

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 06/06/2018.

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

**REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO
INTRACITOPLASMÁTICO DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* COMO ESTRATÉGIA PARA
MELHORAR A CRIORESISTÊNCIA AO PROCESSO DE
VITRIFICAÇÃO**

**Melissa Meneghel
Médica Veterinária**

2016

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

**REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO
INTRACITOPLASMÁTICO DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* COMO ESTRATÉGIA PARA
MELHORAR A CRIORESISTÊNCIA AO PROCESSO DE
VITRIFICAÇÃO**

Melissa Meneghel

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zoccal Mingoti

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da 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.

2016

Meneghel, Melissa
M541r Redução do conteúdo lipídico intracitoplasmático de embriões bovinos produzidos *in vitro* como estratégia para melhorar a crioressistência ao processo de vitrificação / Melissa Meneghel. -- Jaboticabal, 2016
xi, 68 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Gisele Zoccal Mingoti
Banca examinadora: Joaquim Mansano Garcia, Lindsay Unno Gimenes, Felipe Perecin, Fernanda da Cruz Landim
Bibliografia
1. Ácido linoleico. 2. Criopreservação. 3. Forskolin. 4. Concepção.
5. Transferência de embriões PIVE. 6. Bovinos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.2

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO INTRACITOPLASMÁTICO DE EMBRIÕES
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* COMO ESTRATÉGIA PARA MELHORAR A
CRIORESISTÊNCIA AO PROCESSO DE VITRIFICAÇÃO**

AUTORA: MELISSA MENEGHEL

ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

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

Gisele Zoccal Mingoti
Prof. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMV / UNESP Araçatuba

Joaquim Mansano Garcia
Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Felipe Perecin
Prof. Dr. FELIPE PERECIN
FZEA / USP - Pirassununga, SP

Lindsay Unno Gimenes
Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Fernanda da Cruz Landim
Profa. Dra. FERNANDA DA CRUZ LANDIM
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária / FMVZ / UNESP - Botucatu

Jaboticabal, 06 de junho de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MELISSA MENEGHEL – nascida em Americana – SP, aos 4 dias do mês de dezembro de 1979. Concluiu o ensino médio no Colégio Salesiano Dom Bosco, na cidade de Americana – SP, em dezembro de 1997. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na UNIMAR – Universidade de Marília, em fevereiro de 1998. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2002. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2003, sob orientação do Dr. Rafael Herrera Alvarez. Concluiu o mestrado em junho de 2005. Atuou profissionalmente na CVG – Clínica Veterinária Garça, durante novembro de 2003 a junho de 2006. Desde junho de 2006, até o momento é responsável técnica na empresa Fazenda União e desde novembro de 2007 até o momento presta assessoria em Reprodução Animal e Embriologia à Achilles Genetics – Biotecnologia da Reprodução Animal. Em 2012, iniciou o doutorado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, na área de Reprodução Animal, sob orientação da Prof^a Dr^a Gisele Zoccal Mingoti, concluído em junho de 2016.

EPÍGRAFE

“Se não podes entender, crê para que entendas.

A fé precede, o intelecto segue”.

Santo Agostinho

“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.

Mas sem ela, o oceano será menor”.

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho a meu pai Paulo que há muito não está conosco, mas
tenho certeza que sabe onde estou;
e a minha mãe Lilian por todo seu amor e apoio em todas as minhas
conquistas.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais uma conquista, por me mostrar que sou protegida, guiada e iluminada pela sua presença, agradeço Senhor, pela sua compaixão, graça e bondade, que estão sempre presentes, sustentando-me nos momentos mais difíceis...

À minha querida orientadora Prof^a. **Gisele Zoccal Mingoti**, que me permitiu fazer parte de sua equipe de pesquisa, por sua paciência, confiança, dedicação, ensinamentos e todo seu esforço para que esse trabalho fosse realizado.

Aos meus pais **Paulo** (*in memorian* e eternamente no meu coração) e **Lilian**, por todo amor, exemplo, carinho, dedicação e por viverem intensamente todos os meus sonhos e conquistas.

Às minhas irmãs **Fernanda** e **Paula**, meus avós **Santo**, **Azenir** e **Maria**, aos meus amados sobrinhos **Maria Eduarda** e **Paulinho** e a todos meus familiares por todo amor, apoio, orações e por entenderam minha ausência frequente.

Às minhas queridas companheiras de trabalho no laboratório: **Priscila Chediek Dall' Acqua** e **Marcela Ambrogi** por toda imprescindível ajuda, conselhos, ensinamentos e carinho. Também, à **Nathalia Rocha Frigronni** e **Beatriz Caetano da Silva Leão**, pelo apoio. Com certeza, uma grande amizade foi construída .

Aos funcionários da Unesp **Adão Custódio** e **Pedro Florindo** pela ajuda e disposição com os ovários. Ao funcionário **Alexandre José Teixeira** por toda ajuda dispensada na organização do laboratório.

À pós graduação, especialmente à **Branca Rochidali José**, por todo apoio e carinho.

Às estagiárias que acompanharam o experimento e que muito ajudaram na realização das atividades experimentais: **Juliana Marques**, **Juliana Viegas de Assis**, **Karine Casanova** e **Luana Rodrigues Teixeira**.

Ao Dr. **Eriklis Nogueira** e ao **Yuri Tani Utsunomiya** pela paciência e colaboração com a estatística.

À todas as empresas que muito contribuíram para a realização deste trabalho: **Fazenda União**, por ceder todos os animais utilizados no experimento; **Concepção**

Reprodução Bovina, em nome dos Médicos Veterinários **Lucas Maciel Gouvêia** e **Guilherme Germani**, por todo auxílio nas OPUs, TEs, diagnósticos de gestação e sexagem dos animais, minha eterna gratidão, sem vocês esse trabalho não teria acontecido; **Achilles Genetics - Biotecnologia em Reprodução Animal**, em nome do Médico Veterinário, namorado e amigo **Marcos Antônio de Achilles**, que sempre me apoiou e me inspirou à paixão pela criopreservação; **Brasfrigo**, pela ajuda na colheita e fornecimento dos ovários.

Aos funcionários da Fazenda União: **Carlos Alberto Nunes da Matta, Willian José de Souza, Mauro Leandro da Silva, Vilson Alves Ferreira, Abadio César dos Santos e José Eronato de Moura**, por todo manejo e ajuda com os animais, sem o trabalho em equipe nada disso seria possível.

À minhas amigas de pós graduação que tive o prazer de conhecer e conviver durante esses anos, **Luisa Cunha Carneiro e Bruna Kipper**.

Às minhas grandes amigas **Milena, Denise, Daniela, Muriely e Cristina** pelo apoio, torcida e orações.

À querida amiga **Elenita**, por todo carinho, amor, apoio, orações e por cuidar de mim como uma mãe.

À **Capes** pela bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Suplementos proteicos e macromoléculas adicionados ao meio de cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos e seus efeitos sobre o acúmulo lipídico intracitoplasmático.....	3
2.2 Metabolismo lipídico celular.....	4
2.3 Métodos de delipidação de embriões.....	7
2.3.1 Delipidação mecânica.....	7
2.3.2 Delipidação química.....	8
2.3.2.1 Forskolin.....	8
2.3.2.2 Ácido linoleico.....	10
2.4 Criopreservação de embriões produzidos <i>in vitro</i>	12
3. HIPÓTESE.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivos específicos.....	16
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1 Condições experimentais.....	18
5.2 Reagentes e soluções.....	18
5.3 Obtenção e seleção de oócitos provenientes de ovários de abatedouro.....	19
5.4 Maturação <i>in vitro</i>	19
5.5 Avaliação da maturação nuclear.....	20
5.6 Fertilização <i>in vitro</i>	20
5.7 Cultivo de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	21

5.8 Quantificação de lipídios intracitoplasmáticos e mensuração do diâmetro embrionário.....	21
5.9 Avaliação da taxa de apoptose embrionária: detecção da fragmentação nuclear através da coloração com “Terminal Transferase Assay” – TUNEL.....	22
5.10 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	22
5.11 Vitrificação e análise da re-expansão pós-aquecimento.....	23
5.12 Aspiração folicular guiada por ultrassom.....	24
5.13 Sincronização das receptoras.....	25
5.14 Avaliação da taxa de concepção.....	26
5.15 Sexagem e viabilidade fetal.....	26
5.16 Delineamento Experimental.....	26
5.16.1 Experimento 1: Efeitos da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de forskolin sobre o desenvolvimento embrionário e teor lipídico intracitoplasmático de embriões bovinos	26
5.16.2 Experimento 2: Efeitos da suplementação com ácido linoleico durante diferentes etapas da produção <i>in vitro</i> sobre o desenvolvimento embrionário e teor lipídico intracitoplasmático de embriões bovinos.....	27
5.16.2.1 Experimento 2A: Avaliação da maturação nuclear.....	27
5.16.2.2 Experimento 2B: Avaliação do desenvolvimento embrionário e quantificação intracelular de lipídios.....	27
5.16.3 Experimento 3: Efeitos da suplementação do meio de cultivo <i>in vitro</i> com forskolin e/ou ácido linoleico sobre o desenvolvimento embrionário, taxa de apoptose e criotolerância do embrião bovino.....	28
5.16.4 Experimento 4: Efeitos da exposição de embriões bovinos ao Forskolin durante o cultivo <i>in vitro</i> sobre a criotolerância embrionária e sobre a taxa de concepção após transferência.....	29
5.17 Análise estatística.....	29
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Experimento 1.....	32
6.2 Experimento 2.....	34
6.2.1 Experimento 2 A.....	34
6.2.2 Experimento 2 B.....	34

6.3 Experimento 3.....	37
6.4 Experimento 4.....	43
7. DISCUSSÃO.....	46
8. CONCLUSÃO.....	54
9. REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

A I – anáfase I

AMPc – monofosfato de adenosina cíclica

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

BME – meio basal Eagle

BSA – albumina sérica bovina

CIV – cultivo *in vitro*

CL - corpo lúteo

CLA – ácido linoleico conjugado

CO₂ – dióxido de carbono

CCOs - complexo *cumulus oophorus*

D - direito

DGAT2 - diacilglicerol aciltransferase 2

DMSO - dimetilsulfóxido

DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline = solução salina em tampão fosfato

DV 1 – solução de desvitrificação 1

DV 2 – solução de desvitrificação 2

DV 3 – solução de desvitrificação 3

E - esquerdo

ECG – gonadotrofina coriônica equina

EG – etileno glicol

EPM – erro padrão da média

FERT-TALP – tyrode albumina lactato piruvato

FIV – fertilização *in vitro*

FL – fosfolipídios

FORSK - forskolin

FSH – hormônio folículo estimulante

g - força gravitacional

- G** – Gauge (unidade de medida de calibre)
- GVBD** – quebra da vesícula germinativa
- hCG** – gonadotrofina coriônica humana
- HEPES** - N- (2-hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid); 4- (2 Hydroxyethyl) piperazine- 1-ethanesulfonic acid
- hpi** – horas pós-inseminação
- ICSI** – injeção intracitoplasmática de espermatozoides
- IETS** – “International Embryo Transfer Society”
- LA** - ácido linoleico
- LH** – hormônio luteinizante
- MAPK** – proteína cinase ativada por mitógenos
- MEM** – minimum essential medium
- MEP** - morte embrionária precoce
- MHz** – megahertz
- MI** – metáfase I
- MII** – metáfase II
- MIV** – maturação *in vitro*
- mL** - mililitro
- mm** - milímetro
- mM** - milimolar
- mmHg** – milímetros de mercúrio
- MZT** – transição materno-zigótica
- NM** - natimorto
- O₂** – oxigênio
- OPU** – *Ovum Pick-Up*
- PHE** – penicilamina, hipotaurina e epinefrina
- PIVE** – produção *in vitro* de embriões
- PKA** – proteína cinase A
- PMSG** – gonadotrofina de soro de égua prenhe
- PO** - pura de origem
- PUFA** - ácido graxo poli-insaturado
- PVP** - polivinilpirrolidona

RE - retículo endosplasmático

ROS - *reactive oxygen species* = espécies reativas de oxigênio

SFB – soro fetal bovino

SOFaa – *synthetic oviduct fluid* = fluído sintético de oviduto suplementado com aminoácidos

SOV – superovulação

T I – telófase I

TAG – triacilgliceróis

TALP-FIV – tyrode's albumin lactate piruvate

TCM 199 – *tissue culture medium 199*

TE – transferência de embriões

TUNEL - Terminal Transferase Assay

UI – unidades internacionais

V1 – solução de vitrificação 1

V2 – solução de vitrificação 2

VG – vesícula germinativa

vs – versus

µg – micrograma

µL - microlitro

µm - micrometro

µM – micromolar

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos cultivados <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de forskolin.....	32
Tabela 2. Efeitos da suplementação com ácido linoleico durante diferentes etapas da produção <i>in vitro</i> (maturação e/ou cultivo embrionário) sobre a clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto.....	35
Tabela 3. Efeitos da suplementação com forskolin e/ou ácido linoleico durante o cultivo <i>in vitro</i> sobre a clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto.....	37
Tabela 4. Taxas de sobrevivência pós-aquecimento de blastocistos bovinos cultivados <i>in vitro</i> na presença de forskolin e/ou ácido linoleico.....	43
Tabela 5. Variáveis analisadas de acordo com os tratamentos (Controle X Forskolin).....	44
Tabela 6. Variáveis analisadas de acordo com o tipo de embrião (Fresco X Vitrificado).....	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura química e representação de um fosfolipídio.....	5
Figura 2: Esquema da bicamada lipídica que constitui as membranas celulares.....	5
Figura 3: Estrutura química do LA, CLA <i>cis</i> 9 <i>trans</i> 11, CLA <i>trans</i> 10 e <i>cis</i> 12 e ALA.....	7
Figura 4: Esquema representativo da ação do forskolin como agente lipolítico no embrião: ativação da adenilato ciclase, do monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) e liberação do glicerol.....	10
Figura 5: Representação esquemática do protocolo de sincronização das receptoras.....	26
Figura 6: Quantificação de lipídios (em pixels) em blastocistos expandidos cultivados <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de forskolin.....	33
Figura 7: Fotomicrografias representativas de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> na presença de diferentes concentrações de forskolin.....	33
Figura 8: Efeito da adição do ácido linoleico no meio de maturação sobre a progressão da meiose.....	34
Figura 9: Efeitos da suplementação com ácido linoleico durante diferentes etapas da produção <i>in vitro</i> de embriões sobre a quantificação de lipídios intracitoplasmáticos em blastocistos expandidos.....	36
Figura 10: Fotomicrografias representativas de embriões bovinos tratados com ácido linoleico em diferentes etapas da produção <i>in vitro</i>	36
Figura 11: Quantificação de lipídios intracitoplasmáticos em blastocistos expandidos cultivados <i>in vitro</i> na presença de forskolin e/ou ácido linoleico.....	38
Figura 12: Fotomicrografias representativas de embriões bovinos tratados com forskolin e/ou ácido linoleico durante o cultivo <i>in vitro</i>	39
Figura 13: Avaliação do diâmetro de blastocistos expandidos cultivados <i>in vitro</i> na presença de forskolin e/ou ácido linoleico.....	39
Figura 14: Número total de células em blastocistos bovinos cultivados <i>in vitro</i> na presença de forskolin e/ou ácido linoleico.....	40

Figura 15: Potencial mitocondrial em blastocistos bovinos cultivados <i>in vitro</i> na presença de forskolin e/ou ácido linoléico.....	41
Figura 16: Proporção de blastômeros em apoptose (TUNEL-positivo) e de blastômeros normais (TUNEL-negativo) em blastocistos bovinos cultivados <i>in vitro</i> na presença de forskolin e/ou ácido linoleico.....	42

REDUÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO INTRACITOPLASMÁTICO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* COMO ESTRATÉGIA PARA MELHORAR A CRIORESISTÊNCIA AO PROCESSO DE VITRIFICAÇÃO

RESUMO - O presente estudo teve como objetivos avaliar os efeitos de estimuladores da lipólise (Forskolin: Forsk) e inibidores da lipogênese (Ácido Linoléico: LA) durante o cultivo *in vitro* (CIV) sobre o acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos e criotolerância do embrião bovino, bem como avaliar o efeito do tratamento dos embriões com Forsk sobre a taxa de concepção após transferência para receptoras. Oócitos ($n=1242$) foram maturados *in vitro* (MIV) durante 22h a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar em meio TCM-199 bicarbonato com 10% SFB e hormônios. Após fecundação, os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF (grupo Controle) suplementado com: 100 µM LA durante todo o período do CIV (grupo LA); ou 5 µM Forsk a partir do dia 6 do CIV (grupo Forsk); ou com associação de LA e Forsk, como acima descrito (grupo LA+Forsk). O CIV foi conduzido a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar, por 7 dias. O desenvolvimento embrionário foi avaliado no dia 7 do CIV (D7), quando os blastocistos foram corados com Sudan Black B 1% para determinação do conteúdo lipídico intracitoplasmático. Os embriões foram avaliados em microscopia de luz e as imagens obtidas foram analisadas por Q-Capture Pro Image Software. O grupo Controle foi escolhido como calibrador e a média de cada grupo foi dividida pela média do calibrador para calcular a intensidade relativa de pixels, expressa em unidades arbitrárias. Os blastocistos expandidos foram vitrificados (Vitri Ingá®), aquecidos e cultivados por 24h em SOF para determinação das taxas de re-expansão. Os dados foram analisados por ANOVA seguido por teste de Tukey, e as taxas de re-expansão por qui-quadrado ($P<0,05$). Não foi observada diferença entre os grupos ($P>0,05$) na taxa de produção de blastocistos entre os grupos (variação entre 47,2±3,9% e 51,6±5,5%). Observou-se diminuição ($P<0,05$) da quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos nos embriões do grupo Forsk (0,86±0,04) comparado com Controle (0,99±0,02) e LA (1,02±0,02); no entanto, o grupo LA+Forsk (0,95±0,03) não diferiu ($P>0,05$) dos demais. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos na taxa de re-expansão imediata após o aquecimento (0h: 30,8% a 41,9%). Após cultivo de 24h, a re-expansão foi maior ($P<0,05$) no grupo Forsk (71,4%) comparado com Controle (46,2%) e LA+Forsk (45,2%); o grupo LA (65,1%) não diferiu dos demais ($P>0,05$). Baseado nestes resultados, o tratamento com 5 µM Forsk foi escolhido para o desenvolvimento do próximo experimento: oócitos ($n=1947$) foram aspirados de 22 doadoras Nelore e foram maturados e fecundados *in vitro* como acima descrito. Os prováveis zigotos foram cultivados de acordo com os tratamentos Controle e Forsk acima descritos e, no D7, foram vitrificados e aquecidos, antes de serem transferidos para receptoras sincronizadas. Os dados da taxa de concepção foram analisados através do modelo linear misto generalizado com medidas repetidas, do pacote Imea4 do software R v3.2.5. A taxa de concepção após transferência dos embriões aquecidos foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos Controle (25,00±6,53%) e Forsk (30,77±7,39%). De acordo com os resultados obtidos, o tratamento com Forsk foi eficiente para promover a redução da quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos e melhorar a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Apesar disso, não aumentou a taxa de concepção.

Palavras-chave: ácido linoleico, criopreservação, forskolin, concepção, transferência de embriões PIVE

REDUCTION OF INTRACYTOPLASMIC LIPID CONTENT IN *IN VITRO*-PRODUCED BOVINE EMBRYOS AS A STRATEGY TO IMPROVE THE CRYORESISTANCE TO VITRIFICATION

ABSTRACT - The objective of the present study was to evaluate the effects of supplementation of *in vitro* culture (IVC) medium with drugs that stimulates the lipolysis (Forskolin: Forsk) and inhibit the lipogenesis (Linoleic Acid LA) on the intracytoplasmic lipid content and cryotolerance of bovine embryos, as well as to evaluate the effect of treatment of embryos with Forsk on the pregnancy rates after transfer to synchronized recipients. Oocytes ($n=1242$) were matured *in vitro* for 22h at 38.5°C and 5% CO₂ in air in medium TCM199 with 10% FCS and hormones. After fertilization, presumptive zygotes were cultured in SOF medium (Control group) supplemented with: 100 µM LA throughout the culture period (LA group); or 5 µM Forsk from the 6th day to the end of the culture (Forsk group); or with the association of LA and Forsk, as described above (LA+Forsk group). The IVC was conducted at 38.5°C and 5% CO₂ in air, for 7 days. Embryonic development was assessed on day 7 of culture (D7), when blastocysts were stained with 1% Sudan Black B to determine the intracytoplasmic lipid content. The embryos were evaluated by light microscopy and the images were analyzed by Q-Capture Pro Image software. The Control group was chosen as a calibrator and the measured value of each treatment was divided by the mean of the calibrator to generate the relative expression levels of pixels, expressed in arbitrary units. The expanded blastocysts were vitrified (Vitri Ingá®), warmed and cultured for 24h in SOF to evaluate the re-expansion rates. The data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and rates of re-expansion by qui-square ($P<0.05$). No differences were observed between treatments ($P>0.05$) in blastocysts production rates ($47.2\pm3.9\%$ to $51.6\pm5.5\%$). Intracytoplasmic lipid content was decrease ($P<0.05$) in embryos from Forsk group (0.86 ± 0.04) compared to Control (0.99 ± 0.02) and LA (1.02 ± 0.02); however, all these treatments were similar ($P>0.05$) to LA+Forsk group (0.95 ± 0.03). There were no differences ($P>0.05$) between treatments in the rates of re-expansion immediately after warming (0h: 30.8% to 41.9%); after 24h of culture post-warming the re-expansion rates were higher ($P<0.05$) in Forsk group (71.4%) compared with Control (46.2%) and LA+Forsk (45.2%) groups, but there were no differences between LA group (65.1%) and the other groups ($P>0.05$). Based on these results, treatment with 5 µM Forsk was chosen for the next experiment: oocytes ($n=1947$) were aspirated from 22 Nelore donors and were matured and fertilized *in vitro* as described above. Presumptive zygotes were cultured according to the treatments Control and Forsk as described above, and in D7 the expanded blastocysts were vitrified and warmed, before being transferred to synchronized recipients. The data of pregnancy rates were analyzed using a generalized linear mixed model framework with repeated measurements, in the lme4 package in R v3.2.5 software. The pregnancy rates after transfer of vitrified-warmed embryos were similar ($P>0.05$) between Control ($25.00\pm6.53\%$) and Forsk ($30.77\pm7.39\%$) groups. According to the results, treatment with Forsk was effective to promote the reduction of intracytoplasmic lipids content in *in vitro*-produced bovine embryos and improved their cryotolerance. Nevertheless, it did not increase the pregnancy rates.

Keywords: linoleic acid, cryopreservation, forskolin, pregnancy, IVP embryos transfer.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a introdução de biotecnologias reprodutivas inovadoras na pecuária permitiu crescimento significativo do setor e possibilitou maior eficiência e rentabilidade aos produtores e suas empresas de produção animal (BLONDIN, 2015). O aprimoramento e a difusão da técnica de inseminação artificial em bovinos, dentro dos programas de melhoramento genético animal, bem como a demanda por sistemas de produção mais eficientes, intensificaram o estudo e o desenvolvimento de biotecnologias como transferência, produção *in vitro*, criopreservação e micromanipulação de embriões.

Nas espécies de interesse zootécnico, a aplicação dessas biotecnologias, principalmente a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a criopreservação, possui mercado potencial atrativo, considerando que, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possuía 209 milhões de bovinos em 2014 (<http://www.ibge.gov.br>).

Atualmente, a produção global de embriões produzidos *in vitro* na espécie bovina ultrapassou a marca de meio milhão, com um total de 546.628 embriões FIV produzidos, sendo 517.587 por “Ovum Pick-Up” (OPU) e 29.041 por ovários de matadouros. Deste total, 70,8% dos embriões por OPU foram produzidos pelo Brasil (PERRY, 2015).

A PIVE está sendo cada vez mais utilizada na indústria de transferência de embriões, devido a uma melhora significativa nos meios de cultivo *in vitro* (BLONDIN, 2015), a fim de se obter embriões de melhor qualidade e com resultados superiores de prenhez, tanto de embriões frescos como criopreservados.

A criopreservação de embriões tem sido uma ferramenta útil à embriologia, desde o relato da primeira criopreservação em camundongos realizada com sucesso em 1972 (WHITTINGHAM et al., 1972). Esta biotecnologia é uma ferramenta fundamental para o armazenamento e para o intercâmbio de recursos genéticos de animais de produção e de espécies ameaçadas de extinção (ALMIÑANA; CUELLO, 2015).

O aperfeiçoamento dos protocolos de congelamento e desenvolvimento da técnica de vitrificação levaram a grandes avanços na criopreservação de embriões

nos últimos 30 anos (ALMIÑANA; CUELLO, 2015). Atualmente, a criopreservação de embriões é rotineiramente utilizada em programas comerciais de transferência de embriões (TE) bovinos produzidos *in vivo*; de acordo com a “*International Embryo Transfer Society*” (IETS), em 2013 quase 60% das transferências de embriões bovinos foram realizadas utilizando embriões criopreservados (IETS, 2014).

A grande quantidade de lipídios em embriões produzidos *in vitro* implica em maior sensibilidade dos embriões a injúrias causadas pelo frio (PEREIRA et al., 2008). A remoção mecânica de lipídios antes da criopreservação foi proposta por Nagashima et al. (1995) para superar este problema. No entanto, as manipulações que perturbam a zona pelúcida devem ser evitadas e, devido a isso, a delipidação parcial por agentes químicos tem sido proposta como uma estratégia mais adequada. Neste sentido, o uso de agentes lipolíticos, tal como o forskolin (MEN et al., 2006), ou de agentes inibidores da lipogênese, tal como o ácido linoleico (PEREIRA et al., 2004; 2007; 2008), demonstrou efeito positivo no aumento das taxas de sobrevivência embrionária pós-criopreservação ao promover a diminuição do conteúdo lipídico dos embriões bovinos. Contudo, a associação destes agentes ainda não foi descrita na literatura.

Desta forma, para produzir embriões *in vitro* mais criotolerantes, a proposta deste estudo foi utilizar o agente lipolítico forskolin e o agente inibidor da lipogênese ácido linoleico, isoladamente ou em associação, visando diminuir a quantidade total de lipídios intracelulares, aumentar a sobrevivência pós-aquecimento e aumentar as taxas de concepção após transferência de embriões criopreservados para receptoras.

8. CONCLUSÃO

Em face dos resultados obtidos, conclui-se que:

- o forskolin, na dose de 5,0 μM , adicionado ao D6 do cultivo, reduziu a quantidade de lipídios intracitoplasmáticos e não interferiu na produção de blastocistos (Experimento 1);
- o ácido linoleico não interferiu na progressão da meiose de oócitos bovinos quando adicionado ao meio de maturação *in vitro* (Experimento 2A);
- o ácido linoleico adicionado ao meio de cultivo reduziu a quantidade de lipídios intracitoplasmáticos em embriões bovinos produzidos *in vitro* e não interferiu na produção de blastocistos (Experimento 2B);
- a adição de forskolin associado ao ácido linoleico no cultivo *in vitro* diminuiu parcialmente a quantidade de lipídios intracitoplasmáticos e não interferiu na produção de blastocistos (Experimento 3);
- a adição de forskolin e/ou ácido linoleico durante o cultivo *in vitro* não afetou a qualidade dos embriões produzidos, avaliada pela ocorrência de apoptose e pela função mitocondrial (Experimento 3);
- a adição de forskolin ao cultivo *in vitro* estimulou o aumento do número de células e do diâmetro dos embriões produzidos (Experimento 3);
- não houve melhora na taxa de concepção após transferência de embriões criopreservados que foram tratados com o forskolin durante o cultivo *in vitro* (Experimento 4);
- a taxa de concepção após transferência de embriões frescos foi maior do que a de embriões criopreservados (Experimento 4);
- foi observado um número maior de fetos machos em comparação a fêmeas (Experimento 4);
- o uso de forskolin ou o tipo do embrião (fresco ou vitrificado) não influenciou na MEP, abortos ou NM (Experimento 4);
- o forskolin não afetou o peso ao nascimento dos animais, porém os machos apresentaram peso superior ao das fêmeas (Experimento 4).

9. REFERÊNCIAS

- ABD EL RAZEK, I. M.; CHARPINY, G.; KODJA, S.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; MERMILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C. Differences in lipids composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 12-19, 2000.
- ABE, H.; YAMASHITA S.; SATOH T.; HOSHI H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos develops in different culture systems using serum-free or serumcontaining media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 57–66, 2002.
- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, p. 193-202, 2003.
- ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts *in vivo* and *in vitro*. **Anatomy and Embryology**, v. 199, p. 519–527, 1999a.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 325 - 335, 1999b.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serumcontaining media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 57–66, 2002.
- ACOORSI, M. F. **Avaliação de embriões bovinos cultivados in vitro na presença de ácidos graxos e sua sobrevivência pós-criopreservação**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- ACCOORSI, M. F.; LEÃO, B. C. S.; ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; PERRI, S. H. V.; MINGOTI, G. Z. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured *in vitro* with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance. **Zygote**, v.9, p. 1-10, 2015.
- AFFORD, S.; RANDHAWA, S. Apoptosis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 53, p. 55-63, 2000.

AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M. H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v. 93, p. 30-36, 2011.

ALLEN, G. P. The pregnancy that doesn't stay-lessons from 25 years of observation. **The Veterinary Journal**, v. 153, p. 239-244, 1997.

ALMIÑANA, C.; CUELLO, C. Quais os avanços na criopreservação de embriões? In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2015, Gramado. **Anais...** Gramado, 2015. p. 99-109.

ARRESE, E. L.; MATTHEW, T. F.; GAZARD, J. L.; WELLS, M. A. Calcium and cAMP are second messengers in the adipokinetic hormone-induced lipolysis of triacylglycerols in *Manduca sexta* fat body. **Journal of Lipid Research**, v. 40, p. 556-564, 1999.

AVELINO, K. B.; VANTINI, R.; SENEDA, M. M. *In vitro* production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v. 57, p. 656, 2002.

AVERY, B.; GREVE, T. Apparent abnormalities of *in vitro* produced bovine embryos. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SIPZ, v. 30, 1995. **Proceedings...** p. 171-183.

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

BARROS, B. J. P.; VISINTIN, J. A. Controle ultra-sonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 74-79, 2001.

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

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

BAVISTER, B. D.; ROSE-HELLEKANT, T. A.; PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v. 37, p. 127-146, 1992.

BERTOLINI, M.; ANDERSON, G. B. The placenta as a contributor to production of large calves. **Theriogenology**, v.57, p.181-I87, 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.

BLONDIN, P. Status da produção de embriões no mundo. In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2015, Gramado. **Anais...** Gramado, 2015. p. 33-35.

BOYD, H.; BACSICH, P.; YOUNG, A. Fertilization and embryonic survival in dairy cattle. **British Veterinary Journal**, v. 125, p. 87-97, 1969.

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

CAMPBELL, M. K.; FARREL, S. O. Bioquímica. Bioquímica metabólica. 5ed. São Paulo: **Thomson Learning**, 2008. 845p.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN-LANGENDONCKT, 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.

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

CHO, S. R.; CHO, S. K.; LEE, S. L.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced *in vitro* in serum-free medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 19, p. 487-492, 2002.

CUELLO, C.; GOMIS, J.; ALMINANA, C.; MASIDE, C.; SANCHEZ-OSORIO, J.; GIL, M. A.; SÁNCHEZ, A.; PARRILLA, J.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of *in vitro*-produced pig embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 296-302, 2013.

DAVIS, M. E.; HARVEY, W. R.; BISHOP, M. D.; GEARHEART, W. W. Use of embryo transfer to induce twinning in beef cattle: embryos survival rate, gestation length, birth weight and weaning weight of calves. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 301-310, 1989.

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.

DUVNJAK, M.; LEROTI, I.; BARSIC, N.; TOMASIC, V.; VIROVIC JUKIC, L.; VELAGIC, V. Pathogenesis and management issues for nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 4539-4550, 2007.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein free media. **Theriogenology**, v. 43, p. 913-926, 1995.

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

EK, I.; ARNER, P.; BERGQVIST, A.; CARLSTRÖM, K.; WAHRENBERG, H. Impaired adipocyte lipolysis in nonobese women with the polycystic ovary syndrome: a possible link to insulin resistance? **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, p. 1147–1153, 1997.

ENRIGHT, B. P.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F. A.; YANG, X.; BOLAND, M. P. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, v. 54, p. 659-673, 2000.

FAHERTY, S.; FITZGERALD, A.; KEOHAN, M.; QUINLAN, L.R. Self-renewal and differentiation of mouse embryonic stem cells as measured by Oct4 expression: the role of the cAMP/PKA pathway. **In vitro Cellular & Developmental Biology. Animal**, v. 43, p. 37-47, 2007.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D. C.; HYTTEL, P.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 186-195, 2001.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 178–191, 2006.

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

FEUGANG, J. M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of "-Mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidants agents. **Theriogenology**, v. 63, p. 71-90, 2004.

FOOTE, R. H. Semen quality from the bull to the freezer: an assessment. **Theriogenology**, v. 3, p. 219-235, 1975.

FU, X. W.; WU, G. Q.; LI, J. J.; HOU, Y. P.; ZHOU, G. B.; SUO, L.; WANG, Y. P.; ZHU, S. E. Positive effects of forskolin (stimulator of lipolysis) treatment on cryosurvival of *in vitro* matured porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 75, p. 268–275, 2011.

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

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

GRANLUND, L.; PEDERSEN, J. I.; NEBB, H. I. Impaired lipid accumulation by *trans* 10, *cis* 12 during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1687, p. 11–22, 2005.

GREVE, T. *In vitro* embryotechnologies in cattle with particular reference to their use in cattle breeding schemes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 27, p. 22-28, 1992.

GREVE, T.; AVERY, B.; CALLESEN, H. Viability of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 28, p. 164-169, 1993.

GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 1117-1126, 2001.

HASLER, M. B.; HENDERSON, W. B.; HURGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCUALEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, p. 141-152, 1995.

HO, REN-JYE; SHI, QI-HUANG. Forskolin as a novel lipolytic agent. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 107, p. 157-164, 1982.

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

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

HOLM, P.; CALLESEN, H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reproduction, Nutrition Development**, v. 38, p. 579–594, 1998.

- HOMA, S. T.; BROWN, C. A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles *in cumulus-free bovine oocytes*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 153–160, 1992.
- HONNOR, R. C.; DHILLON, G. S.; LONDOSS, C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 15130-15138, 1985.
- HUBBERT, W. T. Factors affecting survival of the bovine fetus and neonate. **Theriogenology**, v. 1, p. 15-34, 1974.
- IMAI, K.; KOBAYASHI, S.; GOTO, Y.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Cryopreservation of bovine embryos obtained by *in vitro* culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. **Theriogenology**, v. 47, p. 347, 1997.
- IMAI, K.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; SHIMOHIRA, I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance *in vitro* produced bovine embryo. **Theriogenology**, v. 64, n. 10, p. 887-891, 2002.
- INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY (IETS). 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newslett**, v. 33, p. 14-26, 2014.
- KASTELIC, J. P. Embryonic development and embryonic loss in cattle. In: ANNUAL MEETING, 1996, Jeeksonville. **Proceedings ...** Jeeksonville: Society for Theriogenology, 1996. p. 117-127.
- 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.
- KING, W. A. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 32, p. 99-103, 1991.
- KING, W. A.; SUPPLIZI, A. V.; DIOP, H.; BOUSQUET D. Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated superovulated cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 27, p. 189-194, 1995.
- KOCHHAR, H. S.; KOCHHAR, K. P.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rates and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 33-49, 2003.
- KOCHHAR, H. S.; PEIPPO, J.; KING, W. A. Sex related embryo development. **Theriogenology**, v. 55, p. 3-14, 2001.
- KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C.; THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. **Traffic**, v. 9, p. 338-352, 2009.

LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 1057-1091, 1993.

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 in bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 904-910, 2011.

LEHNINGER. Princípios de Bioquímica. In: NELSON, D. L; COX, M.M. **Biosintese dos Lipídeos**. 3.ed. New York, 2002 cap. 21, p. 599-638.

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 81-94, 1993.

LEIBO, S. P.; MAZURP, P.; JACKOWSKI, S. C. Factors affecting the survival of frozen thawed mouse embryos. **Cryobiology**, v. 11, p. 509, 1973.

LEIVAS, F. G.; BRUM, D. S.; FIALHO, S. S.; SALIBA, W. P.; ALVIM, M. T. T.; BERNARDI, M. L.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Fetal calf sérum enhances *in vitro* production of *Bos Taurus indicus* embryos. **Theriogenology**, v. 75, p. 429-433, 2011.

LIM, J. M.; REGGIO, B. C.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. Development of *in vitro*-derived bovine embryos cultured in 5% de CO₂ in air or in 5% O₂, 5% de CO₂ and 90% N₂. **Human Reproduction**, v. 14, p. 458-464, 1999.

LINDNER, G. M.; WRITH, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, p. 407-416, 1983.

LONERGAN, P.; EVANS, A. C.; BOLAND, E.; RIZOS, D.; FAIR, T.; DUFFY, P.; SUNG, L. Y.; DU, F.; CHAUBAL, S.; XU, J.; YANG, X.; TIAN, X. C. Pregnancy and fetal characteristics after transfer of vitrified *in vivo* and cloned bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, p. 1128–1137, 2007.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos-dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, p. 17-22, 2008.

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

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

MARCHESAN, D.; RUTBERG, M.; ANDERSSON, L.; ASP, L.; LARSSON, T.; BOREN, J.; JOHANSSON, B. R.; OLOFSSON, S. O. Aphospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiarion-relates protein, and vimentin in a cell-free system. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 278, p. 27293-27300, 2003.

MAREI, W. F.; WATHES, D. C.; FOULAD-NASHTA, A. A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction Research**, v. 139, p. 979–988, 2010.

MARQUES, C. M.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PEREIRA, R. M. Effect of polyunsaturated fatty acid (PUFA) on bovine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryo development and freezability. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 109, p. 116, 2007.

MARTÍNEZ, A. G.; VALCÁCEL, A.; FURNUS, C. C.; DE MATOS, D. G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M. A. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 288-296, 2006.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNEYS, A. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 10, p. 3004-3011, 1995b.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; TOUZE, J. L.; DESSY, F. Survival and viability of fresh and frozen-thawed *in vitro* bovine embryos. **Reproduction Nutrition Development**, v. 35, p. 3- 10, 1995a.

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. 2008-2016, 2006.

MERYMAN, H. T. Freezing injury and its prevention in living cells. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 3, p. 341-363, 1974.

MINGOTI, G. Z.; CAIADO-CASTRO, V. S. D.; MÉO, S. C.; BARRETO, L. S. S.; GARCIA, J. M. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured *in vitro*. **Zigote**, v.17, p. 321-328, 2009.

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

MOORE, K.; RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C. J.; KRAMER, J. M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v. 68, p. 1316–1325, 2007.

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.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R. J.; GRUPEN, C. G.; NOTTLE, M. B. Criopreservação de embriões e óocitos de mamíferos: recente avanços. **Biotechnology Advances**, v. 14, p. 127-149, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

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

PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, E. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14, p. 127-149, 1996.

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

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

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

PASCHOAL, D. M. **Ação do forskolin em diferentes fases da produção *in vitro*: implicação na meiose oocitária e na vitrificação de embriões bovinos**. 2013. 171 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; GUASTALI, M. D.; MAZIERO, R. R. D.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; RASCADO, T. S.; MARTINS JR, A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zigote**, p. 1-12, 2012.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmental regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.

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

PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PORTA, P. V.; BESSA, R. J. B.; MARQUES, C. C. Post-thawing resistance of bovine embryos is improved by *trans*-10; *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). **Anais...15th International Congress on Animal Reproduction**, Porto Seguro, Bahia, Brasil, 2004.

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.

PERRY, G. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newslett**, v. 33, p. 14-26, 2015.

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.

PTAK, G.; DATTENA, M.; LOI, P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* production, vitrification and birth offspring. **Theriogenology**, v. 52, p. 1105-1114, 1999.

REICHENBACH, H. D.; LIEBRICH, J.; BERG, U.; BREM, G. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 363-370, 1992.

REINDERS, J. M. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, T. A. M. From embryo to calf after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 43, p. 306, 1995.

RIBADU, A. Y.; NAKAO, T. Bovine reproductive ultrasonography: a review. **Journal of Reproduction and Development**, v. 45, p. 13-28, 1999.

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

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, N. 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.

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

RODBELL, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature**, v. 284, p. 17-22, 1980.

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. P.; CERRI, R. L. A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v. 69, p. 88-97, 2008.

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

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

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

SEAMON, K. B.; PADGETT, W.; DALY, J. W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes in intact cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 78, p. 3363–3367, 1981.

SEAMON, K.; DALY, J. W. Activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 9799-9801, 1981.

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

SHAW, J. M.; KULESHOVA, L. L.; MACFARLANE, D. R.; TROUNSON, A. O. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing Ficoll, PVP, or dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219–229, 1997.

SHCHEPINA, L.A.; et al. Respiration and mitochondrial membrane potential are not required for apoptosis and anti-apoptotic action of BCL-2 in hela cells. **Biochemistry (Moscow)**, v.67, p.222-226, 2002.

SHEHAB-EL-DEEN, M. A.; LEROY, J. L. M. R.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Cryotolerance of bovine blastocysts is affected by oocyte maturation in media containing palmitic or stearic acid. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 44, p. 140–144, 2009.

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v. 38, p. 95-105, 1999.

STEIN, A. Decreasing variability in your cell culture. **Biotechniques**, v. 43, p. 228–229, 2007.

STRINGFELLOW, D. A. Recommendations for the sanitary handling of *in vivo* derived embryos. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. editors. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy, IL: International Embryo Transfer Society, p. 79–84, 1998.

STROUD, B. Fetal sexing by ultrasound. **Vet. Proc.**, v. 10, p. 653-659, 1996.

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

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; MAZIERO, R. R. D.; RASCADO, T. S.; GUASTALI, M. D.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; MONTEIRO, B. A.; MARTINS Jr., A.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Improving post cryopreservation curval capacity: an embryo approach. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 160-167, 2013.

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

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

TRAN, H. N.; BAE S. Y.; SONG, B. H.; LEE, B. H.; BAE, Y. S.; KIM, Y. H.; LANSKY, E. P.; NEWMAN, R. A. Pomegranate (*punica granatum*) seed linolenic acid isomers: concentration-dependent modulation of estrogen receptor activity. **Endocrine Research**, v. 35, p. 1-16, 2010.

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. 534-539, 1999.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T. *Open pulled straw* (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53–58, 1998.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236-244, 2006.

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T. T.; HOLM, P., GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 52, p. 939–948, 1999.

VAN SOOM, A.; KRUIF, A. A comparative study of *in vivo* and *in vitro* derived bovine embryos. **Proceedings... of 12th International Congress on Animal Reproduction**,

VANBLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_{mm}$), cytoplasmic ATP content and free Ca^{2+} levels in metaphase II mouse oocyte. **Human Reproduction**, v.8, p.2429-2440, 2003.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. L.; LACERDA, J. A.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Pregnancy rate, pregnancy loss and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 140, 1997.

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.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.;AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 190-201, 2007.

WHITTINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, p. 125-126, 1971.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees. **C Science**, v. 27, p. 411-414, 1972.

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

WRIGHT, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle, embryo recipient interactions. **Theriogenology**, v. 15, p. 43-56, 1981.

YANG, M.Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and BAX proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reprod. Scien.**, v.70, p.159-169, 2002.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 155–163, 1998.

ZERON, Y. A.; OCHERETNY, O.; KEDAR, A.; BOROCHOV, D.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v. 121, p. 447-454, 2001.

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 271–278, 2002.