbonos da cadeia carbonada do ácido graxo para a formação do acetil-coA, no entanto o último ciclo gera 2 moléculas de acetil-coA. Por exemplo, o ácido palmítico de 16 carbonos, sofre 7 ciclos e ao final os dois últimos carbonos permanecem como acetil-coA (2 moléculas), originando 8 acetil-coA. Quando se trata de cadeias ímpares de ácidos graxos, o

último ciclo irá gerar uma de acetil-coA (2 carbonos) e uma molécula de 3 carbonos chamada de propionil-coA, que será oxidada em succinil-coA a qual é utilizada no ciclo de Krebs e cadeia respiratória (NELSON; COX, 2011; MARZZOCO; TORRES, 2007; SHULZ, 1991).

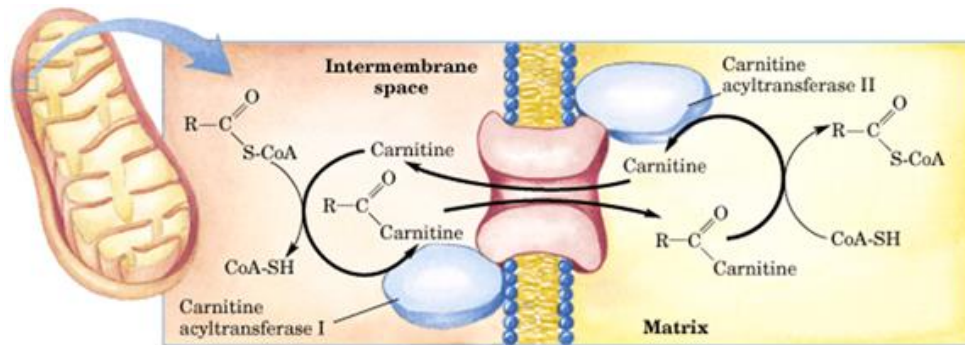


Figura 2: O circuito da carnitina (NELSON; COX, 2011).

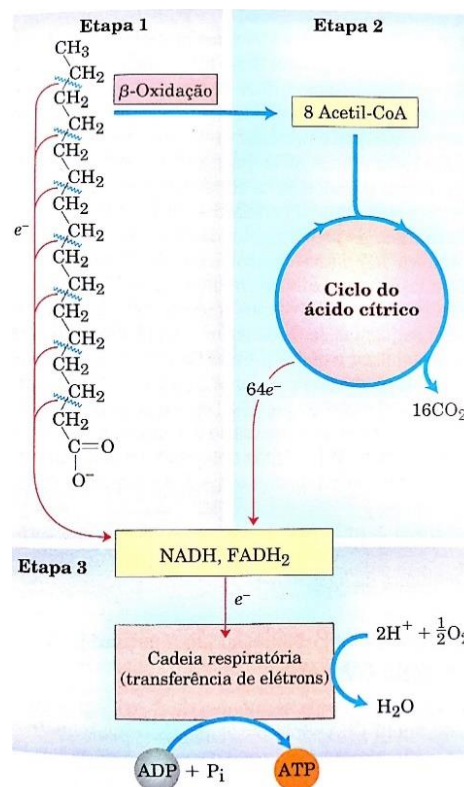


Figura 3: Etapas da oxidação dos ácidos graxos (NELSON; COX, 2011).

2.2.3. Metabolização dos Aminoácidos

As vias do metabolismo dos aminoácidos, tomadas em conjunto, normalmente são bem menos ativas do que a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos. O fluxo ao longo das vias catabólicas varia muito dependendo do balanço entre as necessidades para processos biossintéticos e disponibilidade dos aminoácidos (Figura 4) (MIFLIN; LEA, 1977; NELSON; COX, 2011, WU, 2009). Todas as vias catabólicas convergem para a formação de conjuntos de aminoácidos que formarão precursores ou componentes do ciclo de Krebs (Figura 4) (FERNIE et al., 2004).

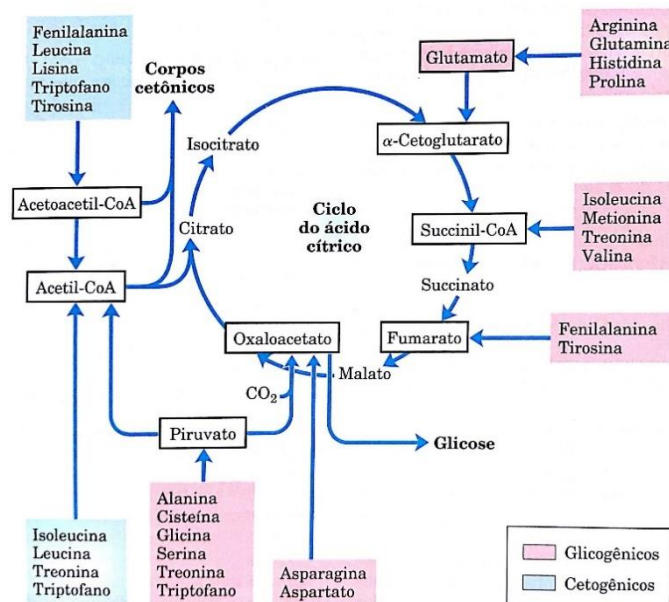


Figura 4: Produtos do metabolismo dos aminoácidos (NELSON; COX, 2011).

2.2.4. Ciclo de Krebs e cadeia respiratória

O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico ocorre nas mitocôndrias, e compreende uma série de reações. A primeira reação é a condensação de acetil-coA com o oxaloacetato, originando o citrato, que é transformado em isocitrato. O isocitrato é desidrogenado, libera CO₂ e forma o α-cetoglutarato que também perde CO₂ e origina succinil-coA, então, a molécula de coenzima é liberada produzindo o succinato. O succinato é então oxidado à fumarato, este sofre hidratação transformando-se em

malato. Para finalizar, o malato é oxidado formando o oxaloacetato novamente. Para cada acetil-coA oxidada são liberadas duas moléculas de CO_2 e produzidas três moléculas de NADH, uma de FADH_2 e um ATP (Figura 5). Por fim, os transportadores de elétrons produzidos durante o ciclo de Krebs seguirão para cadeia respiratória mitocondrial onde os elétrons são transferidos para o oxigênio e ocorre a fosforilação de ADP formando ATP (FERNIE et al., 2004; NELSON; COX, 2011).

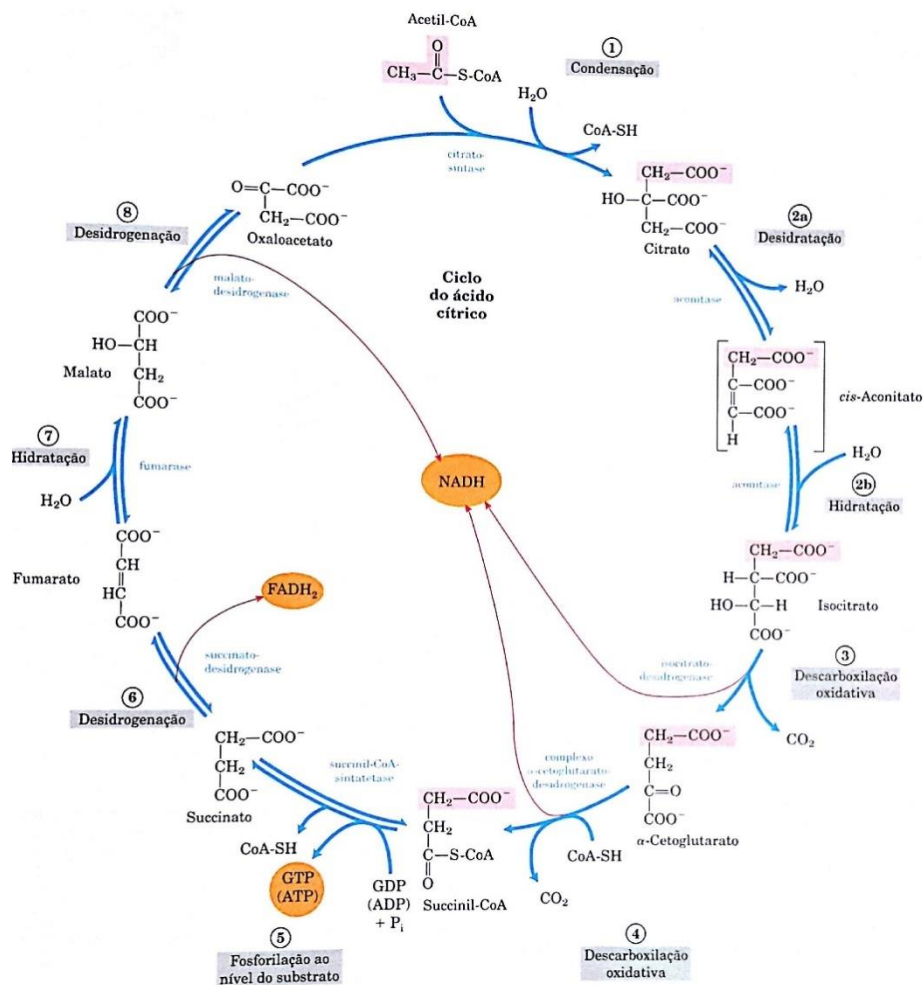


Figura 5: Reações do ciclo de Krebs (NELSON; COX, 2011).

2.3. Os lipídios

Os lipídios são um grupo de compostos quimicamente diversos, constituídos por ácidos graxos, que por sua vez são formados de ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de comprimento variando de 4 a 36 carbonos (MARZZOCO; TORRES, 2007).

Nos ácidos graxos saturados esta cadeia não apresenta ligações duplas em sua estrutura, sua nomenclatura se baseia na quantidade de carbonos que os compõe, como por exemplo, o ácido palmítico (ácido hexadecanoico) composto por 16 carbonos, abreviadamente representado como 16:0. Os ácidos graxos insaturados apresentam ramificações na sua cadeia carbonada e/ou ligações duplas, podendo em alguns casos conter anéis de carbonos, grupos hidroxil e ramificações de grupos metil. A nomenclatura leva em conta a quantidade de carbonos, e a posição das duplas ligações em relação ao carbono do carboxil, por exemplo, o ácido oleico (ácido *cis*-9-octadecenoico) que contem 18 carbonos e uma ligação dupla entre os carbonos C9 e C10 é abreviado 18:1(Δ^9). O prefixo *cis* ou *trans* indica a configuração geométrica da molécula, em grande parte dos ácidos graxos insaturados que ocorrem naturalmente as ligações duplas encontram-se na configuração *cis* (NELSON; COX, 2011; VANCE; VANCE, 2008).

Os triglicerídeos, ou triacilgliceróis são os lipídios mais abundantes no citoplasma das células dos mamíferos e estão armazenados na forma de gotículas (AARDEMA et al., 2011). Esses lipídios têm como principais funções o armazenamento de energia (STURMEY et al., 2009) e o isolamento térmico contra baixas temperaturas (principalmente em animais hibernantes). São compostos por três ácidos graxos (iguais ou não), unidos a uma molécula de glicerol, são moléculas apolares, hidrofóbicas, essencialmente insolúveis em água.

Já os fosfolipídios são os principais constituintes das membranas celulares eucarióticas, tendo papel importantíssimo na fluidez e permeabilidade das mesmas (VAN MEER et al., 2008). Nos fosfolipídios há apenas duas moléculas de ácidos graxos de natureza apolar unida a dois carbonos do glicerol por ligações éster. O terceiro componente é um grupo fosfato que se une ao carbono do glicerol por uma ligação fosfodiéster (polar). Assim, cada fosfolipídio contém uma porção hidrofóbica representada pelos ácidos graxos e uma porção hidrofílica corresponde ao grupo fosfato e às moléculas a ele associadas. Cada membrana é constituída por uma dupla

camada fosfolipídica organizada de modo que as cabeças hidrofílicas (fosfatos polares) fiquem viradas para o exterior da membrana e as caudas hidrofóbicas (ácidos graxos apolares) para o interior, permitindo com que a membrana seja seletiva (ALBERTS et al., 2002).

Outros lipídios também desempenham papéis como cofatores enzimáticos, transportadores de elétrons, âncoras hidrofóbicas para proteínas, chaperonas para auxiliar no dobramento das proteínas de membrana, hormônios e mensageiros intracelulares (VANCE; VANCE, 2008).

2.3.1. Biossíntese dos ácidos graxos

Nas células eucarióticas a biossíntese dos ácidos graxos ocorre no citosol. O principal precursor para que ocorra a biossíntese dos ácidos graxos é a acetil-coA formada na matriz mitocondrial. Para que a acetil-coA seja utilizada é necessário que passe através da membrana mitocondrial até o citosol. Porém, para que consiga atravessar esta membrana ela necessita reagir com o oxaloacetato (por ação da citrato sintase) e liberar uma CoA (coenzima A), produzindo um citrato. O citrato atravessa a membrana mitocondrial, e no citosol por ação da citrato-liase é clivado, regenerando a acetil-coA e oxaloacetato (reação dependente de ATP). O oxaloacetato é convertido em malato e este posteriormente em piruvato que irá retornar à matriz mitocondrial. Nesta reação que transforma o malato em piruvato também há produção de um $\text{NADPH} + \text{H}^+$, que posteriormente irá fornecer elétrons na síntese dos ácidos graxos (Figura 6) (MARZZOCO; TORRES, 2007).

A formação dos ácidos graxos se dá pelo acréscimo de carbonos (de 2 a 2) ao acetil-coA até atingir 16 carbonos, formando o ácido palmítico. Os dois primeiros carbonos da cadeia sempre são provenientes do acetil –coA e os demais do malonil-coA. O malonil-coA é originado a partir da adição de um CO_2 à molécula de acetil-coA, esta reação é catalisada pela acetil-coA carboxilase que é ativada quando os níveis de citrato no citosol estão elevados (TONG, 2005).

Esta adição de carbonos se dá pela ação do complexo multienzimático chamado ácido graxo sintase (AGS), composto por uma cadeia polipeptídica multifuncional. Nos mamíferos, a AGS apresenta sete diferentes domínios; cetoacil sintase (KS), malonil/acetiltransferase (MAT), desidratase (DH), enoíl redutase (ER),

cetoacil redutase (KR), proteína carreadora de acila (ACP) e tioesterase (TE). Estes domínios atuam como enzimas distintas, porém ligadas. O sítio ativo de cada enzima é localizado em domínios separados dentro do mesmo polipeptídeo (CHIRALA; WAKIL, 2004).

Antes de iniciarem as reações para construção da cadeia do ácido graxo, é necessário que os dois grupos tióis (-SH) do complexo enzimático sejam carregados, ativando os grupamentos acila e malonila. Primeiramente o grupamento acetil da acetil-coA é transferido para o tiol localizado no domínio ACP, este, em seguida é transferido para o tiol localizado no domínio KS, liberando o tiol do domínio ACP para que o grupamento malonila (da malonil-coA) também se ligue. Dessa maneira, o complexo ácido graxo sintase está pronto para o início das quatro etapas necessárias para que haja o alongamento da cadeia carbonada (Figura 7). Na etapa de condensação o grupamento malonil perde um CO₂, e em seguida o acetil é transferido do tiol KS para a malonila ligada ao tiol ACP, formando um grupamento acetoacetila. Este átomo de carbono do CO₂ é o mesmo introduzido originalmente na formação da malonil-coA, dessa forma a ligação do CO₂, bem como o gasto de ATP são transitórios. Logo, ocorre a redução do grupo carbonil. Nesta etapa a acetoacetila sofre uma redução do grupo carbonil, sendo que o doador de elétrons é o NADPH + H⁺. A terceira etapa é a de desidratação, quando ocorre a saída de uma molécula de água da cadeia carbonada, formando a *trans*- Δ^2 -butenoil-ACP. Por fim, na quarta etapa, redução da ligação dupla. Quando o NADPH + H⁺ fornece elétrons para que haja a redução da dupla ligação existente na *trans*- Δ^2 -butenoil-ACP, transformando em butiril-ACP (com quatro carbonos). O grupo butirila é transportado para o tiol do domínio KS, liberando o tiol do domínio ACP para que outra vez um grupamento malonila (da malonil-coa) se ligue dando origem a um novo ciclo de quatro etapas. Após sete ciclos de condensação e redução é formada a palmitoila-ACP, com 16 carbonos. Então, o palmitato é liberado do domínio ACP pela ação da tioesterase (produzida no domínio TE). O palmitato, por sua vez é o principal precursor de outros ácidos graxos de cadeia longa. Para tal sua cadeia carbonada deve sofrer alongamento pela ação do sistema de alongamento de ácidos graxos presente no retículo endoplasmático liso. Neste sistema, apesar de ocorrer no RE e estarem envolvidos diferentes sistemas enzimáticos, o mecanismo de alongamento da cadeia carbonada é semelhante ao da formação do palmitato (NELSON; COX, 2011; VANCE; VANVE, 2008).

Na formação do triacilgliceróis, as três hidroxilas do glicerol se unem as carboxilas dos ácidos graxos por ligações do tipo éster, liberando uma molécula de água. Quando os três ácidos graxos são iguais o triacilglicerol é simples, do contrário é considerado misto (MARZZOCO; TORRES, 2007).

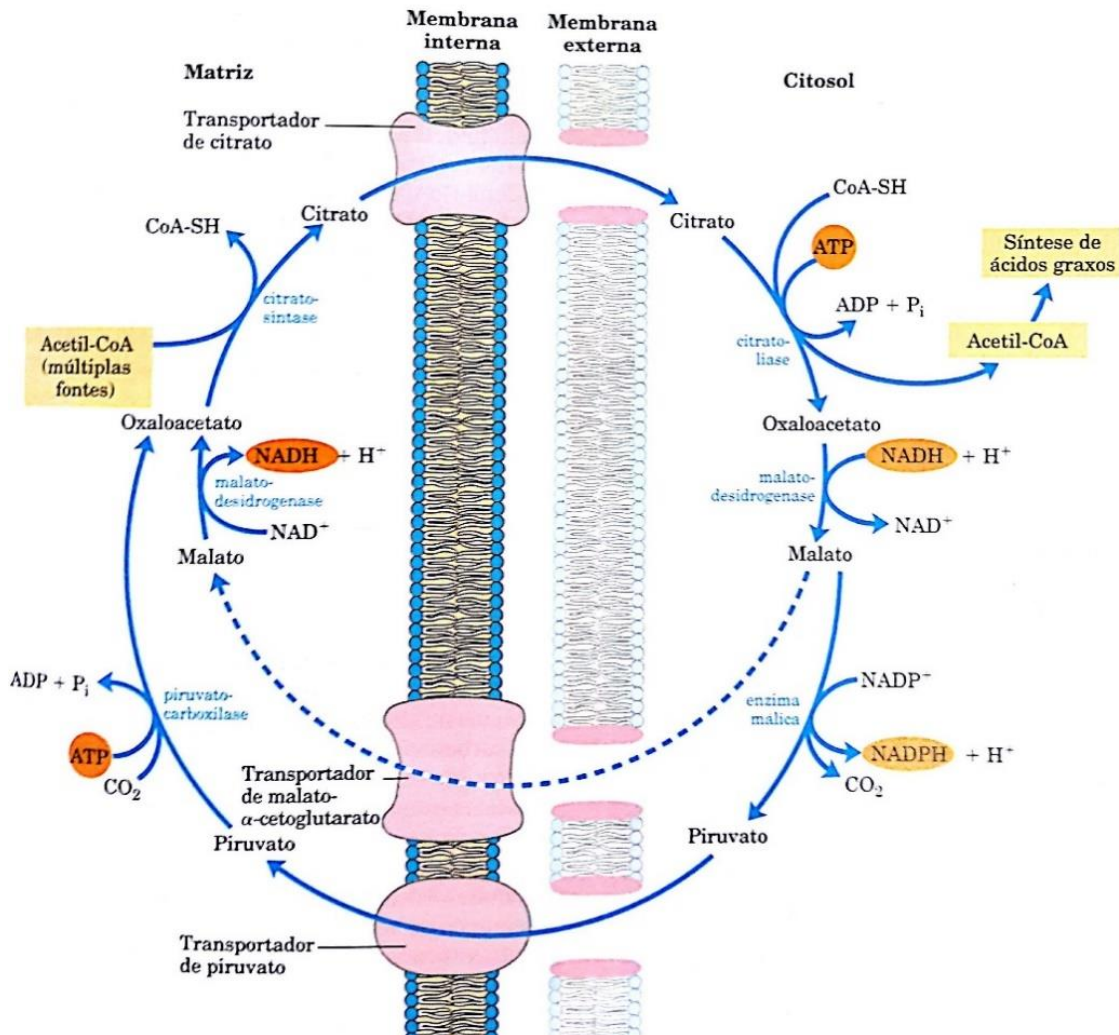


Figura 6: Transferência dos grupamentos acetil, da mitocôndria para o citosol celular (NELSON e COX, 2011).

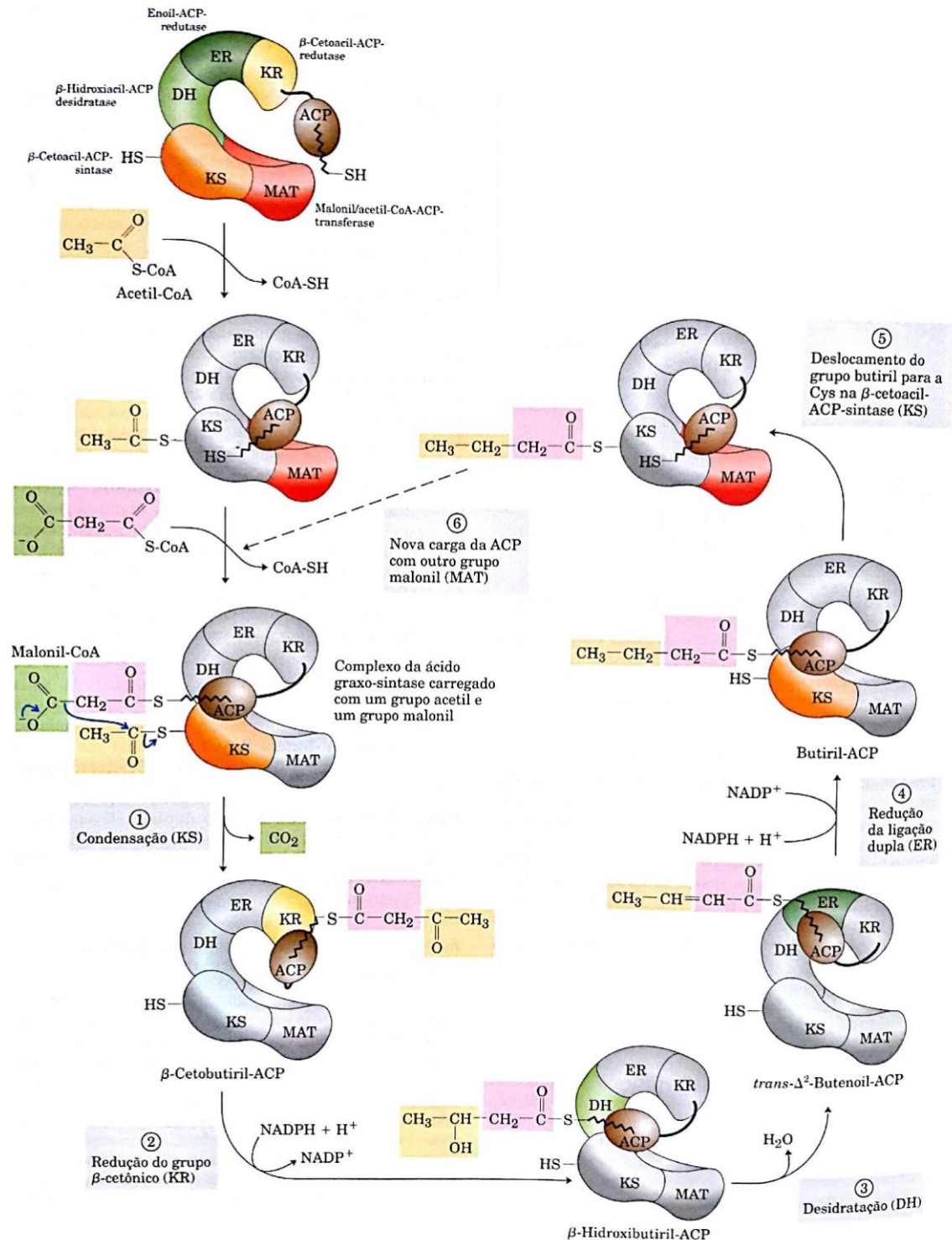


Figura 7: Sequência de eventos durante a síntese dos ácidos graxos (NELSON e COX, 2011).

2.3.2. A importância dos lipídios na maturação oocitária e desenvolvimento embrionário

Embora diversos estudos sobre o metabolismo energético em oócitos e embriões de mamíferos têm-se centrado sobre o consumo e utilização de nutrientes exógenos fornecidos no meio de cultivo, como piruvato, glicose e aminoácidos, a influência das reservas intracelulares de energia, particularmente dos ácidos graxos ainda é um complexo e amplo campo de investigações a ser explorado (STURMEY et al., 2009).

Os lipídios são de suma importância na vida celular. Os triglicerídeos, ou triacilgliceróis são os mais abundantes no citoplasma das células dos mamíferos e estão armazenados na forma de gotículas (AARDEMA et al., 2011). Esses lipídios têm como principal função o armazenamento de energia para oócitos e embriões (STURMEY et al., 2009). Já os fosfolipídios participam na formação das membranas celulares eucarióticas, tendo papel importantíssimo na fluidez e permeabilidade das mesmas, porém a sua influência na criopreservação ainda é pouco estudada (VAN MEER et al., 2008).

Há uma variação muito grande na quantidade e tipo de ácidos graxos que compõe os lipídios presentes nos oócitos e embriões das diferentes espécies. Uma das hipóteses adotadas para explicar a quantidade de lipídios nos oócitos e embriões é de que quanto maior for o tempo entre a ovulação e a implantação embrionária, mais energia para sua manutenção é necessária, dessa forma a quantidade de lipídio acumulado seria maior nestas espécies (STURMEY et al., 2009). Oócitos e embriões murinos contêm pouca quantidade de lipídios (LOEWENSTEIN; COHEN, 1964), os humanos apresentam quantidade intermediária (MATORRAS et al., 1998), e os felinos, caninos (GURAYA, 1965), suínos, bovinos e ovinos (MCEVOY et al., 2000; MCKEEGAN; STURMEY, 2012) apresentam grande acúmulo lipídico em seus oócitos e embriões.

Estudos comparando a quantidade e características dos lipídios encontrados nos oócitos relatam que os suínos possuem maior teor de ácidos graxos $161 \pm 18 \mu\text{g}$ por amostra (1000 oócitos). Destes, $74,25 \mu\text{g}$ de triacilgliceróis e $40,9 \mu\text{g}$ de fosfolipídios. Seguido dos ovinos com o total de $89 \pm 7 \mu\text{g}$ de ácidos graxos, destes $24,95 \mu\text{g}$ de triacilgliceróis e $24,6 \mu\text{g}$ de fosfolipídios. E em terceiro, pelos bovinos com

63 ± 6µg total, sendo 22,95µg de triacilglicerois e 17,95µg de fosfolipídios (MCEVOY et al., 2000).

De maneira geral, nos oócitos destas três espécies já foram identificados 24 ácidos graxos diferentes, no entanto, há maior proporção dos ácidos graxos palmítico, oleico, esteárico e linoleico, respectivamente. Porém, ao analisar isoladamente os fosfolipídios, foi observado que os oócitos suínos são mais ricos em ácido oleico e linoleico do que palmítico e esteárico, e que existe proporção de aproximadamente quatro vezes mais ácido linoleico nestes oócitos do que nas demais espécies. Já nos triglicerídeos dos ruminantes foi identificado proporção maior de ácido oleico do que palmítico, diferente dos suínos (MCEVOY et al., 2000).

Algumas tentativas utilizando dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3 e ômega 6) foram realizadas com intuito de modificar o padrão dos ácidos graxos presentes nos oócitos de bovinos e ovinos. Foi observado que há aumento destes ácidos graxos poli-insaturados no fluido folicular e nas células do cumulus, no entanto não houve quaisquer alterações no padrão lipídico dos oócitos (LEROY et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

Esta reserva lipídica deverá suprir as necessidades energéticas requeridas durante os processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, através da oxidação dos ácidos graxos para produção de ATP. Durante a oogênese, desde a progressão do folículo primordial até o estágio de metáfase II ocorrem muitas modificações, envolvendo períodos de crescimento e de alterações nucleares e citoplasmáticas, havendo vários momentos em que os oócitos podem acumular lipídios, porém não se sabe exatamente quando esta deposição ocorre (STURMEY et al., 2009).

Pode haver grande variação na quantidade de gotículas lipídicas entre os diferentes oócitos coletados de um mesmo ovário. Este fato reforça a ideia de que os oócitos tendem a acumular reserva lipídica durante a pré-maturação (AARDEMA et al., 2008).

A produção de energia via metabolização de carboidratos pelos oócitos e embriões é bem conhecida (SUTTON et al., 2003). Porém, os embriões pré-compactação têm pouca capacidade de utiliza-la (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012). Além disso, a oxidação completa de uma molécula de glicose produz cerca de 30 moléculas de ATP (RICH, 2003). Em contrapartida a oxidação completa do ácido graxo palmitato, por exemplo, gera 106 moléculas de ATP (DUNNING et al., 2012).

Durante a maturação oocitária há diminuição na quantidade de triacilgliceróis, simultânea com a migração mitocondrial da periferia para a região cortical destes oócitos. Por este motivo, acredita-se que a partir do momento em que os oócitos perdem a ligação com as células foliculares passam a utilizar uma fonte de energia intracelular para produção de ATP necessário durante a síntese proteica, retomada da meiose e maturação citoplasmática (KIM et al., 2001; FERGUSON; LEESE, 1999).

Após a maturação, a quantidade de lipídios se mantém estável durante a fertilização até a fase embrionária de oito células. Os triacilgliceróis são os lipídios mais sintetizados e estocados tanto em embriões produzidos *in vivo* quanto *in vitro*. Estes representam aproximadamente 40 a 50% do total de lipídios nos embriões bovinos produzidos *in vivo*, seus níveis se mantêm praticamente constantes até o estágio de blastocisto, e a maioria das gotículas encontram-se localizadas na massa celular interna. Nos embriões produzidos *in vitro*, dependendo do meio utilizado, a quantidade de triacilgliceróis pode chegar a até 88% do total de lipídios, havendo aumento na sua proporção a partir de oito células até o estágio de blastocisto eclodido, com o conteúdo lipídico disperso tanto na massa celular interna quanto no trofoblasto (FERGUSON; LEESE, 1999; SUDANO et al., 2012).

A diferença na quantidade de lipídios acumulados e no perfil dos ácidos graxos de embriões bovinos de distintas subespécies (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) influenciando na sua criotolerância, foi relatado por Sudano et al. (2012). Inicialmente foi observado que os embriões *Bos taurus taurus* apresentavam maior acúmulo lipídico, contudo estes tiveram melhor sobrevivência aos processos de criopreservação do que os embriões *Bos taurus indicus*. Ao realizar a espectrometria de massa nestes embriões, foi identificado que o ácido graxo mais abundante nos *Bos taurus taurus* é o linoleico, diferente dos *Bos taurus indicus* que são mais ricos em ácido palmítico e esteárico.

Um dos principais indicativos da capacidade dos embriões produzirem ATP é a medição do consumo de oxigênio. Em embriões murinos o consumo de oxigênio permanece relativamente constante desde o estágio de zigoto até mórula, aumenta consideravelmente na fase de blastocisto e após a implantação diminui novamente (HOUNGHTON et al., 1996). Já em bovinos foi observado que o consumo de oxigênio durante a maturação dos oócitos é maior do que no estágio de blastocisto, provavelmente devido a exigência maior de energia requerida nesta etapa (STOJKOVIC et al., 2001).

Ao utilizar metil palmoxirato, ou etomoxir (inibidores da oxidação dos ácidos graxos, por inibição do circuito da carnitina que promove a entrada de acil graxo-coA nas mitocôndrias) durante a maturação de oócitos, houve diminuição no consumo de oxigênio durante a maturação nos grupos tratados (0,45nl/oócito/h) em relação ao controle ($1.0 \pm 0,05$ nl/oócito/h). Redução em aproximadamente 50% na taxa de clivagem, na porcentagem de blastocistos formados, bem como na quantidade de células totais (FERGUSON; LEESE, 2006).

Quando o metil palmoxirato foi usado somente durante o cultivo de desenvolvimento embrionário, também houve diminuição na porcentagem de blastocistos formados e na quantidade de células totais. O consumo de oxigênio nos embriões em estágio de 5 a 8 células era menor nos grupos tratados, já na fase de blastocisto (sétimo dia de cultivo) não houve diferença entre os grupos experimentais (FERGUSON; LEESE, 2006; DUNNING et al., 2010).

A influência das fontes proteicas utilizadas nos meios de produção *in vitro* de embriões, principalmente durante o desenvolvimento embrionário na deposição lipídica também tem sido alvo de diversos estudos. Todavia os mecanismos do acúmulo lipídico no citoplasma destes embriões ainda não estão bem esclarecidos (GOMEZ et al., 2008; SUDANO et al., 2011).

Existem hipóteses para o aumento destes teores de lipídios, principalmente em embriões cultivados com meios contendo SFB. Uma delas é que as lipoproteínas do soro são absorvidas pelas células embrionárias. Assim como ocorre *in vivo*, em que os ácidos graxos existentes nos fluidos do oviduto e útero são incorporados pelos embriões (TSUJII et al., 2001), os embriões produzidos *in vitro* também podem facilmente incorporar ácidos graxos presentes nos meios de cultivo de desenvolvimento (ABE et al., 2004; DIEZ et al., 2001). SATA et al. (1999) confirmaram que em embriões produzidos na presença de SFB o perfil dos ácidos graxos foi mais próximo ao encontrado no SFB (Palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico) do que nos embriões cultivados sem SFB (mirístico, palmítico e esteárico).

Enquanto a concentração de triacilgliceróis contidos nos embriões produzidos *in vivo* permanece estável desde o estágio de duas células até blastocisto, nos embriões produzidos *in vitro*, cultivados em meios contendo 10% de SFB as reservas de triacilgliceróis podem dobrar desde o estágio de quatro células até blastocisto (FERGUSON; LEESE, 1999).

Outra hipótese é de que normalmente os lipídios serviriam como fonte de energia sendo substrato para a formação de ATP via β -oxidação dos ácidos graxos nas mitocôndrias durante o desenvolvimento embrionário. Nos embriões produzidos *in vitro* em meios suplementados com SFB cerca de 70% das mitocôndrias apresentam características de imaturidade como cristas periféricas e formato circular, contra aproximadamente 10% em embriões cultivados em meios livres de SFB (FAIR et al., 1997; ABE et al., 2002). Com apenas 30% da capacidade mitocondrial em funcionamento, ocorre um desequilíbrio na β -oxidação dos ácidos graxos e consequentemente, aumento no acúmulo lipídico (CROSIER et al., 2001).

SUDANO et al. (2011) relataram a correlação entre diferentes concentrações de SFB (10%, 5% e 2,5%) utilizadas nos meios de cultivo embrionário com a taxa e produção de embriões, quantidade de lipídios acumulados, índice de apoptose e criosobrevivência de blastocistos bovinos. Foi observado que quanto mais elevada a concentração de SFB, melhores foram as taxas de produção de blastocistos, maior acúmulo lipídico, níveis de apoptose mais elevados e piores índices de sobrevivência à criopreservação. Exceto o grupo cultivado com 2,5% SFB que apresentou taxas de apoptose semelhantes ao grupo cultivado sem SFB. Os embriões produzidos *in vivo* apresentaram menores níveis de apoptose, menos conteúdo lipídico e melhores índices de sobrevivência à criopreservação do que todos os grupos produzidos *in vitro* (0%, 2,5%, 5% e 10% de SFB).

2.4. O uso de reguladores metabólicos na produção de embriões

Os embriões bovinos produzidos *in vitro* são mais sensíveis à criopreservação em relação aos produzidos *in vivo* (SUDANO et al., 2011). Uma das razões relacionada a este fato é o excessivo conteúdo lipídico encontrado nestes embriões PIV (ABE et al., 2002), no entanto, não se sabe qual exatamente é o mecanismo que causa este problema. Foi sugerido que os principais motivos sejam as alterações na fluidez e função da membrana plasmática que acarretam em complicações relacionadas à permeabilidade celular aos crioprotetores (desidratação e reidratação celular), bem como o isolamento térmico promovido pelos lipídios contra as baixas temperaturas que acabam interferindo na velocidade de perda do calor durante o processo de criopreservação (KIM et al., 2001; SUDANO et al., 2012) e também que

a peroxidação dos lipídios produza radicais livres acentuando o processo de morte embrionária (BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL Jr, 2007b).

Buscando reduzir o conteúdo lipídico nestes embriões PIV, foram realizadas diversas tentativas de delipidação dos mesmos, por meio de métodos mecânicos e/ou químicos. Utilizando os métodos mecânicos como a centrifugação, micromanipulação e aplicação de laser na zona pelúcida dos embriões foi possível a retirada das gotas lipídicas (USHIJIMA et al., 1999; DIEZ et al., 2001; PRYOR et al., 2011), porém quando se trata de produção e criopreservação de embriões em larga escala essas técnicas se tornam inviáveis e que comercialmente não seria permitido por serem técnicas invasivas, em que se promove lesões na zona pelúcida destes embriões. Uma alternativa que está demonstrando ser eficaz na diminuição do conteúdo lipídico dos embriões PIV sem lesionar a zona pelúcida é o uso de reguladores metabólicos (SEIDEL Jr, 2006; BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL Jr, 2007). A suplementação do meio de cultivo com reguladores metabólicos visa estimular a utilização destes lipídios na produção de energia necessária aos embriões ao longo do seu desenvolvimento. Dessa forma, seria possível produzir embriões de melhor qualidade, mais resistentes aos processos de criopreservação e conseqüentemente melhores taxas de concepção.

2.4.1. L-Carnitina (CA)

Estudos relatam a correlação entre a qualidade dos oócitos e embriões cultivados *in vitro* com a capacidade de metabolização dos ácidos graxos acumulados. A importância desta metabolização dos ácidos graxos está na síntese de ATP, suficiente para suportar as necessidades energéticas durante os processos de crescimento, meiose, fertilização e embriogênese (VAN BLERKOM et al., 1995; STOJKOVIC et al., 2001; COMBELLES; ALBERTINI, 2003; NAGANO et al., 2006). Os ácidos graxos são armazenados nas células como gotículas de triglicerídios cercadas por lipídios. Para que ocorra a produção de ATP, estes triglicerídios necessitam ser catabolizados por lipólise, processo em que as enzimas lipase atuam clivando os ácidos graxos em glicerol e ácidos graxos, e estes, nas mitocôndrias sofrem metabolização através de β -oxidação.

Quem regula a entrada dos ácidos graxos, na forma de acil graxo-coA na mitocôndria é a L-carnitina. Dessa maneira, a carnitina-acil-transferase I faz a primeira passagem do acil graxo para o espaço intermembrana da mitocôndria, e a carnitina-acil-transferase II faz a passagem do acil graxo para a matriz mitocondrial (DUNNING, et al., 2012; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012).

Além da carnitina desempenhar uma função crucial na oxidação dos ácidos graxos, também tem propriedade antioxidante, atribuída à sua capacidade de melhorar funções mitocondriais (MINGORANCE et al., 2011). Em diversas espécies a utilização de L-carnitina nos meios de cultivo de folículos, maturação oocitária e cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro* tem apresentado efeito benéfico nas taxas de maturação nuclear (meiose II) dos oócitos, taxas de fertilização, clivagem dos embriões, taxas de produção embrionária e quantidade de células presentes na massa celular interna de blastocistos, além da redução no conteúdo lipídico de embriões (DUNNING et al., 2010; SOMFAI et al., 2011; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012).

A adição de L-carnitina durante o cultivo de folículos pré-antrais de camundongos, além de incrementar os níveis de β -oxidação também aumentou a atividade mitocondrial (DUNNING et al., 2011). Os oócitos, recuperados destes folículos tratados, apresentaram melhores taxas de maturação (metáfase II / MII), taxas de fertilização e aumento na proporção de blastocistos formados (DUNNING et al., 2011; HASHIMOTO, 2009).

Oócitos suínos maturados em 1,25 mg / mL de L-carnitina apresentaram mais mitocôndrias ativas, menor número de gotículas de lipídios e diminuição de espécies reativas do oxigênio (ROS) em comparação com oócitos maturados na ausência de carnitina (SOMFAI et al., 2011). Em outro trabalho, utilizou-se 0,5 mg / mL de L-carnitina e também houve melhora na maturação nuclear e taxa de blastocistos formados, além de reduzir as concentrações de radicais livres (WU et al., 2011).

Chankitisakul et al. (2013) utilizaram L-carnitina na dose de 0,6mg/mL durante as 21 horas do cultivo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Parte destes oócitos foram vitrificados e desvitrificados, logo, foram fertilizados e cultivados conforme os protocolos padrão de produção *in vitro* utilizados no laboratório. Não foi observada variação na taxa de maturação dos oócitos. Todavia, no grupo tratado com carnitina houve migração das gotas lipídicas da região periférica em direção ao centro dos oócitos. Foi notado que o processo de criopreservação causou decréscimo na

viabilidade celular, levando a diminuição na taxa de clivagem nos grupos de oócitos vitrificados em relação aos frescos (tratados e controle). Contudo, a taxa de blastocistos no grupo tratado com carnitina e vitrificado não diferiu dos grupos não vitrificados; já no controle vitrificado foi inferior.

Com o intuito de testar se somente a β -oxidação dos ácidos graxos é capaz de prover a energia necessária para o desenvolvimento embrionário, Sutton-mcdowall et al. (2012) testaram no cultivo de embriões produzidos *in vitro* o uso de meios com L-Carnitina na presença ou não de carboidratos (glicose, piruvato e lactato). No grupo em que não foram utilizados carboidratos e carnitina, houve clivagem mas os embriões não chegaram ao estágio de mórula. Quando foi utilizado carboidratos e a dose de carnitina foi de 1mM, a produção foi muito baixa. Porém, ao aumentar a dose de carnitina para 5mM, mesmo sem carboidratos houve acréscimo de aproximadamente 15% na produção de mórulas, demonstrando que o ATP produzido pela β -oxidação dos ácidos graxos, na presença de carnitina é capaz de prover o aporte energético necessário no desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2.4.2. Forskolina (FO)

Os reguladores metabólicos também podem atuar estimulando a lipólise intracelular (MORIMOTO et al., 2001). A hidrólise dos lipídios é catalisada pela lipase endógena (LONDOS et al., 1999), que por sua vez é estimulada por hormônios como glucagon e catecolaminas e atenuada pela melatonina e insulina (HOLM, 2003). Os hormônios se ligam aos seus receptores na membrana celular, ativando a adenilato ciclase, que por sua vez estimula o segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e a proteína kinase (PK) dependente de AMPc. Esta PK, por fosforilação ativa a lipase (LONDOS et al., 1999). A lipase ativa se desloca do citoplasma para as gotículas lipídicas e catalisa a hidrólise enzimática das gotículas de lipídio intracelulares (KRAEMER et al., 2002; BIRNBAUM, 2003).

A forskolina (7 β -acetoxi-8,13-exepoxi-1 α ,6 β ,9 α -triidroxi-Labd-14-en-11-one, C₂₂H₃₄O₇), deriva da família dos dipertenos (BILODEAU-GOESELS, 2006), age ativando a adenilato ciclase (HO; SHI, 1982), causando a elevação do AMPc (OTMAKHOV et al., 2004; MCEWAN, et al., 2007; GOMIS et al., 2013). Na PIV de

embriões, a forskolina tem sido utilizada como modulador da maturação oocitária e principalmente como agente lipolítico (MEN et al., 2006).

A utilização de forskolina durante a maturação *in vitro* de oócitos tem sido uma ferramenta importante tanto na tentativa de sincronizar a maturação nuclear e citoplasmática, quanto na diminuição do conteúdo lipídico dos mesmos (FU et al., 2011).

MEN et al. (2006), relataram que ao utilizar 10 μ M de forskolina durante as 24 horas finais no cultivo de desenvolvimento *in vitro* em embriões suínos, obtiveram redução no conteúdo lipídico e melhora nos índices de sobrevivência aos processos de criopreservação. A atividade lipolítica da forskolina foi confirmada nesse estudo pela identificação de aumento nos níveis de glicerol intracelular nos embriões do grupo tratado em comparação ao controle. Usualmente a atividade lipolítica intracelular pode ser monitorada pela quantificação dos níveis de glicerol formado pela hidrólise dos triacilgliceróis (WARNICK, 1986).

Partindo dos resultados obtidos com suínos, surgiram novos estudos utilizando a forskolina durante o cultivo de desenvolvimento embrionário em bovinos. Diversas foram as maneiras de utilização de forskolina, doses de 10 μ M e 40 μ M, e momentos durante o cultivo embrionário, por 168, 48, 24 ou 12 horas finais do desenvolvimento. Os resultados confirmam a atividade lipolítica descrita na literatura com a redução do conteúdo lipídico nos embriões, sem causar diminuição nas taxas de produção. No entanto, não houve melhora na sobrevivência embrionária à criopreservação dos grupos tratados (PASCHOAL et al., 2010; PRYOR et al., 2008, SANCHES et al., 2013). Interessante foi que ao transferir os embriões bovinos reaquecidos, produzidos na presença de forskolina (10 μ M, por 48 horas), houve aumento de aproximadamente 30% na taxa de prenhez (SANCHES et al., 2013).

2.4.3. Ácido linoleico (CLA)

Os conjugados do ácido linoleico (CLA) são grupos de isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecadienoico (HUR et al., 2007). São produzidos a partir da biohidrogenação bacteriana no rúmen (KEPLER et al., 1966). Os mais abundantes são encontrados nas posições cis-9, trans-10, trans-11 e cis-12, são encontradas naturalmente em produtos lácteos e carne de ruminantes (BANNI et al., 2004).

Diversos trabalhos têm salientado os efeitos biológicos e fisiológicos do uso de CLA, suas propriedades antioxidantes (HUR et al., 2004), anticarcinogênicas (IP et al., 1994), antiteratogênicas (NICOLOSI et al., 1997), imunomoduladora (COOK et al., 1993) e também sua capacidade de atuar na redução de gordura em modelos animais (DUGAN et al., 1997; PARK et al., 1997).

Foi demonstrado que o CLA *trans-10; cis-12* (*t-10; c-12*) exerce efeitos específicos sobre os adipócitos suprimindo a expressão de determinados genes que codificam enzimas envolvidas na síntese dos ácidos graxos (PETERSON et al, 2003; GRANLUND et al., 2005), assim como na atividade da lipoproteína lipase (PARK et al., 1999). Consequentemente, CLA *t10, c12* inibe a síntese e absorção de ácidos graxos, resultando em perda líquida de triacilgliceróis.

A utilização dos isômeros *cis-9; trans-11* e *trans-10; cis-12* nas doses de 50, 100 e 200 µM, durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos ativados partenogeneticamente, não alterou as taxas de maturação, clivagem e tampouco de produção de blastocistos. Já quando as mesmas doses foram utilizadas durante a maturação e cultivo de desenvolvimento embrionário, o tratamento com 50 µM do *trans-10; cis-12* foi o grupo que apresentou melhor índice de maturação em relação ao controle, no entanto, os demais grupos (100 µM do *trans-10; cis-12*, 200 µM do *trans-10; cis-12*, 50 µM do *cis-9; trans-11*, 100 µM do *cis-9; trans-11*, 200 µM do *cis-9; trans-11*) apresentaram taxa de maturação inferior ao controle. Ao avaliar a taxa de blastocistos formados, notou-se que quanto maior a dose de CLA utilizada (tanto *cis-9; trans-11* como *trans-10; cis-12*), menor era a produção embrionária (ABSALON-MEDINA et al., 2013). Neste mesmo estudo, ao utilizarem os isômeros (*cis-9; trans-11* e *trans-10; cis-12*) isoladamente, durante as 36 horas finais do cultivo de desenvolvimento *in vitro* dos embriões (desta vez fertilizados), houve melhora nas taxas de produção e reexpansão embrionária pós vitrificação.

Pereira et al. (2007) demonstraram que embriões bovinos mesmo cultivados na presença de SFB, com a utilização de *t10, c12* apresentaram redução na deposição de lipídios intracitoplasmáticos e melhores taxas de sobrevivência embrionária à criopreservação do que aqueles obtidos com meio definido sem soro, embora estes embriões tenham apresentado menor acúmulo de lipídios, quando comparado ao cultivo embrionário com SFB sem CLA. Pereira et al. (2008) relatam que ao utilizar 100µM de CLA *trans10, cis12* em associação ao SFB durante o cultivo de

desenvolvimento embrionário, foi observada a melhora na criotolerância dos embriões sem que houvesse prejuízo nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos.

Além de reduzir a quantidade de lipídio acumulada no citoplasma, o *t10*, *c12* CLA também pode contribuir na melhora da fluidez da membrana celular dos embriões, através das modificações dos ácidos graxos saturados e insaturados (PARK et al., 1999, 2004; ALASNIER et al., 2002).

2.5. Criopreservação de embriões

A criopreservação embrionária tem como principal objetivo possibilitar o armazenamento de material genético, garantindo a manutenção da sua viabilidade por período de tempo indeterminado (WHITTINGHAM, 1980; MAZUR, 1984). Este armazenamento se dá em baixas temperaturas (em nitrogênio líquido à -196°C), as quais permitem manter o metabolismo celular em estado de quiescência até que seja reaquecido.

A criopreservação de embriões começou a se tornar realidade a partir da década de 70, mais precisamente em 1971 quando Whittingham e colaboradores conseguiram os primeiros produtos com a transferência de embriões de camundongos criopreservados. No entanto, em bovinos há relatos de criopreservação embrionária a partir de 1973 (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

Atualmente com o desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões bovinos a criopreservação se tornou ferramenta indispensável, proporcionando várias vantagens, tais como a armazenagem dos embriões produzidos *in vitro* excedentes ao número de receptoras sincronizadas para a transferência, utilização de receptoras em cio natural, planejamento da transferência dos embriões de acordo com o período de nascimento dos bezerros conforme o manejo da propriedade, a formação de bancos de germoplasma (com preservação de espécies ou raças em extinção) e, principalmente, facilitar a comercialização (importação e exportação) dos embriões.

Apesar da criopreservação de embriões ser uma técnica estudada há aproximadamente quatro décadas e de ter avançado muito, ainda segue sendo um desafio estabelecer um método eficaz, prático e de baixo custo para criopreservar os embriões produzidos *in vitro* (POLLARD; LEIBO, 1994). Estudos relatam alta sensibilidade e a baixa sobrevivência dos embriões PIV em relação aos produzidos *in*

vivo (MARTÍNEZ et al., 2002). Segundo Viana e Camargo (2007), a baixa taxa de prenhez pós-descongelamento é a principal justificativa para somente 3,7% do total de embriões PIV no Brasil serem criopreservados.

As duas metodologias mais utilizadas para criopreservar embriões bovinos são a congelamento tradicional e a vitrificação. No entanto, ultimamente na criopreservação de embriões PIV, a vitrificação vem sendo mais estudada na busca de aprimorar os resultados obtidos com a congelamento, pois quando se comparam os dois métodos, a vitrificação tem demonstrado melhores resultados nas taxas de sobrevivência embrionária pós-descongelamento (DINNYÉS et al., 1996; GÓMES et al., 2008; ARAV, 2014). Provavelmente a principal causa seja em função do excessivo tempo de exposição à faixa térmica (entre 20 e 10°C) correspondente à fase de solidificação dos lipídios (ZENON et al., 1999; GORDON, 2003) durante a congelamento, e na vitrificação a alta velocidade de resfriamento e aquecimento proporcionam passagem muito rápida por essa faixa crítica de temperatura.

Um dos mais importantes princípios da criobiologia é a remoção da água intracelular antes de iniciar o processo de congelamento. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formam lesando severamente a estrutura celular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria aos embriões (GONÇALVES et al., 2008). Essa remoção da água intracelular é realizada através dos crioprotetores que desidratam as células pela diferença de osmolaridade (GORDON, 2003).

Assim como os cristais de gelo intra e extracelulares podem lesionar membranas e organelas celulares durante o resfriamento dos embriões, outras crioinjúrias como a toxicidade química pelos crioprotetores e lesão osmótica pela desidratação inadequada também podem ocorrer ao longo do procedimento de criopreservação (KASAI et al., 2002). Deste modo, há necessidade de buscar o equilíbrio entre a velocidade na curva de congelamento e o tempo de exposição aos crioprotetores, ocorrendo adequada desidratação prevenindo a formação de cristais de gelo e, ao mesmo tempo, minimizando o efeito tóxico pela demasiada exposição aos crioprotetores (CAMPOS-CHILLON et al., 2006).

Segundo Vajta e Kuwayama (2006) as crioinjúrias, bem como as diferenças na sobrevivência e as taxas de desenvolvimento embrionário pós reaquecimento podem ser altamente variáveis, dependendo da espécie, estágio de desenvolvimento e da origem dos embriões criopreservados (obtidos *in vivo* ou produzidos *in vitro*).

As diferenças morfológicas entre embriões taurinos e zebuinos são demonstradas por Visintin et al. (2002) que relataram a existência de maior quantidade de lipídios intracelular nos embriões *Bos taurus taurus* obtidos *in vivo*. No entanto, embriões *Bos taurus taurus* oriundos de produção *in vitro*, apresentaram maiores taxas de reexpansão e eclosão quando comparados aos embriões *Bos taurus indicus*, criopreservados pelos métodos convencional de congelação e vitrificação (VARAGO, 2006; VIEIRA et al., 2006), provavelmente devido a diferença de perfil lipídico encontrado nos embriões destas duas subespécies (SUDANO et al., 2012).

Quanto ao estadio de desenvolvimento embrionário, a fase de blastocisto é preferencial para a criopreservação de embriões bovinos. Dois são os principais fatores: a maior proporção nucleo-citoplasma e o maior número de células, neste caso se houver lesão em alguma célula ainda assim há recuperação embrionária (MENEZO, 2004). Ao vitrificar blastocistos em diferentes fases de desenvolvimento Vajta et al. (1996) verificaram que blastocistos e blastocistos expandidos apresentam melhores taxas de eclosão do que blastocistos iniciais.

Liebermann et al. (2003) apontam que as futuras pesquisas na área de criopreservação deverão ser direcionadas principalmente ao tempo de exposição e concentração dos crioprotetores, velocidade de resfriamento e reaquecimento, e temperatura de imersão em nitrogênio líquido.

2.5.1. Crioprotetores

Os crioprotetores são de fundamental importância no processo de criopreservação, independente da metodologia adotada (congelação ou vitrificação), pois são eles os responsáveis pela desidratação das células. Estes solutos são classificados conforme a sua capacidade de penetrar ou não nas células, por isso a denominação de intracelulares e extracelulares.

Os crioprotetores intracelulares, são moléculas pequenas que penetram facilmente na membrana das células. Devido às suas propriedades coligativas e ligantes agem formando pontes de hidrogênio com as moléculas de água intracelular, diminuindo o ponto crioscópico, prevenindo a formação de cristais de gelo intracelular (PEREIRA; MARQUES, 2008). Desta classe, os crioprotetores mais utilizados são

glicerol (GLI), etilenoglicol (EG), dimetilsulfoxido (DMSO), propilenoglicol (PRO), metanol e etanol.

Historicamente, no princípio o glicerol era o crioprotetor de eleição na congelação de embriões (CAMPOS-CHILLON et al., 2006), no entanto, com o aumento significativo da produção *in vitro* de embriões bovinos e a expansão da técnica de vitrificação onde são necessárias concentrações muito elevadas de crioprotetores, o etilenoglicol que apresenta características vantajosas como baixa toxicidade e alto potencial de permeabilidade, passou a ser mais utilizado nos procedimentos de criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (MASSIP, 2001; MOORE; BONILLA, 2006).

Ao utilizar concentrações muito altas de crioprotetores os riscos de ocorrer injúrias tóxicas são muito maiores, porém esses riscos podem ser minimizados quando os embriões são expostos aos crioprotetores durante curtos períodos e em baixas temperaturas, como é o caso da vitrificação. Outra estratégia que também é adotada são as associações entre crioprotetores com diferentes características de permeabilidade, como foi demonstrado que o etilenoglicol quando usado em associação com dimetilsulfoxido ou propilenoglicol, apresenta melhores taxas de eclosão embrionária pós reaquecimento (MANJUNATHA et al., 2009).

Vieira et al. (2007) ao vitrificarem embriões bovinos relataram que houve maior taxa de eclosão embrionária quando foi utilizado 20% EG + 20% DMSO em comparação a 40% EG + 0,1% PVA + 17,1% sacarose. Ao compararem a eficiência da associação de EG com DMSO, PRO ou GLI, na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, Werlich et al. (2006) também obtiveram melhores resultados de eclosão com o grupo EG+DMSO.

Os crioprotetores não permeáveis, também chamados de açúcares são divididos em três categorias: os monossacarídeos (glicose, frutose, sorbitol, manitol), dissacarídeos (sacarose, trealose) e os polissacarídeos (rafinose) (DATTENA et al., 2004; CAMPOS-CHILLON et al., 2006).

Os crioprotetores extracelulares são de fundamental importância, e seu mecanismo de ação é basicamente através do controle da osmolaridade extracelular. Durante a criopreservação promovem o aumento na osmolaridade do meio extracelular, dessa maneira há uma potencialização dos crioprotetores intracelulares e conseqüentemente os embriões sofrem desidratação (KASAI; MUKAIDA, 2004). Após o reaquecimento, é necessário realizar a retirada dos crioprotetores que estão

dentro dos embriões e promover a reidratação dos mesmos. Neste caso, o meio extracelular é hipotônico em relação ao meio intracelular, os açúcares adicionados ao meio extracelular funcionam como tampão osmótico regulando a velocidade na entrada da água e saída dos crioprotetores dos embriões. Dos crioprotetores extracelulares a sacarose tem apresentado excelentes resultados, principalmente no reaquecimento onde os embriões passam por soluções em gradiente de osmolaridade decrescentes, permitindo um controle ainda maior na reidratação (GONÇALVES et al., 2008).

2.5.2. Vitrificação de embriões

Embora, que os primeiros trabalhos descritos de utilização da metodologia de vitrificação na criopreservação de sêmen e embriões sejam de 1938 e 1985, respectivamente, há relatos de que a teoria de vitrificação seja investigada desde meados de 1800, pelos físicos Gay Lussac e Tammann (ARAV, 2014; GORDON, 2003). A partir do momento em que foi divulgado o nascimento dos embriões de camundongos, a vitrificação passou a ser amplamente estudada, sendo considerada atualmente a técnica mais apropriada na criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (VAJTA et al., 1998) demonstrando melhores resultados (em relação ao método tradicional de congelação) nas taxas de sobrevivência embrionária pós-descongelação (DINNYÉS et al., 1996; GÓMES et al., 2008).

O princípio da criopreservação através da vitrificação tem como principal característica a solidificação de líquidos em estado amorfo (vítreo), mantendo suas propriedades químicas e mecânicas, sem que haja a formação de cristais de gelo (MASSIP, 2001). Esse fenômeno se dá através de breve exposição dos embriões às altas concentrações de crioprotetores, que por sua vez, desidratam os embriões e causam um aumento na viscosidade intra e extracelular, combinado a uma taxa de resfriamento muito rápida (aproximadamente de 15.000 à 30.000°C/min.) pela imersão em nitrogênio (LIEBERMANN et al., 2003; VAJTA, 2000).

As altas concentrações dos crioprotetores utilizados podem causar injúrias tóxicas e osmóticas aos embriões. Duas são as alternativas sugeridas para minimizar esses efeitos indesejáveis: aumentar ainda mais a velocidade de resfriamento e reaquecimento (VAJTA et al., 1998), e usar associações de crioprotetores menos

tóxicos e mais permeáveis com diferentes características de permeabilidade (VAJTA, 2000; VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

A constatação de que o aumento na velocidade de resfriamento melhora os resultados da vitrificação, levou ao desenvolvimento de algumas alternativas tais como: a vitrificação em superfície sólida que consiste numa superfície metálica super resfriada em contato com nitrogênio líquido onde são depositadas as gotas de solução de vitrificação contendo os embriões (DINNYÉS et al., 2000), e o outro método é através da eliminação do efeito de isolamento térmico produzido pelo vapor do nitrogênio através do super-resfriamento do nitrogênio através de vácuo (ARAV et al., 2000). Entretanto, essas técnicas são de aplicação mais trabalhosa ou honerosa.

Dessa forma surgiram novas tecnologias de vitrificação, chamadas de metodologias abertas que visam reduzir o volume de solução crioprotetora usada tradicionalmente na palheta de 0,25 mL, aumentando assim a velocidade de vitrificação dos embriões. Essas metodologias diferem principalmente pelo uso de diferentes suportes para acondicionamento dos embriões, tais como: a *Open Pulled Straw* (OPS) (VAJTA et al., 1997), as grades de microscopia eletrônica (MARTINO et al., 1996), as micropipetas de vidro (KONG et al., 2000), os *cryoloops* (LANE et al. 1999), *cryotops* (KUWAYAMA; KATO, 2000) e *cryotips* (KUWAYAMA et al, 2005).

o comparar algumas dessas metodologias Kuwayama (2007) relatou que a velocidade de vitrificação em palheta de 0,25mL com 25µL de solução de vitrificação mergulhada em nitrogênio líquido foi de 4.460°C/min., em OPS com 1,5 µL de solução foi de 16.340°C/min. e em *cryotop* com 0,1 µL de solução foi de 22.800°C/min.

Das metodologias mencionadas, atualmente a técnica de vitrificação utilizando o *cryotop* está em plena expansão, principalmente na criopreservação de oócitos e embriões humanos onde já foram demonstrados ótimos resultados. KUWAYAMA et al. (2005) obtiveram taxas de 100% na sobrevivência embrionária pós-reaquecimento de zigotos humanos vitrificados (em estágio de pro-núcleo), com clivagem de 93% e 52% de produção de blastocistos, no entanto quando foram utilizados blastocistos para vitrificação a taxa de sobrevivência embrionária foi de 90%, com o diagnóstico clínico de 53% de gravidez e 45% de crianças nascidas.

lém dos humanos também foi demonstrado o êxito na vitrificação com *cryotop* em animais domésticos e exóticos, como por exemplo: oócitos de equinos, ovinos, bovinos, bubalinos e cetáceos, e embriões de leporinos, bovinos, bubalinos e suínos (KUWAYAMA, 2007).

Descrita pela primeira vez por Kuwayama e Kato (2000) na vitrificação de oócitos e embriões humanos, esta técnica tem como principal vantagem a utilização de volumes muito pequenos de solução crioprotetora (0,1 μ L).

O *cryotop* é constituído de polipropileno e consiste em uma haste estreita e fina (com 0,4 mm de largura, 20 mm de comprimento 0,1 mm de espessura) onde se deposita os embriões, acoplada a outra porção mais robusta que funciona como cabo desta haste. Para a proteção de possíveis danos mecânicos durante a armazenagem, usa-se recobrir a extremidade onde estão localizados os embriões com meia palheta de 0,5 mL que funciona como uma bainha para o *cryotop*.

Na vitrificação, após a passagem pelas soluções de equilíbrio e de vitrificação contendo os crioprotetores, os embriões (ou oócitos) são colocados extremidade do *cryotop* com o auxílio de um microcapilar, totalizando o volume de no máximo 0,1 μ L. Logo após os embriões serem colocados na haste de vitrificação o excesso da solução crioprotetora deve ser retirado, ficando assim apenas uma fina camada que os recobre, para em seguida a amostra ser rapidamente imersa em nitrogênio líquido (com velocidade de resfriamento de até 40,000 $^{\circ}$ C/min). Posteriormente coloca-se a bainha de proteção na extremidade da haste, seguido da estocagem dos embriões em nitrogênio líquido.

No reaquecimento, a bainha de proteção é removida do *cryotop* enquanto ainda está submerso no nitrogênio líquido, a extremidade da haste contendo os embriões é imersa diretamente em solução com sacarose (a 37 $^{\circ}$ C), passando por concentrações decrescentes para que haja a diluição dos crioprotetores. Após estas etapas serem concluídas os embriões ainda passam por um banho em meio de cultivo embrionário e posteriormente, são levados envasados para transferência ou recultivados em incubadora de cultivo celular.

Os crioprotetores utilizados nessa metodologia de *cryotop* podem variar de acordo com o estágio embrionário e espécie a ser trabalhada, no entanto o etileno glicol combinado ao dimetilsulfoxido são os mais comumente usados na solução de equilíbrio em concentrações mais baixas e na solução de vitrificação em altas concentrações e associados à sacarose. Esta combinação de crioprotetores tem apresentado os melhores resultados na vitrificação de embriões e oócitos (KASAI; MUKAIDA, 2004), pois o etilenoglicol possui baixo grau de toxicidade e é altamente permeável, e o DMSO por sua vez age potencializando essa permeabilidade do etilenoglicol (VICENTE; GARCIA-XIMENEZ, 1994).

A partir do surgimento do *cryotop* outros modelos semelhantes de hastes de criopreservação surgiram e também são eficientes, apresentando boas taxas de sobrevivência embrionária pós reaquecimento dos blastocistos (TSANG; CHOW, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da regulação do metabolismo lipídico sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

3.2 Objetivo específico

Avaliar a melhor dose e momento de suplementação do meio de cultivo com os reguladores metabólicos de lipídios, L-carnitina, forskolina e ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-12*, de forma isolada ou em associação e seus efeitos sobre a produção e sobrevivência à vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

4. HIPÓTESE:

A suplementação do meio de cultivo embrionário com os reguladores do metabolismo lipídico, L-carnitina, forskolina e ácido linoleico conjugado *trans-10 cis-12*, melhoram a produção e a sobrevivência embrionária após vitrificação.

5. MATERIAL E METODOS

5.1. Local do experimento

Os experimentos foram realizados no laboratório de produção *in vitro* de embriões do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista- UNESP, em Jaboticabal, São Paulo, durante o período de 2011 à 2014.

5.2. Obtenção dos oócitos

Os ovários utilizados para coleta dos oócitos foram obtidos no frigorífico Barra Mansa, localizado no município de Sertãozinho, SP. Os mesmos foram acondicionados em garrafas térmicas, mantidos à temperatura de aproximadamente 35°C. Uma vez no laboratório (a 35 km do frigorífico), a temperatura do material ainda na garrafa térmica foi aferida novamente, logo, os ovários foram lavados com solução salina à 35°C, depositados em um recipiente de vidro com solução salina e mantidos em banho-maria à mesma temperatura.

As aspirações dos folículos medindo entre 3 a 8 mm foram realizadas com agulhas 20G (Therumo), linha de aspiração (Cook K-OPAL – 1100 L) conectadas à tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 ml (Sarstedt). Para a obtenção de pressão negativa foi usada uma bomba de vácuo própria para aspiração folicular (WTA), ajustada entre 60 e 80 mm Hg.

A lavagem do sistema de aspiração e o meio de recebimento dos oócitos foram efetuados com PBS (Nutricell) acrescido de 5,0 UI/ml de Heparina (Liquemine®) e 50 mg/ml de Gentamicina (Gentocin®).

Durante as aspirações, os tubos coletores do fluido folicular e oócitos foram mantidos em sistema de aquecimento a 35°C da própria bomba de vácuo. Logo após as aspirações, os tubos foram encaminhados imediatamente para o laboratório de produção *in vitro* para que fosse realizada a busca e seleção dos oócitos.

5.3. Busca e seleção dos oócitos

O material coletado na aspiração folicular, ao chegar no laboratório, foi lavado com PBS em filtro de colheita de embriões e o sedimento remanescente no filtro depositado em placas de petri de 90 mm para posterior busca e seleção.

A busca, seleção e classificação dos oócitos foram realizadas pela visualização das placas contendo o material sob estereomicroscopia em fluxo laminar.

Os oócitos selecionados foram transferidos para uma placa de poliestireno de 35mm contendo meio TCM199 (Sigma), suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Merck), 20 mM de hepes (Sigma), 10% de SFB (Crypion), 0,2 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg de amicacina (Biochimico) para cada mL de meio. Após a procura, os oócitos foram classificados quanto as características morfológicas do citoplasma e revestimento com células do *cumulus* conforme descreve DE LOOS et al., 1991, lavados por mais duas vezes neste mesmo meio. Foram utilizados somente os oócitos de grau I e II.

5.4. Maturação *in vitro* dos oócitos (MIV)

Foram utilizadas placas de cultivo celular de 35mm (Sarstedt) e montadas com gotas de 100µL de meio de maturação recobertas com óleo de silicone (Sigma).

O meio utilizado para a maturação *in vitro* dos oócitos (MIV) foi o TCM 199 (Sigma) suplementado com 25 mM de bicarbonato de sódio, 1,0 µg/mL de FSH (foltropim®, Bioniche), 50 UI/mL de LH (Folligon®, Intervet), 1,0 µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2 mM de piruvato de sódio (Sigma), 83,4 µg/mL de amicacina (Biochimico) e 10% de SFB (Crypion).

Os oócitos selecionados passaram por dois banhos em meio de maturação distribuídos nas microgotas, em grupos de 20 a 25 oócitos. As placas de maturação foram devidamente identificadas e colocadas na incubadora de cultivo celular a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar e umidade alta, por 24 horas, até a hora da fecundação.

5.5. Fecundação *in vitro*

Previamente a fecundação, os oócitos foram lavados por duas vezes em meio TL-sêmen e uma vez em FIV gotas suplementado com 0,6% de BSA (Sigma), 10 µg/mL de heparina (Sigma), 18 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 1,8 µM de epinefrina, 0,2 mM de piruvato (Sigma) e 83,4 µg/mL de amicacina (Biochimico), para remoção do meio de maturação. Após a lavagem dos oócitos, os mesmos foram transferidos para as placas de fecundação contendo gotas de 100 µL de meio FIV gotas sob óleo de silicone (Sigma).

Foi utilizado o sêmen de um mesmo touro e de mesma partida em todos os experimentos. O sêmen foi descongelado em banho-maria à 36°C por 30 segundos. Logo após a descongelação o sêmen foi depositado em um microtubo de 1,5 mL contendo gradiente descontínuo de percoll a 45% e 90%. A primeira centrifugação foi realizada a uma força centrífuga de 3620g (4500rpm) por 7 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspenso com 1mL de meio FIV gotas. A segunda centrifugação foi à 80g (500rpm) durante 5 minutos. Logo após, do sedimento acumulado foram coletados 30µL e depositados em outro tubo eppendorf contendo 30 µL de meio FIV gotas previamente equilibrado. Duas amostras de 5µL de sêmen foram tomadas e diluídas em 95 µL de meio FIV gotas ou água para avaliação da motilidade e concentração, respectivamente. O volume do sedimento foi ajustado para uma concentração final de 25×10^3 espermatozóides vivos/µL. A cada gota de fecundação, já contendo os oócitos foram adicionados 8uL da suspensão de sêmen. O período de co-incubação foi de 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

5.6. Cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro* (CIV)

Os prováveis zigotos tiveram suas células do *cumulus* removidas por sucessivas pipetagens ainda nas placas de FIV. Logo após, passaram por duas lavagens em meio TL-sêmen e duas lavagens em meio SOFaa, sendo transferidos aproximadamente 50 zigotos para cada poço contendo 800µL de meio SOFaa suplementado com 1,5% de SFB e 6 mg de albumina sérica bovina (BSA), 0,2 mM de piruvato (Sigma), 0,5 mM de frutose e 83,4 µg/mL de amicacina (Biochimico). O cultivo

de desenvolvimento foi realizado por 7 dias à temperatura de 38,5°C, umidade relativa de 95% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar. A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas depois da fertilização (hpf).

5.7. Suplementação dos embriões com reguladores metabólicos

Os embriões em cultivo passaram por trocas de meio (suplementação), realizadas no quarto e sexto dia de cultivo, quando foram retirados 400ul de meio de cada poço de cultivo e acrescentados 400uL de meio SOFaa fresco (pré equilibrado). Nas trocas parciais de meio, a quantidade de reguladores metabólicos adicionada era suficiente para que fossem atingidas as concentrações desejadas conforme cada experimento.

A avaliação do número de embriões clivados em cada experimento foi realizada no segundo dia e serviu de base para a avaliação da produção no sétimo dia de cultivo. Foi considerado como embrião produzido as estruturas que atingiram aos estádios de desenvolvimento de blastocisto inicial a blastocisto eclodido. Os embriões em estágio de blastocisto e blastocisto expandido foram vitrificados. O resumo dos eventos que foram realizados em todos os experimentos de acordo com a cronologia estão demonstrados na Figura 8.

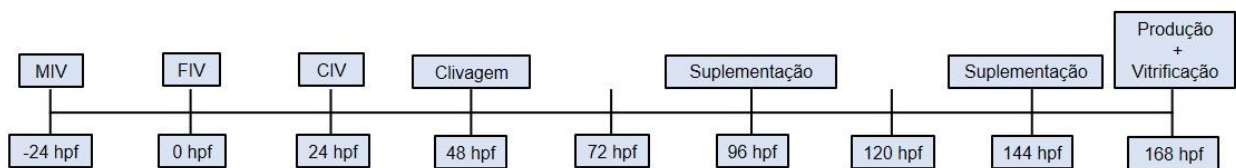


Figura 8: Esquema representativo da cronologia de produção e momentos de avaliação de clivagem, suplementação com os reguladores de metabolismo no meio de cultivo *in vitro*, avaliação da produção e vitrificação dos embriões bovinos.

-24hpf (horas pós inseminação) Maturação *in vitro* (MIV); 0hpf Fecundação *in vitro* (FIV), 24hpf passagem para o Cultivo *in vitro* (CIV); 48hpf avaliação da Clivagem; 96hpf primeira troca parcial do meio e início da suplementação com as drogas reguladoras de metabolismo nos tratamentos que iniciaram no quarto dia (D4); 144hpf segunda troca parcial do meio e início da suplementação com as drogas reguladoras de metabolismo com início no sexto dia (D6); 168hpf avaliação de produção embrionária e vitrificação dos embriões.

5.8. Criopreservação e reaquecimento dos embriões

Os embriões foram criopreservados pela técnica de vitrificação, seguindo a metodologia descrita por MEZZALIRA et al., 2004, com algumas modificações.

No sétimo dia de cultivo de desenvolvimento os embriões produzidos (blastocistos e blastocistos expandidos) foram retirados das gotas de cultivo e lavados três vezes em meio de manutenção (meio de lavagem, suplementado com 20% de SFB a 37°C). Posteriormente, os embriões foram levados para a gota (de aproximadamente 200µL) contendo meio de equilíbrio (meio de lavagem suplementado com 8,25% de EG e 8,25% de DMSO a 37°C) por 3 minutos. Transcorrido o tempo, estes embriões foram transferidos para a solução de vitrificação (meio de lavagem suplementado com 16,5% de EG, 16,5% de DMSO e 0,5M de sacarose a 37°C), e após 30 segundos foram pipetados, totalizando o volume máximo de 1 µL (embriões e meio de vitrificação), para a extremidade da haste de vitrificação (Vitringá®). Ao completar 40 segundos de exposição, as hastes eram imediatamente imersas em nitrogênio líquido. Os embriões foram adequadamente armazenados em nitrogênio líquido até o momento do reaquecimento.

Para o reaquecimento, as hastes de vitrificação foram retiradas do botijão de estocagem e colocadas em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. A extremidade das hastes contendo os embriões foram imersas na primeira solução de reaquecimento (meio de lavagem suplementado com 20% de SFB e 0,3 M de sacarose, a 37°C) durante 3 minutos para iniciar o processo de remoção dos crioprotetores. Logo após, estes embriões eram transferidos para a segunda solução de reaquecimento (meio de lavagem suplementado com 20% de SFB e 0,15 M de sacarose, a 37°C) quando permaneceram por 3 minutos e para finalizar, na solução final de reaquecimento (meio de lavagem suplementado com 20% de SFB) por 3 minutos.

5.9. Avaliação da criotolerância embrionária

Após a diluição dos crioprotetores, os embriões reaquecidos foram recultivados por 48 horas nas mesmas condições do cultivo de desenvolvimento, porém sem a presença dos reguladores metabólicos. Transcorrido o tempo de recultivo foi realizada

a contagem de expansão e eclosão embrionária, considerando sobreviventes aos processo de criopreservação somente os embriões eclodidos após o reaquecimento e cultivo por 48 horas.

5.10. Delineamento Experimental

No desenvolvimento do projeto foram realizados quatro experimentos utilizando a mesma metodologia de produção e criopreservação dos embriões, sendo que a diferença na composição dos meios de cultivo foi somente do regulador metabólico e dose utilizada de acordo com o delineamento específico de cada experimento.

Nos três primeiros experimentos os reguladores metabólicos foram utilizados individualmente a partir do quarto (D4) e/ou sexto (D6) dia do cultivo de desenvolvimento embrionário. No experimento 4 os reguladores de metabolismo foram utilizados individualmente ou em associação a partir do quarto dia do cultivo.

5.10.1. Experimento 1: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com L-carnitina sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação

Neste experimento foram realizadas 4 repetições. No momento da realização da primeira (D4) e da segunda (D6) troca parcial do meio de cultivo foi utilizado a L-carnitina, como suplemento ao meio em quantidade suficiente para que fossem atingidas as concentrações de 0,0 mM (controle); 1,0 mM; 2,5 mM e 5 mM, com base em Sutton-mcdowall et al., 2012. A produção e as taxas de expansão e eclosão dos embriões submetidos à vitrificação e reaquecimento foram avaliados para determinar qual a melhor dose e o dia para realizar a suplementação com L-carnitina.

5.10.2. Experimento 2: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com forskolina sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação

Neste experimento foram realizadas 5 repetições. No momento da realização da primeira (D4) e da segunda (D6) troca parcial do meio de cultivo foi utilizado a Forskolina, como suplemento ao meio em quantidade suficiente para que fossem atingidas as concentrações de 0,0 μM (controle); 5,0 μM ; 10,0 μM e 15,0 μM , com base em Sanches et al., 2013. A produção e as taxas de expansão e eclosão dos embriões submetidos à vitrificação e reaquecimento foram avaliados para determinar qual a melhor dose e o dia para realizar a suplementação com forskolina.

5.10.3. Experimento 3: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com ácido linoleico conjugado *trans-10 cis-12*, sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação

Neste experimento foram realizadas 6 repetições. No momento da realização da primeira (D4) e da segunda (D6) troca parcial do meio de cultivo foi utilizado o ácido linoleico conjugado *trans-10 cis-12*, como suplemento ao meio em quantidade suficiente para que fossem atingidas as concentrações de 0,0 μM (controle); 50,0 μM ; 100,0 μM e 150,0 μM , com base em Pereira et al., 2007, 2008. A produção e as taxas de expansão e eclosão dos embriões submetidos à vitrificação e reaquecimento foram avaliados para determinar qual a melhor dose e o dia para realizar a suplementação com o Ácido Linoleico conjugado *trans-10 cis-12*.

5.10.4. Experimento 4: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com os reguladores metabólicos, L-carnitina, forskolina e ácido linoleico conjugado, sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação

Neste experimento, os reguladores metabólicos foram utilizados nas concentrações que apresentaram melhor resultado de produção e sobrevivência embrionária após reaquecimento nos experimentos de 1, 2 e 3. Para isto, os tratamentos foram sem suplementação com regulador metabólico (controle) ou com

regulador metabólico L-carnitina (CA) na concentração de 2,5 mM, forskolina (FO) na concentração de 15 μ M e ácido linoleico conjugado *trans*-10 *cis*-12 (CLA) na concentração de 150 μ M adicionados individualmente ou em associação, no quarto dia do desenvolvimento embrionário (D4), da seguinte forma:

Individuais: Controle; CA; FO; CLA.

Associação em dois: CA+FO; CA+CLA; FO+CLA.

Associação em três: CA+FO+CLA

Em razão do grande número de tratamentos (8) não foi possível realizar todos em uma mesma rotina. Para minimizar os efeitos do dia da rotina foi utilizado uma distribuição em blocos, de forma que os tratamentos pudessem ser repetidos por três vezes e que cada um deles pudesse ser realizado concomitante aos demais por pelo menos uma vez.

Em todas as repetições realizadas neste experimento, ao sétimo dia do desenvolvimento embrionário, após a contagem da produção, os embriões foram vitrificados para avaliação da criotolerância.

5.11. Análise estatística

A variável produção de embriões foi analisada sob delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial 4 por 2 (quatro concentrações e 2 dias) com o número de repetições definidos nos experimentos de 1 a 3. Para o experimento 4 foi realizado 3 repetições de cada tratamento de acordo com o delineamento experimental. A variável antes da análise foi transformada em arco seno $\sqrt{\text{produção}}$. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para tanto, foi utilizado o procedimento General Linear Models (GLM) do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Para as análises das variáveis categóricas (expansão e eclosão) foi utilizado o teste de Qui-quadrado, considerando os efeitos de concentração e dia, sendo que para valores de P iguais ou inferiores a 0,05 ($p < 0,05$), as diferenças entre esses efeitos foram consideradas significativas. Neste caso, foi utilizado o procedimento Proc Freq, também do programa computacional SAS.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimento 1: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com L-carnitina sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação

No presente estudo a L-carnitina utilizada na suplementação do meio de cultivo embrionário na concentração de 2,5 mM resultou em maior produção de embriões ($62,0 \pm 0,07\%$, $P=0,02$) quando o início da suplementação ocorreu no quarto ou sexto dia do desenvolvimento embrionário (Tabela 2).

Quanto à suplementação com L-carnitina no quarto ou sexto dia do desenvolvimento, não foi observada diferença na produção de blastocistos ($P=0,3$). Também não foi observado interação do dia e das concentrações de suplementação na produção de embriões ($P=0,6$) (Tabela 1).

O efeito benéfico da L-carnitina pode ser atribuído a sua função em promover o transporte dos ácidos graxos presentes no citoplasma celular para o interior das mitocôndrias (enzima carnitina-palmitoil-transferase) onde são β -oxidados, desse modo, há aumento da atividade mitocondrial e consequentemente na produção de ATP (DUNNING et al., 2010, 2011).

Sutton-mcdowall et al. (2012) testaram a adição de duas concentrações de L-carnitina no meio de cultivo de embriões produzidos *in vitro* (sem aminoácidos, e sem carboidratos), logo após a fertilização *in vitro*, durante quatro dias. Quando o meio não foi suplementado com L-carnitina, a produção de embriões foi nula. Ao utilizar a dose de 1mM de L-carnitina foi obtida a taxa de aproximadamente 5% de mórulas formadas. Já ao aumentar a dose de carnitina para 5mM, houve acréscimo de aproximadamente 15% na produção de mórulas. Além disso, houve diminuição do conteúdo lipídico nos embriões cultivados na presença de L-carnitina em relação ao controle.

Mais uma vez, foi observado que há dose dependência na produção embrionária. No entanto, em virtude do meio utilizado por Sutton-mcdowall et al. (2012) não conter carboidratos e aminoácidos, foi necessário maior concentração de L-carnitina para que o ATP produzido pela β -oxidação dos ácidos graxos fosse suficiente em prover aporte energético durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

No entanto, os lipídios também são necessários para outras funções celulares, tais como, biossíntese de membranas e produção hormonal, dessa maneira,

concentrações excessivas de L-carnitina podem causar esgotamento prévio das reservas lipídicas sendo prejudiciais ao desenvolvimento embrionário (VAN MEER et al., 2008). Entretanto, o uso de L-carnitina tem sido preconizado desde o início do cultivo de desenvolvimento em meios sequenciais (LANE et al. 2003).

Durante a maturação oocitária *in vitro* ocorre elevação da β -oxidação, concomitante ao aumento na expressão do gene *cpt1b* (responsável pela produção da enzima carnitina-palmitoil-transferase) e diminuição do conteúdo lipídico. Nos zigotos e embriões até a fase de oito células não foi detectada expressão do *cpt1b* e os níveis de β -oxidação foram muito baixos, indicando que esta enzima é herdada maternalmente e permanece ativa até a que haja a ativação do genoma embrionário. Já a partir da fase de oito células até o estadio de blastocisto, ocorre aumento em cinco vezes na β -oxidação (DUNNING et al., 2010; HILLMAN; FLYNN, 1980).

O uso de 0,6mg/mL (3.03mM) de L-carnitina por 21 horas na maturação *in vitro* de oócitos bovinos, não interferiu na taxa de maturação (MI/MII). Ao vitrificar, desvitrificar e realizar a produção dos embriões *in vitro* com estes oócitos, foi observado que não houve diferença na taxa de blastocistos formados, oriundos dos grupos de oócitos tratados com L-carnitina e vitrificados, e os oócitos que não foram vitrificados (CHANKITISAKUL et al., 2013).

No presente experimento, a capacidade de sobrevivência à vitrificação dos embriões produzidos *in vitro*, foi influenciada pela concentração de L-carnitina, tendo a concentração de 2,5 mM suplementada a partir do quarto dia do desenvolvimento apresentado a melhor taxa de 60,7% expansão ($P=0,008$) e eclosão de 41,1% ($P=0,04$). Estes dados corroboram com Takahashi et al. (2013), que ao suplementar o meio de cultivo de desenvolvimento embrionário com L-carnitina nas doses de 1.518mM e 3.030mM obtiveram (66,2% e 71,6%, respectivamente) de embriões expandidos após a criopreservação pelo método de congelamento. Já a dose de 6.072mM, não diferiu do grupo controle. Este mesmo grupo de pesquisadores, identificou que nos blastocistos cultivados com 3.030mM de L-carnitina a expressão dos genes *ATP6* e *COX1* (envolvidos no metabolismo mitocondrial) e a redução do conteúdo lipídico, foi maior do que no grupo controle (não tratado).

Além da L-carnitina estar envolvida no metabolismo lipídico, também atua na redução do estresse oxidativo por aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, tais como, a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (RIZZO et al., 2010). Considerando os efeitos deletérios das espécies reativas ao oxigênio (ROS), durante

o desenvolvimento embrionário e processo de criopreservação (WU et al., 2011), os efeitos benéficos da suplementação de L-carnitina no presente estudo, podem também ter sido influenciados pela redução no estresse oxidativo.

A suplementação com L-carnitina no meio de cultivo a partir do sexto dia do cultivo embrionário não apresentou melhora na sobrevivência após o reaquecimento, provavelmente pelo curto período de tempo de exposição dos embriões ao tratamento.

Tabela 1: Resultados de produção, expansão e eclosão *in vitro* de embriões bovinos produzidos em meio suplementado no quarto ou sexto dia do desenvolvimento, com diferentes concentrações de L-carnitina

Dia do tratamento	Concentração de L-carnitina em mM	Embriões tratados número	Embriões produzidos % $\pm$ SD	Embriões reaquecidos número	Embriões expandidos número(%)	Embriões eclodidos número(%)
4	0,0	166	53,6 $\pm$ 0,02	56	11 (19,6) ^b	8 (14,3) ^b
	1,0	176	62,5 $\pm$ 0,06	60	12 (20,0) ^b	10 (16,7) ^b
	2,5	176	61,9 $\pm$ 0,08	56	34 (60,7) ^a	23 (41,1) ^a
	5,0	161	49,7 $\pm$ 0,14	37	8 (21,6) ^b	6 (16,2) ^b
6	0,0	166	53,6 $\pm$ 0,02	56	11 (19,6)	8 (14,3)
	1,0	186	53,2 $\pm$ 0,07	67	17 (25,4)	10 (14,9)
	2,5	153	62,1 $\pm$ 0,08	66	12 (18,2)	10 (15,2)
	5,0	185	49,2 $\pm$ 0,07	35	9 (25,7)	6 (17,1)
4	Todas	679	57,1 $\pm$ 0,09	209	65 (31,1) ^A	47 (22,5)
6	Todas	690	54,2 $\pm$ 0,08	224	49 (21,9) ^B	34 (15,2)

a b sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença P<0,05

A B sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença P<0,05

Tabela 2: Resultados de produção, expansão e eclosão *in vitro* de embriões bovinos produzidos em meio suplementado com diferentes concentrações de L-carnitina, no quarto ou sexto dia do desenvolvimento

Concentração de L-carnitina em mM	Dia do tratamento	Embriões tratados número	Embriões produzidos %±SD	Embriões reaquecidos número	Embriões expandidos número(%)	Embriões eclodidos número(%)
0,0	4	166	53,6±0,02	56	11 (19,6)	8 (14,3)
	6	166	53,6±0,02	56	11 (19,6)	8 (14,3)
1,0	4	176	62,5±0,06	60	12 (20,0)	10 (16,7)
	6	186	53,2±0,07	67	17 (25,4)	10 (14,9)
2,5	4	176	61,9±0,08	56	34 (60,7) ^a	23 (41,1) ^a
	6	153	62,1±0,08	66	12 (18,2) ^b	10 (15,2) ^b
5,0	4	161	49,7±0,14	37	8 (21,6)	6 (16,2)
	6	185	49,2±0,07	35	9 (25,7)	6 (17,1)
0,0	4 + 6	332	53,6±0,02 ^{AB}	112	22 (19,6) ^B	16 (14,3) ^B
1,0	4 + 6	362	57,7±0,07 ^{AB}	127	29 (22,8) ^B	20 (15,7) ^B
2,5	4 + 6	329	62,0±0,07 ^A	122	46 (37,7) ^A	33 (27,0) ^A
5,0	4 + 6	346	49,4±0,11 ^B	72	17 (23,6) ^B	12 (16,7) ^{AB}

a b sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença P<0,05

A B sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença P<0,05

6.2. Experimento 2: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com forskolina sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação

O mecanismo básico de ação da forskolina é através do aumento nos níveis de AMPc, ativando a enzima adenilato-ciclase, que irá ativar a lipase e esta por sua vez, atua na quebra dos triacilgliceróis (HONNOR; DHILLON; LONDOS, 1985; LONDOS et al., 1999).

Os resultados do uso de forskolina como suplemento modulador do metabolismo embrionário *in vitro* estão demonstrados nas tabelas 3 e 4.

A suplementação com forskolina no meio de cultivo embrionário no quarto ou sexto dia de desenvolvimento dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, nas concentrações de 0,0; 5,0; 10,0 ou 15,0 µM, não apresentou diferença na produção de embriões (P=0,2). O mesmo foi observado ao adicionar 10 µM de forskolina no quinto (SANCHES et al., 2013) e sexto dia (PASCHOAL et al., 2010, 2012) de cultivo *in vitro* de embriões bovinos em meios contendo ou não soro fetal bovino.

Entretanto, no presente trabalho, entre os tratamentos de suplementação com Forskolina a partir do quarto dia do cultivo embrionário, a concentração de 15,0 μM promoveu a melhor taxa de expansão (53,2%) e de eclosão (46,8%) dos embriões após reaquecimento e cultivo por 48 horas ($P=0,001$) em relação às demais concentrações utilizadas e similar ao do controle no qual não foi suplementado com forskolina ($P=0,8$).

O uso de 10 μM de forskolina no sexto dia de cultivo *in vitro* de embriões bovinos, não interferiu nas taxas de sobrevivência embrionária ao processo de vitrificação em relação ao grupo controle, apesar de ter ocorrido a redução na porcentagem de células em apoptose quando adicionada a meios contendo soro fetal bovino (PRYOR; TRANT, 2009; PASCHOAL et al., 2012). Sanches et al. 2013, apesar de também não conseguirem melhores índices na sobrevivência embrionária aos processos de criopreservação utilizando 10 μM de forskolina no sexto dia de cultivo *in vitro* de embriões bovinos, obtiveram um incremento de aproximadamente 30% na taxa de gestação aos 30 dias.

Já a adição de 10 μM de forskolina por 24 horas durante o cultivo de desenvolvimento de embriões suínos, causou aumento na atividade lipolítica, redução no conteúdo lipídico e melhora na sobrevivência embrionária pós vitrificação (GOMIS et al., 2013; MEN et al., 2006).

Tabela 3: Resultados de produção, expansão e eclosão *in vitro* de embriões bovinos produzidos em meio suplementado no quarto ou sexto dia do desenvolvimento, com diferentes concentrações de Forskolina

Dia do tratamento	Concentração de forskolina em μM	Embriões tratados número	Embriões produzidos % $\pm$ SD	Embriões reaquecidos número	Embriões expandidos número(%)	Embriões eclodidos número(%)
4	0,0	227	39,6 $\pm$ 0,15	31	16(51,6) ^{ab}	13(41,9) ^a
	5,0	259	45,9 $\pm$ 0,08	57	18(31,6) ^{bc}	9(15,8) ^b
	10,0	221	50,2 $\pm$ 0,02	55	14(25,5) ^c	9(16,4) ^b
	15,0	221	40,7 $\pm$ 0,06	47	25(53,2) ^a	22(46,8) ^a
6	0,0	227	39,6 $\pm$ 0,15	31	16(51,6) ^x	13(41,9) ^x
	5,0	179	58,7 $\pm$ 0,13	65	6(9,2) ^z	2(3,1) ^z
	10,0	237	49,4 $\pm$ 0,10	67	19(28,4) ^y	12(17,9) ^y
	15,0	234	41,5 $\pm$ 0,09	67	7(10,4) ^z	4(6,0) ^z
4	Todas	928	44,2 $\pm$ 0,09	190	73(38,4) ^A	53(27,9) ^A
6	Todas	877	46,6 $\pm$ 0,11	230	48(20,9) ^B	31(13,5) ^B

a b c - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P<0,05$

x y z - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P<0,05$

A B C - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P<0,05$

Tabela 4: Resultados de produção, expansão e eclosão *in vitro* de embriões bovinos produzidos em meio suplementado com diferentes concentrações de Forskolina, no quarto ou sexto dia do desenvolvimento

Concentração de forskolina em μM	Dia do tratamento	Embriões tratados número	Embriões produzidos % $\pm$ SD	Embriões reaquecidos número	Embriões expandidos número(%)	Embriões eclodidos número(%)
0,0	4	227	39,6 $\pm$ 0,15	31	16(51,6)	13(41,9)
	6	227	39,6 $\pm$ 0,13	31	16(51,6)	13(41,9)
5,0	4	259	45,9 $\pm$ 0,08	57	18(31,6) ^a	9(15,8) ^a
	6	179	58,7 $\pm$ 0,13	65	6(9,2) ^b	2(3,1) ^b
10,0	4	221	50,2 $\pm$ 0,02	55	14(25,5)	9(16,4)
	6	237	49,4 $\pm$ 0,10	67	19(28,4)	12(17,9)
15,0	4	221	40,7 $\pm$ 0,06	47	25(53,2) ^x	22(46,8) ^x
	6	234	41,5 $\pm$ 0,09	67	7(10,4) ^y	4(6,0) ^y
0,0	4 + 6	454	39,6 $\pm$ 0,14	62	32(51,6) ^A	26(41,9) ^A
5,0	4 + 6	438	51,1 $\pm$ 0,10	122	24(19,7) ^B	11(9,0) ^C
10,0	4 + 6	458	49,8 $\pm$ 0,07	122	33(27,0) ^B	21(17,2) ^{BC}
15,0	4 + 6	455	41,1 $\pm$ 0,07	114	32(28,1) ^B	26(22,8) ^B

a, b - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

x y - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

A B C - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

6.3. Experimento 3: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com ácido linoleico conjugado *trans-10; cis-12* sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação

Foi observado que a utilização do CLA *t10, c12*, não alterou a produção *in vitro* de embriões ($P=0,4$), independente da dose ou momento de aplicação (tabela 5). O mesmo foi descrito por Pereira et al. (2007, 2008), ao utilizar 100,0 μM de CLA *t10, c12* durante o cultivo de desenvolvimento de embriões bovinos. Já a mesma dose de CLA *t10, c12* no cultivo de maturação oocitária, além de modificar o perfil lipídico dos oócitos (proporção de ácidos graxos saturados e insaturados), elevou a taxa de blastocistos formados (LAPA et al., 2011). No entanto, ao utilizar os isômeros *cis-9; trans-11* e *trans-10; cis-12* nas doses de 50, 100 e 200 μM , durante a maturação, o tratamento com 50 μM do *trans-10; cis-12* foi o grupo que apresentou melhor índice de maturação e ao avaliar a taxa de blastocistos formados, quanto maior a dose de CLA utilizada (tanto *cis-9; trans-11* como *trans-10; cis-12*), maior foi a produção embrionária. Porém, ao adicionar as mesmas doses de CLA durante todo o período

do desenvolvimento embrionário, sem soro fetal bovino, a melhor taxa de produção embrionária foi obtida no grupo controle (ABSALON-MEDINA et al., 2014).

A sobrevivência embrionária, medida pela expansão e eclosão dos embriões após o reaquecimento e cultivo por 48 horas foi influenciada pelas concentrações utilizadas ($P=0,001$) e pelo dia em que se iniciou a suplementação ($P=0,01$). A suplementação do meio de cultivo embrionário com o ácido linoleico conjugado *trans-10; cis-12* a partir do quarto dia do desenvolvimento foi mais eficiente para todas as concentrações utilizadas (tabelas 5 e 6), sendo a concentração de 150 μM utilizada a partir do quarto dia do desenvolvimento apresentou as maiores taxas de expansão (85,5%) e eclosão (70,9%). Pereira et al. (2007) demonstraram que embriões bovinos mesmo cultivados na presença de SFB, com a utilização de CLA *t10, c12* apresentaram redução na deposição de lipídios intracitoplasmáticos e melhores taxas de reexpansão embrionária após criopreservação (63,7%) do que aqueles obtidos com meio definido sem soro (49%), embora estes embriões tenham apresentado menor acúmulo de lipídios, quando comparado ao cultivo embrionário com SFB sem CLA (34,7%). Pereira et al. (2008) relatam que ao utilizar 100 μM de CLA *t10, c12* em associação ao SFB durante o cultivo de desenvolvimento embrionário, foi observada a melhora na criotolerância dos embriões sem que houvesse prejuízo nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos.

Foi demonstrado que um dos mecanismos de ação dos conjugados de ácido linoleico na redução do teor lipídico é por meio da supressão na expressão de diversos genes, tais como: *IGF1R*, *insulin growth factor 1 receptor*; *IGFBP2*, *insulin growth factor binding protein 2*; *IGFBP4*, *insulin growth factor binding protein 4*; *CPT2*, *carnitine palmitoyltransferase 2*; *ACAA1*, *acetyl coA acyltransferases 1*; *ACAA2*, *acetyl coA acyltransferases 2*; *ACC*, *acetyl coA carboxilase*; *FASN*, *fatty acid synthase*; *SCD*, *stearoyl coA desaturase 1*; *LPL*, *lipoprotein lipase*; *FABP*, *fatty acid binding protein*; *FACL*, *fatty acyl coA ligase*; *GPAT*, *glycerol phosphate acyl transferase*; *AGPAT*, *acylglycerol phosphate acyl transferase*, responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas na síntese lipídica (AL DARWICH et al., 2010; BAUMGARD et al., 2002; PETERSON et al., 2003; STINSHOFF et al., 2014). Além disso, ocorre a modificação na proporção de ácidos graxos insaturados e saturados, melhorando a fluidez de membrana celular (AL DARWICH et al., 2010).

Para tal, o efeito benéfico na utilização do ácido linoleico conjugado em embriões criopreservados pode ser justificado pela provável redução e modificação do perfil lipídico nestes embriões.

Tabela 5: Resultados de produção, expansão e eclosão *in vitro* de embriões bovinos produzidos em meio suplementado no quarto ou sexto dia do desenvolvimento, com diferentes concentrações de ácido linoleico conjugado *trans*-10; *cis*-12

Dia do tratamento	Concentração de linoleico em μM	Embriões tratados número	Embriões produzidos % $\pm$ SD	Embriões reaquecidos número	Embriões expandidos número(%)	Embriões eclodidos número(%)
4	0,0	278	56,1 $\pm$ 0,09	75	26(34,7) ^c	12(16,0) ^c
	50,0	401	48,1 $\pm$ 0,05	74	60(81,1) ^{ab}	41(55,4) ^b
	100,0	448	48,9 $\pm$ 0,07	75	55(73,3) ^b	36(48,0) ^b
	150,0	437	53,1 $\pm$ 0,08	110	94(85,5) ^a	78(70,9) ^a
6	0,0	278	56,1 $\pm$ 0,09	75	26(34,7) ^y	12(16,0) ^y
	50,0	469	51,8 $\pm$ 0,07	102	52(51,0) ^x	36(35,3) ^x
	100,0	441	52,8 $\pm$ 0,04	89	51(57,3) ^x	29(32,6) ^x
	150,0	378	46,6 $\pm$ 0,08	72	34(47,2) ^{xy}	19(26,4) ^{xy}
4	Todas	1564	51,2 $\pm$ 0,07	334	235(70,4) ^A	167(50,0) ^A
6	Todas	1566	51,6 $\pm$ 0,07	338	163(48,2) ^B	96(28,4) ^B

a b c - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

x y - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

A B C - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

Tabela 6: Resultados de produção, expansão e eclosão *in vitro* de embriões bovinos produzidos em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido linoleico conjugado *trans*-10; *cis*-12, no quarto ou sexto dia do desenvolvimento

Concentração de linoleico em μM	Dia do tratamento	Embriões tratados número	Embriões produzidos % $\pm$ SD	Embriões vitrificados reaquecidos	Embriões expandidos (%)	Embriões eclodidos (%)
0,0	4	278	56,1 $\pm$ 0,09	75	26(34,7)	12(16,0)
	6	278	56,1 $\pm$ 0,09	75	26(34,7)	12(16,0)
50,0	4	401	48,1 $\pm$ 0,05	74	60(81,1) ^a	41(55,4) ^a
	6	469	51,8 $\pm$ 0,07	102	52(51,0) ^b	36(35,3) ^b
100,0	4	448	48,9 $\pm$ 0,07	75	55(73,3) ^x	36(48,0) ^x
	6	441	52,8 $\pm$ 0,04	89	51(57,3) ^y	29(32,6) ^y
150,0	4	437	53,1 $\pm$ 0,08	110	94(85,5) ^m	78(70,9) ^m
	6	378	46,6 $\pm$ 0,08	72	34(47,2) ⁿ	19(26,4) ⁿ
0,0	4 + 6	556	56,1 $\pm$ 0,08	150	52(34,7) ^B	24(16,0) ^C
50,0	4 + 6	870	50,1 $\pm$ 0,06	176	112(63,6) ^A	77(43,8) ^{AB}
100,0	4 + 6	889	50,8 $\pm$ 0,05	164	106(64,6) ^A	65(39,6) ^B
150,0	4 + 6	815	50,1 $\pm$ 0,08	182	128(70,3) ^A	97(53,3) ^A

a b - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

x y - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

m n - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

A B C - sobrescrito na mesma coluna apresentam diferença $P < 0,05$

6.4. Experimento 4: Efeitos da suplementação do meio de cultivo com os reguladores metabólicos, L-carnitina, forskolina e ácido linoleico conjugado *trans*-10 *cis*-12, sobre a produção e sobrevivência embrionária à criopreservação

Os três moduladores de metabolismo foram utilizados nas concentrações que apresentou melhor resultado de produção de embriões e maior taxa de eclosão embrionária após o reaquecimento e cultivo por 48 horas, dentro dos grupos de avaliação da concentração de suplementação a partir do quarto ou sexto dia do desenvolvimento embrionário, nos experimentos 1, 2 e 3. Neste contexto foi definido que a suplementação com moduladores seria a partir do quarto dia do desenvolvimento embrionário nas concentrações de 2,5 mM para a L-carnitina (CA), 15,0 μM para a forskolina (FO) e 150 μM para o ácido linoleico conjugado *trans*-10; *cis*-12 (CLA), utilizados individualmente ou em associação (tabela 7).

Não houve diferença na produção embrionária ao adicionar CA, FO e CLA isoladamente ou em associação, em relação ao controle ($P = 0,16$). Os resultados de

produção ao utilizar os três moduladores metabólicos isoladamente, estão de acordo com a literatura (PASCHOAL et al., 2010, 2012; PEREIRA et al., 2007, 2008; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012). Entretanto, não são conhecidas referências prévias que usem a combinação entre estes três fármacos (CA+FO, CA+CLA, FO+CLA e CA+FO+CLA). Os resultados de produção embrionária utilizando meio suplementado com os moduladores de metabolismo, isoladamente ou em associação no quarto dia do desenvolvimento estão apresentados na Tabela 7.

As taxas de expansão após o cultivo de 48 horas dos embriões reaquecidos foram influenciadas pela suplementação com moduladores metabólicos ($P=0,001$). A adição de CA, FO e CLA isoladamente ou em associação foi superior ao grupo controle ($P<0,05$). Dentre os tratamentos, as maiores taxas de expansão foram obtidas com o uso de CA+FO+CLA (90,5%), CA+CLA (87,9%), e CLA (86,4%), que não diferiu do grupo FO (76,4%) ($P<0,05$). Os resultados de expansão embrionária pós criopreservação com o uso dos três moduladores metabólicos isoladamente, estão na tabela 8. Encontram-se muito próximos aos observados na literatura, onde Takahashi et al., (2013) ao usar CA obtiveram 66,2% de expansão embrionária, Pereira et al., 2008 com o uso de CLA tiveram 86%; e Sanches et al., com FO, relataram 87,5%.

A taxa de eclosão dos embriões cultivados por 48 horas após o reaquecimento foi influenciada pela suplementação com os moduladores de metabolismo ($P=0,001$). O tratamento em que o meio foi suplementado somente com CLA apresentou o melhor resultado (71,8%), diferindo dos demais grupos. O segundo melhor resultado foi obtido com os grupos CA+CLA (56,7%) e CA+FO+CLA (56%). Os demais grupos não apresentaram diferença do controle em relação a eclosão (tabela 8).

A forskolina causa aumento nos níveis de AMPc, ativando a enzima adenilato-ciclase, que irá ativar a lipase e esta por sua vez, atua na quebra dos triacilgliceróis (HONNOR; DHILLON; LONDOS, 1985; LONDOS et al., 1999), liberando o glicerol que segue para ser degradado via glicólise e os ácidos graxos, por meio da enzima carnitina-palmitoil-transferase, são transportados para o interior mitocondrial para serem β -oxidados (DUNNING et al., 2010, 2011), desse modo, há aumento da atividade mitocondrial e consequentemente na produção de ATP. Entretanto, quando as concentrações de acetil-coA e ATP intracelular são superiores as necessidades energéticas das células, ocorre o estímulo da síntese “de novo” dos ácido graxos (BAUMGARD et al., 2000; MARZZOCO; TORRES, 2007). Neste caso, a melhor

criosobrevivência dos embriões tratados com o ácido linoleico pode ser atribuída a sua propriedade em promover a supressão na expressão de genes envolvidos na síntese dos ácidos graxos (AL DARWICH et al., 2010; BAUMGARD et al., 2002; PETERSON et al., 2003; STINSHOFF et al., 2014), evitando a síntese “de novo”.

Foi relatado que o excessivo acúmulo lipídico, principalmente na presença de SFB é prejudicial a criosobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* (ABE et al., 2004; DIEZ et al., 2001). No entanto, Sudano et al. (2012) identificaram que embriões *Bos taurus taurus* apresentam maior acúmulo lipídico e são mais resistentes aos processos de criopreservação que os *Bos taurus indicus*. Ao realizar a caracterização dos lipídios presentes, verificaram que os embriões *Bos taurus taurus* tem mais ácido linoleico, diferindo dos *Bos taurus indicus* que são mais ricos em ácido palmítico e esteárico. Da mesma maneira, a composição lipídica das membranas celulares é de fundamental importância. As suas funções, podem ser influenciadas pelas suas propriedades físicas e químicas, particularmente a fluidez da membrana (MCEVOY et al., 2000; KIM, et al., 2001). Neste contexto, o uso de ácido linoleico durante a produção *in vitro* de embriões promove modificações na proporção de ácidos graxos insaturados e saturados, melhorando a fluidez de membrana celular (AL DARWICH et al., 2010) e conseqüentemente a sobrevivência embrionária a criopreservação (LEÃO et al., 2015).

A expansão e eclosão são os últimos estágios possíveis de avaliação *in vitro* como indicativos da sobrevivência embrionária aos processos de criopreservação, no entanto, nem sempre refletem a capacidade de desenvolvimento pós-implantacional deste embriões.

Tabela 7: Resultados de produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando reguladores de metabolismo lipídico a partir do quarto dia do desenvolvimento embrionário.

Tratamentos	Embriões tratados número	Embriões produzidos %±SD
FO	217	66,4±0,14
CA+CLA	238	62,2±0,01
CA+FO+CLA	260	57,3±0,08
CA+FO	158	56,3±0,04
CLA	200	55,5±0,02
CA	220	54,1±0,04
Controle	173	50,9±0,08
FO+CLA	181	50,8±0,01

L-carnitina (CA); forskolina (FO); ácido linoleico conjugado *trans*-10 *cis*-12 (CLA)

Tabela 8: Resultados de expansão e eclosão, de embriões bovinos produzidos *in vitro*, em meio suplementado com reguladores de metabolismo lipídico a partir do quarto dia do desenvolvimento embrionário.

Tratamentos	Embriões reaquecidos número	Embriões expandidos número (%)	Tratamentos	Embriões reaquecidos número	Embriões eclodidos número (%)
CA+FO+CLA	116	105(90,5) ^A	CLA	110	79(71,8) ^A
CA+CLA	141	124(87,9) ^A	CA+CLA	141	80(56,7) ^B
CLA	110	95(86,4) ^{AB}	CA+FO+CLA	116	65(56,0) ^B
FO	123	94(76,4) ^{BC}	CA+FO	85	44(51,8) ^{BC}
FO+CLA	89	67(75,3) ^C	FO+CLA	89	41(46,1) ^{BC}
CA	111	83(74,8) ^C	CA	111	47(42,3) ^C
CA+FO	85	62(72,9) ^C	FO	123	51(41,5) ^C
Controle	85	47(55,3) ^D	Controle	85	32(37,6) ^C

L-carnitina (CA); forskolina (FO); ácido linoleico conjugado *trans*-10 *cis*-12 (CLA)

A,B,C,D- Letras diferentes sobrescritas na coluna apresentam diferença $P < 0,05$

7. CONCLUSÕES

A suplementação do meio de cultivo com L-carnitina na concentração de 2,5 mM a partir do quarto dia do desenvolvimento proporcionou maior sobrevivência embrionária à vitrificação.

A suplementação do meio de cultivo com forskolina na concentração de 15 μ M a partir do quarto dia do desenvolvimento proporcionou maior sobrevivência embrionária à vitrificação.

A suplementação do meio de cultivo com ácido linoleico conjugado *trans*-10; *cis*-12 na concentração de 150 μ M a partir do quarto dia do cultivo de desenvolvimento proporcionou maior sobrevivência embrionária à vitrificação.

Não houve influência dos reguladores de metabolismo lipídico na taxa de produção embrionária.

A suplementação do meio de cultivo com ácido linoleico conjugado *trans*-10; *cis*-12 na concentração de 150 μ M utilizado individualmente a partir do quarto dia do cultivo de desenvolvimento proporcionou maior sobrevivência dos embriões à vitrificação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARDEMA, H., KNIJN, H.M., OEI, C.H.Y., VOS, P.L.A.M., GADELLA, B.M. Lipid droplet dynamics during in vitro maturation of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 76, 2008.
- 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-LE, B.G., MERMILLOD, P., GUYADER-JOLY, C., HUMBLLOT, P. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, (Abstract) v. 53, p. 346, 2000.
- ABE, H., YAMASHITA, S., T. SATOH, T., HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, p. 325-335. 1999.
- ABE, H., YAMASHITA, S., T. 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 and Development*, v. 61, p. 57-66, 2002.
- ABE, H., SHIKU, H., AOYAGI, S., HOSHI, H. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine Embryos. *Journal of Mammalian Ova Research*, v. 21, p. 22-30, 2004.
- ABSALÓN-MEDINA, V. A., BEDFORD-GUAUS, S. J., GILBERT, R. O., SIQUEIRA, L. C., ESPOSITO G., SCHNEIDER A., CHEONG, S. H., BUTLER, W. R. The effects of conjugated linoleic acid isomers *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 on in vitro bovine embryo production and cryopreservation. *Journal of Dairy Science*, v. 97 (10), p.6164–6176, 2014.
- ALASNIER, C., BERDEAUX, O., CHARDIGNY, J.M., SEBEDIO, J.L., Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p. 337–345, 2002.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4^a ed. Nova York, Ed. Garland Science, 2002.
- AL DARWICH, A., PERREAU, C., PETIT, M. H, PAPILLIER, P., DUPONT, J., GUILLAUME, D., MERMILLOD, P., GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediator*. v. 93, p. 30–36, 2010.

ALIKANI, M., SADOWY, S., COHEN, J. Human embryo morphology and developmental capacity. In: A. VAN SOOM, BOERJAN, M. Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and Non-invasive Techniques. Dordrecht, Netherlands: Kluwer's Academic Publishers, p.1-31, 2002.

ARAV, A., ZENON, Y., OCHERETNY, A.A. A new device method for vitrification increases the cooling rate and allow successful cryopreservation of bovine oocytes Theriogenology, v. 53, p. 248, 2000.

ARAV, A., Cryopreservation of oocytes and embryos. Theriogenology, v. 81, p.96-102, 2014.

BANNI, S.; PETRONI, A.; BLASEVICH, M.; CARTA, G.; CORDEDDU, L.; MURRU, E.; MELIS, M.P.; MAHON, A.; BELURY, M. Conjugated linoleic acids (CLA) as precursors of a distinct family of PUFA. Lipids, v. 39 (11), p. 1143-1146, 2004.

BARCELÓ-FIMBRES, M., SEIDEL JUNIOR, J.E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid acumulation in Vitro. Molecular Reproduction and Development, v. 74, p. 1406-1418, 2007a.

BARCELÓ-FIMBRES, M., SEIDEL JUNIOR, J.E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate an either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embrionic development alter cryopreservation. Molecular Reproduction and Development, v. 74, p. 1395-1405, 2007b.

BARCELÓ-FIMBRES, M., SEIDEL JUNIOR, J.E., Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. Theriogenology, v. 75, p. 434-444, 2011.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. Human Reproductive Update, v. 1, p. 91-148, 1995.

BAUMGARD, L. H., CORL, B. A., DWYER, D. A., SAEBO, A., BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. American Journal Physiology. v. 278, p.179–184. 2000.

BAUMGARD, L.H., MATITASHVILI, E., CORL, B. A., DWYER, D. A., BAUMAN, D. E. *trans*-10, *cis*-12 Conjugated Linoleic Acid Decreases Lipogenic Rates and Expression of Genes Involved in Milk Lipid Synthesis in Dairy Cows. Journal of Dairy Science. v. 85, p. 2155–2163, 2002.

BILODEAU-GOESEELS, S., Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. Theriogenology, v. 66, p. 297-306, 2006.

BIRNBAUM, M.J. Lipolysis: more than just a lipase. The Journal of Cell Biology, v. 161, p. 1011-1012, 2003.

BONI, R., TOSTI, E., ROVIELLO, S., DALE, B. Intracellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 1050-1055, 1999.

CAMPOS-CHILLON, L. F., WALKER, D. J., DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F., SEIDEL JR., G. E. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology*, v. 65 (6), p. 1200-1214, 2006.

CAROLAN, C., LONERGAN, P., VAN LANGENDOCKT, A., MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, v. 43, p. 1115–1128, 1995.

CHANKITISAKUL, V., SOMFAI, T., INABA, Y., TECHAKUMPHU, M., NAGAI, T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology*, v. 79, p. 590–598, 2013.

CHARPIGNY, G., GUESNET, P., MARQUANT-LEGUIENE, B., HEYMAN, Y., MERMILLOD, P., HUMBLLOT, P. Fatty acid composition of tryglicerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. *Les actes du BRG 4*, p. 159–172, 2003.

CHIRALA, S.S., WAKIL, S.J. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*. v. 39, p. 1045-1053, 2004.

COMBELLES, C.M., ALBERTINI, D.F. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 812–821, 2003.

CONAGHAN, J., HANDYSIDE, A.H., WINSTON, R.M., LEESE, H.J. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 99, p. 87–95, 1993.

COOK, M.E., MILLER, C.C., PARK, Y., PARIZA, M.W. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Science*, v. 72, p. 1301-1305, 1993.

CROSIER, A.E., FARIN, P.W., DYKSTRA, M.J., ALEXANDER, J.E., FARIN, C.E. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 1375-1385, 2001.

DATTENA, M., ACCARDO, C., PILICHI, S., ISACHENKO, V., MARA, L., CHESSA, B., CAPPAL, P. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology*, v. 62, p. 481-493, 2004.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; PRIEIS, K.; SEIDEL Jr, G.E. Metabolic regulation of in vitro bovine embryos. I. Effect of metabolica regulators at different glucosa concentrations with embryos produced by semen from different bulls. *Reproduction Fertility and Development*. v.18, p. 585-596, 2006a.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; GARDNER, D.K.; PRIEIS, K.; GIBBONS, J.; SEIDEL Jr, G.E. Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during postcompaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reproduction Fertility and Development*, v. 18, p. 597-607, 2006b.

DE LOSS, F., KASTROP, P., VAN MAURYK., VANBENEDEN T.H., KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular Reproductive Development*. v. 28, p. 255-259, 1991.

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.

DINNYÉS, A., CAROLAN, C., LONERGAN, P., MASSIP, A., MERMILLOD. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced in vitro in synthetic oviduct fluid. *Theriogenology*, v. 42, p. 1425-1439, 1996.

DINNYÉS, A., DAI, Y., JIANG, S., YANG, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cells nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, v. 63, p. 513-518, 2000.

DOMINKO, T., FIRST, N.L. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 47, p. 456-467, 1997.

DUGAN, M.E., AALHUS, J.L., SCHAEFER, A.L., KRAMER, J.K.G. The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 77, p. 723-725, 1997.

DUQUE, P., HIDALGO, C.O., GOMEZ, E., PINTADO, B., FACAL, N., DIEZ, C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine in vitro embryo development and quality. *Reproduction Nutrition Development*, v. 43, p. 487-496, 2003.

DUNNING, K.R., CASHMAN, K., RUSSELL, D.L., THOMPSON, J.G., NORMAN, R.J., ROBKER, R.L. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biology of Reproduction* v. 83, p. 909-918, 2010.

DUNNING, K.R., AKISON, L.K., RUSSELL, D.L., NORMAN, R.J., ROBKER, R.L. Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to L-carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice. *Biology of Reproduction*, v. 85, p. 548-555, 2011.

DUNNING, K.R., ROBKER, L.R. Promoting lipid utilization with L-carnitine to improve oocyte quality. *Animal Reproduction Science*, v. 134, p. 69-75, 2012.

FAIR, T., HYTTEL, P., GREV, T., BOLAND, M. Cytoplasmic ultrastructure of growing and fully grown bovine embryos. *Anatomy and Embryology*, v. 195, p. 327-336, 1997.

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

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

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

FERNIE, A. R., CARRARI, F., SWEETLOVE, L.J., Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*. v. 7, p. 254–261, 2004.

FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A. Cytoplasmatic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v. 71, p. 836-848, 2009.

FU, XIANG-WEI, WU GUO-QUAN, LI JUN-JIE, HOU YUN-PENG, ZHOU GUANG-BIN, LUN-SUO, WANG YAN-PING, ZHU SHI-EN. Positive effects of Forskolin (stimulator of lipolysis) treatment on cryosurvival of *in vitro* matured porcine oocytes. *Theriogenology*, v. 75, p. 268–275, 2011.

GAJDA, B., BRYLA, M., SMORAG, Z. Effects of Protein Source, Vitamin E and Phenazine Ethosulfate on Developmental Competence and Quality of Porcine Embryos Cultured *in vitro*. *Folia biologica (Kraków)*. v. 56, p. 57-63, 2008.

GARDNER, D.K., POOL, T.B., LANE, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation and viability. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 18, p. 205–218, 2000.

GARDNER, D.K, LANE, M. Development of viable mammalian embryos in vitro: Evolution of sequential media. In: CIBELLI, J., LANZA, R.P, CAMPBELL, K.H.S., WEST, M.D. Principles of cloning. Elsevier science, USA, ISBN: 978-0-12-174597-4, cap. 9, p.187-2002.

GÓMEZ, E., RODRÍGUES, 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.

GOMIS J., CUELLO, C., SANCHEZ-OSORIO, J., GIL, M.A., PARRILLA, I., ANGEL, M.A., VAZQUEZ, J.M., ROCA, J., MARTINEZ, E.A. Forskolin improves the

cryosurvival of in vivo-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. *Cryobiology*, v. 66(2), p.144-50, 2013.

GONÇALVES, P. B. D, BARRETA, M. H., SANDRI, L. R., FERREIRA, R. ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P.B.D., OLIVEIRA, M.A.L., MEZZALIRA, A., MONTAGNER, M.M., VISINTIN, J.A., COSTA, L.F.S. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2ª Ed., São Paulo, Ed. Rocca, 2008.

GORDON, I. *Laboratory Production of Cattle Embryos*, 2ª Ed., Cambridge, CAB International University Press, 2003.

GRANLUND, L., PEDERSEN, J.I., NEBB, H.I. Impaired lipid accumulation by trans10, cis12 during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1687, p. 11–22, 2005.

GURAYA, S.S. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. *Journal of Experimental Zoology*. v. 160, p. 123–136, 1965.

HARVEY, A.J., KIND, K.L., THOMPSON, J.G. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, v. 123, p. 479–486, 2002.

HASHIMOTO, S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *Journal of Reproduction Development*, v. 55, p. 1–10, 2009.

HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 79, p. 245-264, 2003.

HILLMAN, N., FLYNN, T.J. The metabolism of exogenous fatty acids by preimplantation mouse embryos developing in vitro. *Journal of embryology and experimental morphology*. V. 56, p. 157–168, 1980.

HO, R., SHI, Q.H. Forskolin as a novel lipolytic agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.107, p. 157-164, 1982.

HOLM, P., BOOTH, P.J., SCHMIDT, M.H., GREVE, T., CALLENSSEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaaci medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology*, v. 52, p. 683–700, 1999.

HOLM, C. Molecular mechanisms of regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochemical Society Transactions*, v. 31, p. 1120-1124, 2003.

HONNOR, R.C., DHILLON, G.S., LONDOS, C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. II. Definition of steadystate relationship with lipolytic and antilipolytic modulators. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, p.15130–8, 1985.

HOUNGHTON, F. D., THOMPSON, J.G., KENNEDY, C.J., LEESE, H.J., Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Molecular Reproduction and Development*, v. 44, p. 476-485, 1996.

HUR, S.J., YE, B.W., LEE, J.L., HA, Y.L., PARK, G.B., JOO, S.T. Effects of conjugated linoleic acid on color and lipid oxidation of beef patties during cold storage. *Meat Science*, v. 66, p. 771-775, 2004.

HUR, S.J., PARK, G.B., JOO, S.T. Biological activities of conjugated Linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. *Livestock Science*, v. 110, p. 221-229, 2007.

IP, C., SINGH, M., THOMPSON, H.J., SCIMECA, J.A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Research*, v. 54, p. 1212-1215, 1994.

IWASAKI, S., YOSHIBA, N., USHIJIMA, H., WATANABE, S., NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 10, p. 279-285, 1990.

KASAI, M., MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproduction Biomedicine Online*, v. 9, p. 164-170, 2004.

KATO, Y., NAGAO, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. *Theriogenology*, v. 72, p. 624-635, 2009.

KEPPLER, C.R., IRNOS, K.P., McNEILL, J.J., TOVE, S.B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 241, p. 1350-1354, 1966.

KERNER, J., HOPPEL, C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1486, p. 1-17, 2000.

KHURANA, N.K., WALES, R.G. Effects of macromolecules recovered from uterine luminal fluid on the metabolism of [U-14C] glucose by mouse morulae and early blastocysts in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, v. 1, p. 89-98, 1989.

KHURANA, N.K., NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of 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.

KONG I.K., LEE, S.I., CHO, S.G., CHO, S.K., PARK, C.S. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*, v. 53, p. 1817-1826, 2000.

KRAEMER, F.B., SHEN, W.J. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di) acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *Journal of Lipid Research*, v. 43, p. 1585–1593, 2002.

KRISHER, R.L., LANE, M., BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultures in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*, v.60, p. 1345-1352, 1999.

KUBELKA, M., MOTLIK, J., SCHULTZ, R.M., PAVLOK, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 292-302, 2000.

KULESHOVA L.L., LOPATA A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 449-454, 2002.

KUWAYAMA, M., KATO, O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 17, p. 477, 2000.

KUWAYAMA, M., VAJTA, G., IEDA, S., KATO, O. Vitrification of human embryos using the CryoTip™ method. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 11, p. 608-614, 2005.

KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*, v. 67, p. 73-80, 2007.

LANE, M., BAVISTER, B.D., LYONS, E.A., FOREST, K.T. Containersless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature Biotechnology*, v.17, p. 1234- 1236, 1999.

LANE, M., GARDNER, D.K., HASLER, M.J., HASLER, J.F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology*. v. 60(3), p. 407-419, 2003.

LAPA, M., MARQUES, C.C., ALVES, S.P., VASQUES, M.I., BAPTISTA, M.C., CARVALHAIS, I., SILVA PEREIRA, M., HORTA, A.E.M., BESSA, R.J.B., PEREIRA, R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on Bovine Oocyte Competence and Fatty Acid Composition. *Reproduction in Domestic Animals*. v. 46, p. 904–910, 2011.

Leão, B.C.S., Rocha-Frigoni, N.A.S., Cabral, E.C., Coelho, M.B., Ferreira, C.R., Eberlin, M.N., Accorsi, M.F., Nogueira, É., Mingoti, G.Z. Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. *Theriogenology*. v. 84, p.127–136, 2015.

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 serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology*, v. 75(3), p. 429-33, 2011.

LEROY, J.L., VAN SOOM, A., OPSOMER, G., GOOVAERTS, I.G., BOLS, P.E. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in highyielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 623–632, 2008.

LIEBERMANN, J., DIETL, J., VANDERZWALMEN, P., TUCKER, M.J. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: Where are we now? *Reproductive Biomedicine Online*, v. 7, p. 623-633, 2003.

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.

LOEWENSTEIN, J. E., COHEN, A. I. Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, v. 12, p. 113–121, 1964.

LONDOS, C., BRASAEMLE, D.L., SCHULTZ, C.J., ADLER-WAILERS, LEVIN, D.M., KIMMEL, A.R., et al. On the control of lipolysis in adipocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 892, p.155-168, 1999.

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.

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.1169-1177, 2002.

MANJUNATHA, B.M., GUPTA, P.S.P., RAVINDRA, J.P., DEVARAJ, M., NANDI, S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. *The Veterinarian Journal*, v. 179, p. 287-291, 2009.

MARTÍNEZ, A.G., VALCÁCEL, A., DE LAS HERAS, D.G., MATOS, D.G., FURNUS, C.C., BROGLIATTI, G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. *Animal Reproduction Science*, v. 73, p. 11-21, 2002.

MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 1059-1069, 1996.

MARZZOCO, A., TORRES, B.B., *Bioquímica básica*. 3ª Ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2007.

MASSIP, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals (review). *Reproduction in Domestic Animals*, v. 36, p. 49-55, 2001.

MATORRAS, R., RUIZ, J. I., MENDOZA, R., RUIZ, N., SANJURJO, P., RODRIGUEZ-ESCUADERO, F. J. Fatty acid composition of fertilization-failed human oocytes. *Human Reproduction*, v. 13, p. 2227–2230, 1998.

MCEVOY, T.G., COULLm G.D., SPEAKE, B.K., STAINES, M.E., BROADBENT, P.J., Estimation of lipid and fatty acid composition of zona-intact pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 20, p. 10, 1997.

MCEVOY, T.G., COULL, G.D., BROADBENT, P.J., HUTCHINSON, J.S.M., SPEAKE, B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, p. 163–170, 2000.

MCEWAN, D.G., BRUNTON, V.G, BAILLIE, G.S., LESLIE, N.R., HOUSLAY, M.D., FRAME, M.C. Chemoresistant KM12C Colon Cancer Cells Are Addicted to Low Cyclic AMP Levels in a Phosphodiesterase 4-Regulated Compartment via Effects on Phosphoinositide 3-Kinase. *Cancer Research*, v. 67, 2007.

MCKEEGAN, P.J., STURMEY, R.G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. *Reproduction Fertility and Development*, v. 24, p. 59–67, 2012.

MEINECKE, B., JANAS, U., PODHAJSKY, E., MEINECKE-TILLMANN, S. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reproduction in Domestic Animals*, v.36, p.183-188, 2001.

MEN, H., AGCA, Y., RILEY, L.K., CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology*, v. 66, p. 2008-2010, 2006.

MENEZO, Y. Cryopreservation of IVF embryos: Which stage? *Obstetrics and Gynecology*, v. 113, p. 28-32, 2004.

MEZZALIRA, A., MEZZALIRA, J.C., MORAES, A.N., THALER NETO, A., VIEIRA, A.D., BARRETA, M.H., et al. Vitrification of bovine IVP embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. *Archives of Veterinary Science*, v. 9, p. 107–11, 2004.

MIFLIN, B.J., LEA, P.J. Amino Acid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*. v. 28, p. 299-329, 1977.

MINGORANCE, C., RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R., JUSTO, M.L., HERRERA, M.D., DE SOTOMAYOR, M.A. Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L-carnitine, *Nutrition Reviews*, v. 69, p. 279–290, 2011.

MOORE, K., BONILLA, A.Q., Cryopreservation of mammalian embryos: The state of the art. In: *Annual Review of Biomedical Sciences*. v. 8, p. 19-32, 2006.

MORIMOTO, C. KAMEDA, K., TSUJITA, T., OKUDA, H. Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *Journal of Lipid Research*, v. 42, p. 120-127, 2001.

MUCCI, N., ALLER, J., KAISER, G.G., HOZBOR, F., CABODEVILA, J., ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, v. 65, p. 1551–1562, 2006.

NAGANO, M., KATAGIRI, S., TAKAHASHI, Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote*, v. 14, p. 299–304, 2006.

NELSON, D.L., COX, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5ª ed. Porto Alegre, Ed. Armed, 2011.

NICOLOSI, R.J., ROGERS, E.J., KRITCHEVSKI, D., SCIMECA, J.A., HUTH, P.J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherogenesis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*, v. 22, p. 266-277, 1997.

O'FALLON, J. V., WRIGHT, R. W. Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. *Biology Reproduction*, v. 34, p. 58–64, 1986.

OTMAKHOV, N., Khibnik, L., OTMAKHOVA, N., CARPENTER, S., RIAHI, S., ASRICAN, B., LISMAN, J. Forskolin-Induced LTP in the CA1 Hippocampal Region Is NMDA Receptor Dependent. *Journal of Neurophysiology*, v. 91 (5), p. 1955-1962, 2004.

PARK, Y., ALBRIGHT, K.J., LIU, W., COOK, M.E., PARIZA, M.W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, v. 32, p. 853-858, 1997.

PARK, Y., STORKSON, K.J., 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.

PARK, Y., STORKSON, J.M., LIU, W., ALBRIGHT, K.J., COOK, M.E., PARIZA, M.H. Structure–activity relationship of conjugated linoleic acid and its cognates in inhibiting heparin-releasable lipoprotein lipase and glycerol release from fully differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, v. 15, p. 561–569, 2004.

PASCHOAL, D.M., SUDANO, M.J., RASCADO, T.S., MAGALHÃES, L.C.O., CROCOMO, L.F., LIMA-NETO, J.F., et al. Comparison between *in vivo* and *in vitro* produced embryos with forskolin after vitrification. *Reproduction Fertility and Development*, v. 23, p.147, 2010.

PASCHOAL, D.M., SUDANO, M.J., GUASTALI, M.D., DIAS, M.R.R., CROCOMO, L.F., OÑA M. L.C., SILVA, R. T., MARTINS, A., LANDIM, A.F.D. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*, v. 18, p. 1-12, 2012.

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. Cryosurvival 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. e MARQUES, C.C Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Banking*, v. 9, p. 267-277, 2008.

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.

PETERSON, D.G., MATITASHVILI, E.A., BAUMAN, D.E., Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *Journal of Nutrition*, v. 133, p. 3098–3102, 2003.

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

PRYOR, J.H., TRANT, J.A., PONCHIROLLI-SCHNEIDER, C.B., LOONEY, C.R., LONG, C.R., FORREST, D.W. The effect of forskolin on *in vitro* produced brahman-sired bovine embryos. *Reproduction Fertility and Development*, v. 21, p. 163, 2008.

PRYOR, J.H., TRANT, J.A., PONCHIROLLI-SCHNEIDER, C.B., LOONEY, C.R., LONG, C.R., FORREST, D.W. The use of forskolin and its effect on *in vitro*-produced brahman-sired embryos submitted to slow cool freezing or vitrification. *Reproduction Fertility and Development*, v. 22, p. 214, 2009. [abstract].

PRYOR, J.H., LOONEYA, C.R., ROMOB, S., KRAEMERC, D.C., LONGC, C.R. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching, *Theriogenology*, v.75(1), p. 24-33, 2011.

RICH, P.R. The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions*, v. 31, p. 1095–1105, 2003.

RIZZO, A.M., BERSELLI, P., ZAVA, S., MONTORFANO, G., NEGRONI, M., CORSETTO, P., et al. Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Advances in Experimental Medicine and Biology* . v. 698, p.52– 67, 2010.

RIZOS, D., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implication for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v.61, p.234-248, 2002.

RIZOS, D., LONERGAN, P., BOLAND, M. P., ARROYO-GARCIA, R., PINTADO, B., DE LA FUENTE, J., et al. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of Reproduction*, v. 66 p. 589-95, 2002.

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

RUSSELL, D.F., BAGIR, S., BORDIGNON, J., BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, p. 1255-1270, 2006.

SAITO, T., HIROI, M., KATO, T. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biology of Reproduction*, v. 50, p. 266–270, 1994.

SANCHES, B.V., MARINHO, L.S.R., FILHO, B.D.O., PONTES, J.H.F., BASSO, A.C., MEIRINHOS, M.L.G, SILVA-SANTOS, K.C., FERREIRA, C.R., SENEDA, M.M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology*, v. 80, p. 372–377, 2013.

SANTOS, J.E., 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 in Domestic Animals*. v. 43, p. 23–30, 2008.

SARAGUSTY, J., ARAV, A., Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Society for Reproduction and Fertility*, v. 141, p. 1470-1626 (impresso) 1741-7899(online), 2011.

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

SEIDEL JR, GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, p. 228 –35, 2006.

SHULZ, H. Beta oxidation of fatty acids. *Biochimica el Biophysica Acta*. v. 1081, p. 109-120. 1991.

SIRARD, M.A., RICHARD, F., MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, v.49, p.483-497, 1998.

SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.

SOMFAI, T., KANEDA, M., AKAGI, S., WATANABE, S., HARAGUCHI, S., MIZUTANI, E., DANG-NGUYEN, T.Q., GESHI, M., KIKUCHI, K., NAGAI, T.,. Enhancement of lipid metabolism with l-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reproduction Fertility and Development*, v. 23, p.912–920, 2011.

STINSHOFF, H., WILKENING, S., HANSTEDT, A., BOLLWEIN, H., WRENZYCKI, C.

Dimethylsulfoxide and conjugated linoleic acids affect bovine embryo development in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, v. 26, p. 502–510, 2014.

STOJKOVIC, M., MACHADO, S.A., STOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONCALVES, P.B., WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 904–909, 2001.

STROUD, B. Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Proceedings of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*, v. 29, p. 14-23, 2011.

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 in Domestic Animals*, v. 44(3), p. 50–58, 2009.

SUDANO, M.J., PASCHOAL, D.M., RASCADO, T.S., MAGALHAES, L.C., CROCOMO, L.F., DE 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 MJ, PASCHOAL DM, CAIXETA ES, SANTOS VG, TATA A, FERREIRA CR, MARTINS A JR, MACHADO R, EBERLIN MN, BURATINI JJ, LANDIM-ALVARENGA FC. Cryotolerance of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro and in vivo produced embryos. *Animal Reproduction*, v. 9, p. 677, 2012.

SUDANO, M. J., SANTOS, V.G., TATA, A., FERREIRA, C.R., PASCHOAL, D.M., MACHADO, R., BURATINI, J., EBERLIN, M. N., LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. *Biology of Reproduction*, v. 87, art. 130, p. 1–11, 2012.

SUDANO MJ, PASCHOAL DM, RASCADO TS, CROCOMO LF, MAGALHAES LCO, MARTINS A JR, MACHADO R, LANDIM-ALVARENGA FC. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*, v. 22(2), p. 124-31, 2014.

SUDANO, M.J., CAIXETA, E.S., PASCHOAL, D.M., MARTINS, A. JR., MACHADO, R., BURATINI, J., LANDIM-ALVARENGA, F.D. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Reproduction Fertility and Development*, v.26(8), p. 1129-41, 2014.

SUTTON, M.L., GILCHRIST, R.B., THOMPSON, J.G. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, v. 9 (1), p. 35–48, 2003.

SUTTON-MCDOWALL, M.L., FEIL, D., ROBKER, R.L., THOMPSON, J.G., DUNNING, K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v. 77, p. 1632–1641, 2012.

TAKAHASHI, T., INABA, Y., SOMFAI, T., KANEDA, M., GESHI, M., NAGAI, T., MANABE, N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction Fertility and Development*. v. 25, p. 589-599, 2013.

THIBIER, M. Data retrieval committee annual report. IETS Embryo Transfer Newsletter, v. 24, p. 12-18, 2006.

THOMPSON, J.G.; SIMPSON, A.C.; PUGH, P.A.; TERVIT, H.R. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 31, p. 253–257, 1992.

THOMPSON, J.G.; PARTRIDGE, R.J.; HOUGHTON, F.D.; COX, C.I.; LEESE, H.J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by *in vitro* derived bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 106, p. 299–306, 1996.

THOMPSON, J.G., SHERMAN, A.N.M., ALLEN, N.W., MCGOWAN, L.T., TERVIT, H.R. Protein content, synthesis and uptake in pre-elongation stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 50, p. 139–145, 1998.

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., In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 263-275, 2000.

THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compactation and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *J. Reproduction Fertility*, v. 118, p. 47-55, 2000.

TONG, L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Molecular Life Science*. v. 62 (16), p. 1784-1803, 2005.

TSANG, W.H., CHOW, K.L. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Bio Techniques*, v. 46, p. 550-552, 2009.

TSUJII, H., KHANDOKER, MAMMY, HAMANO, K., Lipid in mammalian embryo development. *Journal of mammalian ova research*. v. 18, p. 73-80, 2001.

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 of Reproduction*, v.60, p. 535-539. 1999.

VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle, *Theriogenology*, v.45, p. 683-689, 1996.

VAJTA, G., BOOTH, P.J., HOLM, P. GREVE, T., CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters*, v. 18, p. 191-195, 1997.

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., JACOBSEN, H., GREVE, T., et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v.51, p. 51-53, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.357-364, 2000.

VAJTA G, KUWAYAMA M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v. 65, p. 236-44, 2006.

VAN BLERKOM, J., DAVIS, P.W., LEE, J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in vitro fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction*, v. 10, p. 415–424, 1995.

VAN MEER, G., VOELKER, D.R., FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 112–124, 2008.

VANCE, D.E., VANCE, J.E., *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5^a Ed. Elsevier Science, 2008.

VARAGO, F.C., SALIBA, W.P., ALVIM, M.T.T., VASCONCELOS A.B., OLIVEIRA, C.H., STAHLBERG, R., LAGARES M.A. Vitrification of in vitro produced Zebu embryos. *Animal Reproduction Sciences*. v. 3, n. 3, p. 353-358, 2006.

VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 35, p. 915-924, 2007.

VIEIRA, A.D., MEZZALIRA, A., BARBIERI, D.P., LEHMKUHL, R.C., RUBIN, M.I.B., VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, v. 45, p. 91–94, 2002.

VIEIRA, A.D., FORELL, F., FELTRIN, C., RODRIGUES, J.L. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. *Animal Production Science*, v. 99, p. 377-383, 2007.

VICENTE, J.S., GARCIA-XIMENEZ, F. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology*, v. 42, p. 1205-1215, 1994.

VISINTIN, J.A., MARTINS, J.F.P., BEVILACQUA, E.M., MELLO, M.R.B., NICÁCIO, A.C., ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: Are they really different? *Theriogenology*, v. 57, p. 345-359, 2002.

VIUFF, D., RICKORDS, L., OFFENBERG, H., HYTTEL, P., AVERY, B., GREVE, T., OLSAKER, I., WILLIAMS, J.L., CALLESEN, H., THOMSEN, P.D. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 1273-1278, 1999.

ZENON Y., PEARL M., BOROCHOV A. & ARAV A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology*, v. 38, p 35-42, 1999.

WALES, R.G., DU, Z.F. Contribution of the pentose phosphate pathway to glucose utilization by preimplantation sheep embryos. *Reproduction Fertility and Development*, v. 5, p. 329–340, 1993.

WALES, R.G., HUNTER, J. Participation of glucose in the synthesis of glycoproteins in preimplantation mouse embryos. *Reproduction Fertility and Development*, v. 2, p. 35-50, 1990.

WANG, W., DAY, B.N., WU, G. How does polyspermy happen in mammalian oocytes? *Microscopy Research Techniques*, v.61, p.335-341, 2003.

WATANABE, Y. F.; ACCORSI, M. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; MEIRELLES, F. V. Aspecto comercial de embriões produzidos in vitro. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, cap. 15, p.293-301.

WARD, F., ENRIGHT, B., RIZOS, D., BOLAND, M., LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, v.57, n.8, p. 2105-2117, 2002.

WARNICK, G.R. Enzymatic methods for quantification of lipoprotein lipids. *Methods Enzymology*, v.129, p.101–23, 1986.

WERLICH, D.E., BARRETA, M.H., MARTINS, L.T., VIEIRA, A.D., MORAES, A.N, MEZZALIRA, A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 77-82, 2006.

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., LEMME, E., KORSawe, K., NIEMANN, H. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 593-603, 2004.

WRIGHT R.W., ELLINGTON J. Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology*, v. 44, p.1167-1189, 1995.

WU, GUOYAO. Amino acids: metabolism, functions and nutrition. *Amino Acids*. v. 37, p.1-17, 2009.

WU, G.Q., JIA, B.Y., LI, J.J., FU, X.W., ZHOU, G.B., HOU, Y.P., ZHU, S.E., L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology*, v. 76, p. 785–793, 2011.