

**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
crioresistência 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:

Prof. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMV / UNESP Araçatuba

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. FELIPE PERECIN

FZEA / USP - Pirassununga, SP

Prof. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. 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.

EPIGRAFE

“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 memoriam* 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 entenderem minha ausência frequente.

Às minhas queridas companheiras de trabalho no laboratório: **Priscila Chediek Dall' Acqua** e **Marcela Ambrogli** por toda imprescindível ajuda, conselhos, ensinamentos e carinho. Também, à **Nathalia Rocha Frigoni** 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. Erikliis 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, **Luísa 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 endoplasmático

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

TI – 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 Vitricado).....	45

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura química e representação de um fosfolípido.....	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 lmea4 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 chi-square (P<0.05). No differences were observed between treatments (P>0.05) in blastocysts production rates (47.2±3.9% to 51.6±5.5%). 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±6,53%) and Forsk (30,77±7,39%) 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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Suplementos proteicos e macromoléculas adicionados ao meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos e seus efeitos sobre o acúmulo lipídico intracitoplasmático

O soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) são as fontes proteicas mais utilizadas no cultivo *in vitro* (MINGOTI et al., 1995). Quase todos os meios desenvolvidos para suportar o crescimento do embrião de bovinos produzido *in vitro* contem soro e/ou BSA como proteína complementar e fonte de fatores de crescimento (MUCCI et al., 2006). Vários autores relatam os efeitos benéficos destas substâncias (CAROLAN et al., 1995) pois, quando adicionado ao meio, o SFB melhora significativamente as taxas de desenvolvimento embrionário (PEREIRA et al., 2008; LEIVAS et al., 2011; SUDANO et al., 2011).

Em contrapartida, embriões cultivados na presença de soro apresentaram maior acúmulo de lipídios citoplasmáticos, os quais são responsáveis por maior sensibilidade desses embriões ao processo de criopreservação (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2003). O SFB pode interferir no metabolismo lipídico dos embriões de três formas: aumentando a neossíntese de lipídios (especialmente os triacilglicerídios) em embriões (ABD EL RAZEK et al., 2000); aumentando o conteúdo lipídico por internalização das lipoproteínas presentes no soro (FERGUSON; LEESE, 1999; SATA et al., 1999); ou alterando o metabolismo lipídico na mitocôndria, principalmente aumentando os estoques de lipídios intracelulares (ABE; HOSHI, 2003).

A síntese ou o acúmulo excessivo de lipídios nos embriões, induzidos pela presença de SFB, dão aos embriões uma aparência escura quando comparados com embriões produzidos sem SFB ou com embriões obtidos *in vivo* (ABE et al., 1999b, 2002; ABE; HOSHI, 2003; PEREIRA et al., 2007; RIZOS et al., 2008). Blastocistos produzidos sem a adição de SFB apresentam redução no acúmulo de gotas lipídicas e melhoria na resistência à criopreservação (ABE et al., 2002; DIEZ et al., 2001), no entanto, as taxas de desenvolvimento de blastocistos em meio suplementado com soro é superior e tem sido observada por diversos autores

(PINYOPMMINTR; BAVISTER, 1991; ECKERT; NIEMANN, 1995; CHO et al., 2002; PEREIRA et al., 2007).

2.2 Metabolismo lipídico celular

Nas células, os lipídios servem como fonte de energia e são componentes críticos para sua estrutura física e funcional. O conteúdo e a composição de lipídios em oócitos e embriões podem influenciar sua competência e seu impacto pode ser crítico, particularmente durante a criopreservação (SANTOS et al., 2008). Todavia, sabe-se que os ácidos graxos são utilizados como fonte de energia durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (FERGUSON et al., 2006), até o estágio de 8 a 16 células, que em bovinos corresponde à ativação do genoma do próprio embrião e início da síntese de novo de transcritos (LIM et al., 1999).

Os lipídios são compostos caracterizados por sua insolubilidade em água, sendo os mais importantes os triacilgliceróis (TAG) e os fosfolipídios (FL). Os fosfolipídios são compostos por uma cadeia de 3 carbonos, no qual um grupo de cabeça-fosfato é aderido a um carbono posicionado no final do esqueleto carbônico e dois ácidos graxos são conectados aos 2 outros carbonos (Figura 1). Tanto os ácidos graxos, como seus grupos cabeça-fosfato, podem variar em sua composição e essa variação é que determinará as propriedades das membranas celulares (EDIDIN, 2003).

Os TAG são a principal forma de estocagem de energia em diversos organismos, já os FL são o principal componente da estrutura da bicamada lipídica das membranas biológicas (Figura 2). Gotículas lipídicas podem ser encontradas em quase todos os organismos como parte integrante do armazenamento de energia nas células e contém principalmente triacilgliceróis e ésteres de colesterol (PEREIRA et al., 2007).

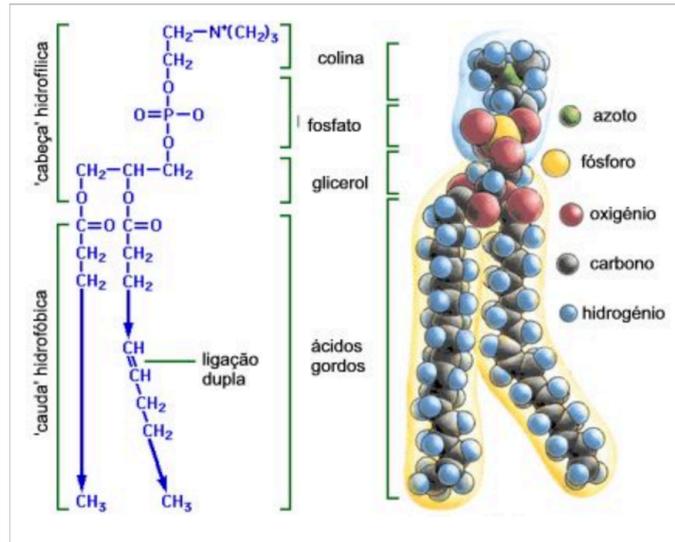


Figura 1: Estrutura química e representação de um fosfolípido (fonte: domínio público).

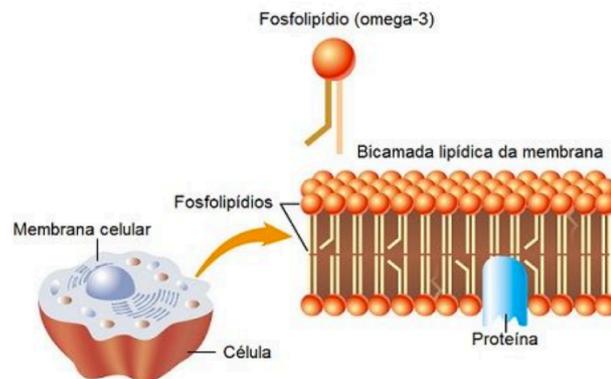


Figura 2: Esquema da bicamada lipídica que constitui as membranas celulares (fonte: domínio público).

A maior parte dos lipídios intracelulares em oócitos e embriões bovinos são os TAG (Mc EVOY et al., 2001; CHARPIGNY et al., 2003), correspondendo a 50% da massa lipídica total em embriões produzidos *in vivo* (CHARPIGNY et al., 2003). No entanto, essa proporção pode alcançar até 88% da massa de lipídios em embriões produzidos *in vitro* (PEREIRA et al., 2008). Isso porque a concentração permanece estável nos embriões *in vivo* do estágio de 2 células até o estágio de blastocisto, enquanto que a reserva de TAGs em embriões produzidos *in vitro* pode duplicar no

estágio de blastocisto, especialmente em embriões expostos à cultura com soro fetal bovino a partir de 4 células (CHARPIGNY et al., 2003).

Os TAGs são os componentes majoritários do núcleo da gota lipídica citoplasmática nas células. São formados na membrana microsomal do retículo endoplasmático (RE) de qualquer célula (MARCHESAN et al., 2003) e são compostos por um glicerol que tem esterificados seus três grupos hidroxilas por três ácidos graxos, saturados ou insaturados. Existem dois precursores do glicerol 3-fosfato, os acil-CoA graxos, formados a partir de ácidos graxos, e a diidroxiacetona fosfato, que aparece durante a glicólise (LEHNINGER, 2002). A biossíntese dos triacilgliceróis é composta por três grandes reações: primeiro ocorre a acilação dos dois grupos hidroxila livres do 1-glicerol 3-fosfatase por dois acil-Coa que darão origem ao diacilglicerol 3-fosfatase, também denominado ácido fosfatídico, que em continuação será hidrolisado e convertido em 1,2-diacilglicerol e, por último, sofrerá uma transesterificação com um terceiro ácido graxo, convertendo o ácido fosfatídico, ao fim, em triacilglicerol (LEHNINGER, 2002). A enzima responsável por essa última reação e, portanto, a mais importante na formação desses lipídios, é a diacilglicerol aciltransferase 2 (DGAT2) ,localizada no RE e nas gotas lipídicas, enzima que também está relacionada com a entrada de triacilgliceróis nas gotas já formadas (KUERSCHNER et al., 2009).

Outra categoria de lipídios que tem recebido crescente atenção no metabolismo de oócitos e embriões são os ácidos graxos poliinsaturados (Figura 3), os quais recebem essa denominação por apresentarem mais de uma saturação ou dupla ligação em sua molécula. De acordo com a posição da dupla ligação entre carbonos, podem ainda ser classificados como Ômega 6, Ômega 3 e Ômega 9 (WATHES et al., 2007).

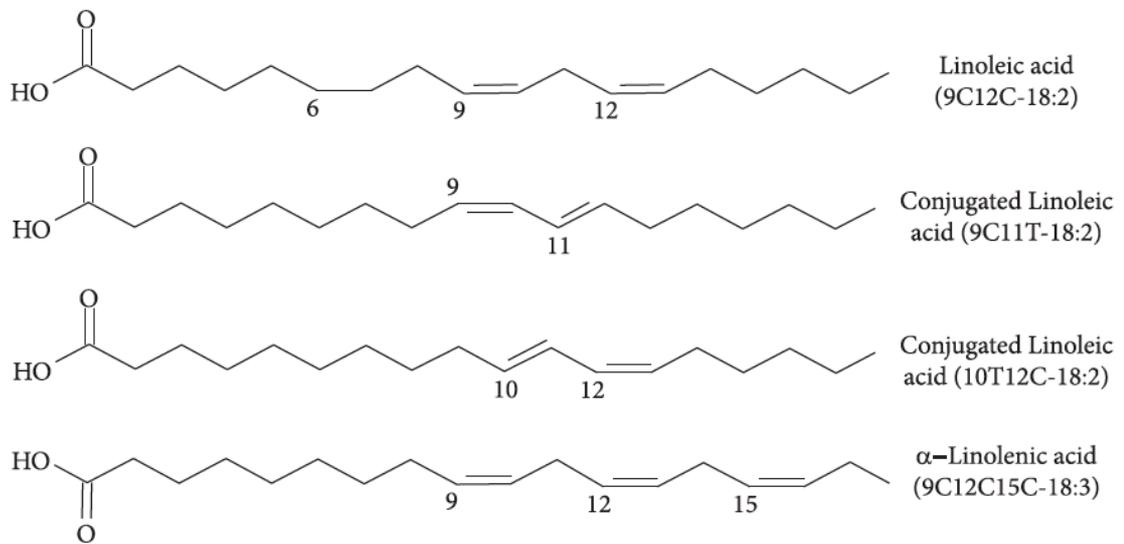


Figura 3: Estrutura química do LA, CLA *cis* 9 *trans* 11, CLA *trans* 10 e *cis* 12 e ALA (fonte: TRAN et al., 2010).

Os lipídios são essenciais para qualquer célula, pois estes fornecem a energia necessária para o metabolismo celular. Porém, durante a β -oxidação dos lipídios, são produzidas espécies reativas de oxigênio (ROS), que numa alta concentração podem lesionar as mitocôndrias, comprometendo seu funcionamento (DUVNJAK et al., 2007).

Adicionalmente, a alta quantidade de lipídios é um fator limitante para o sucesso da técnica de criopreservação. Apesar disso, a presença de lipídios é essencial, já que os mesmos são responsáveis pelo fornecimento energético dentro de qualquer célula. Assim, o balanço entre síntese/acúmulo e utilização de lipídios deve ser melhor compreendida para que sejam produzidos embriões com melhor qualidade e maior criotolerância.

2.3 Métodos de delipidação de embriões

2.3.1 Delipidação mecânica

Para melhorar os índices de criotolerância embrionária, uma estratégia interessante consiste na redução do conteúdo lipídico em embriões. A delipidação

mecânica tem sido aplicada nos estágios iniciais do desenvolvimento de embriões suínos e de embriões clone bovinos (USHIJIMA et al., 1999; DIEZ et al., 2001) por meio da polarização das gotas lipídicas por centrifugação e remoção física do excesso de lipídios. Entretanto, é um método invasivo e este mecanismo altera o desenvolvimento potencial de blastocistos transferidos para receptoras (DIEZ et al., 2001). Além disso, a delipidação mecânica aumenta substancialmente a chance de transmissão de patógenos por causa da zona pelúcida danificada após micromanipulação (STRINGFELLOW, 1998). Este método é também extremamente trabalhoso e demorado.

2.3.2 Delipidação química

2.3.2.1 Forskolin

Pode-se induzir a lipólise com auxílio de agentes lipolíticos, tais como norepinefrina, dibutilil cAMP, isoproterenol, forskolin e teofilina (SEAMON et al., 1981; HOLM, 2003). O forskolin já foi utilizado para induzir aumento na lipólise de oócitos maduros de suínos (FU et al., 2011) e de embriões de suínos (MEN et al., 2006). Esta droga (7 β -acetoxi-8, 13-exoxi-1 α , 6 β , 9 α -triidroxi-Labd-14-en-11-one, C22H34O7) é derivada da família dos dipertenos (SEAMON et al., 1981; SEAMON; DALY 1981; BILODEAU-GOESEELS, 2006) e é um agente ativador da adenilato ciclase. Atua em células intactas e está relacionado aos níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), importante para as funções fisiológicas de vários sistemas (SEAMON et al., 1981; HO; SHI, 1982; EK et al., 1997; ARRESE et al., 1999).

Em termos bioquímicos, a ligação da proteína G (molécula de sinalização) ao seu receptor causa a hidrólise na proteína G, liberando a subunidade α que, por sua vez, irá estimular a adenilato ciclase a ativar também a enzima adenilciclase (proteína integral da membrana plasmática) que catalisa ATP para produzir cAMP. O cAMP consiste no sistema mais importante de regulação da lipólise (LAFONTAN; BERLAN, 1993), pois estimula a proteína quinase (PKA) a catalisar a fosforilação de enzimas-alvo ou de fatores de transcrição. No caso dos lipídios, a PKA fosforila a

triacilglicerol lipase, que causa lise dos triglicerídeos, liberando ácidos graxos e formando glicerol (NELSON; COX, 2002; FAHERTY et al., 2007; CAMPBELL; FARREL, 2008). Sendo assim, a atividade lipolítica intracelular é normalmente mensurada pela dosagem do glicerol liberado durante a hidrólise dos triglicerídeos (MEN et al., 2006).

Em células lipídicas, existe uma relação entre o aumento dos níveis de cAMP e a lipólise dos triglicerídeos (HONNOR et al., 1985), sendo que as catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) são os reguladores mais sofisticados sobre essas células a partir de seus cinco receptores de membrana (β_1 , β_2 , β_3 , α_1 e α_2). No momento em que as catecolaminas se ligam aos seus receptores, o receptor controlador da concentração de cAMP aumenta, elevando os níveis de cAMP intracelular (a partir do ATP) promovendo a ativação da PKA, a qual fosforila os resíduos de serina na lipase hormônio sensível (HSL). Após a HSL ser transferida para a gota lipídica, esta estimulará a lipólise dos triglicerídeos (HONNOR et al, 1985; LAFONTAN; BERLAN, 1993).

A enzima adenilato ciclase é composta por três proteínas básicas: uma subunidade catalítica (enzimática), que converte o substrato ATP em cAMP; um nucleotídeo guanina, ligado a uma proteína que medeia a ativação hormonal; e um receptor hormonal (RODBELL, 1980; LAFONTAN; BERLAN, 1993). A regulação fisiológica dessa enzima e dos níveis intracelulares de cAMP, ocorre primeiramente pela interação iniciada por hormônios ligados ao receptor, a qual é mediada por uma guanina (SEAMON; DALY, 1981). O forskolin, sendo um ativador da adenilato ciclase, atua rapidamente e reversivelmente direto na subunidade catalítica da adenilato ciclase, sem a necessidade da presença da guanina (SEAMON et al., 1981; SEAMON; DALY, 1981).

O mecanismo de ação do forskolin está representado na Figura 4.

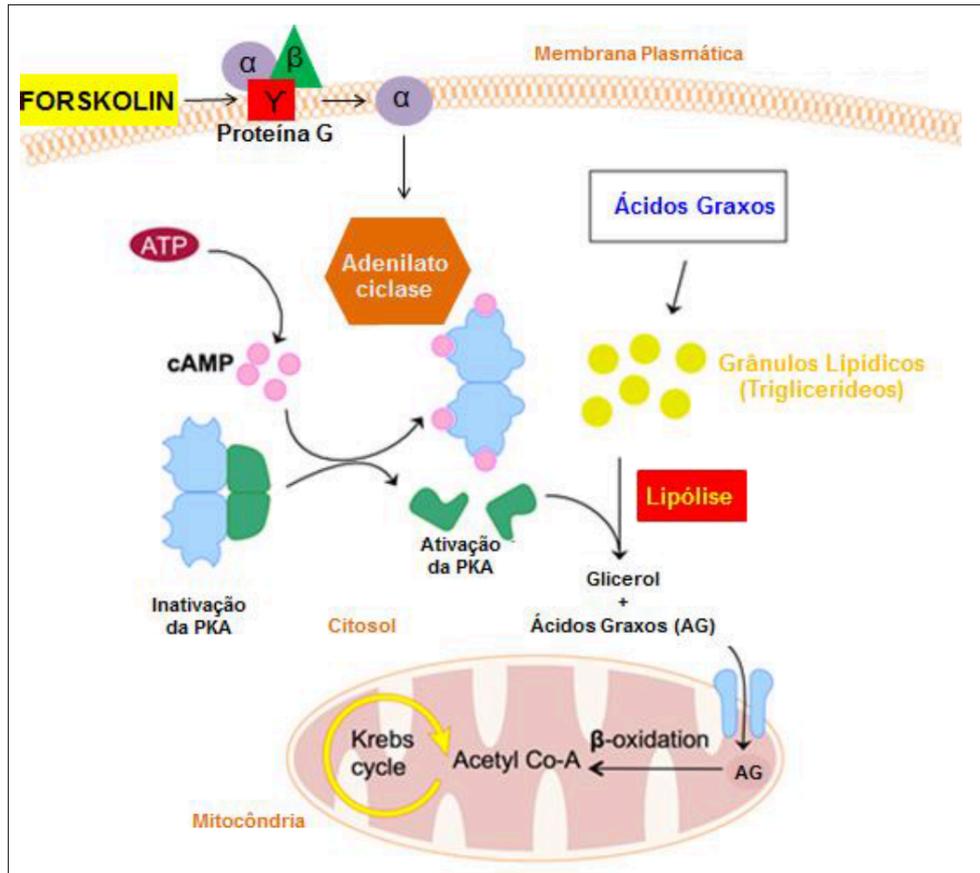


Figura 4: Esquema representativo da ação do forskolin como agente lipolítico no embrião: ativação da adenilato ciclase, do monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) e liberação do glicerol (fonte: SUDANO et al., 2013 adaptado por PASCOAL, 2013).

Os dados relativos ao efeito do forskolin em embriões de PIVE em *Bos indicus* e os efeitos nas taxas de prenhez de embriões bovinos PIVE e criopreservados são escassos. A adição de forskolin ao meio de cultivo de embriões bovinos PIVE de *Bos indicus* antes da vitrificação pode melhorar as taxas de sobrevivência, proporcionando taxas de prenhez satisfatórias após a transferência desses embriões (SANCHES et al., 2013).

2.3.2.2 Ácido linoleico

Há grande evidência de que a quantidade de lipídios em oócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser modificados por mudanças na

composição dos meios de cultivo, particularmente pela adição de SFB (STURMEY et al., 2009). Sabe-se que durante a maturação *in vitro* (MIV) ocorre a absorção de lipídios provenientes do SFB, por parte de oócitos bovinos (KIM et al., 2001). Todavia, independente do mecanismo pelo qual isso ocorre, o acúmulo excessivo de lipídios intracelulares durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* prejudica a qualidade dos embriões PIVE, devido ao aumento de sua sensibilidade ao estresse oxidativo e à criopreservação (PEREIRA et al., 2008; AL DARWICH et al., 2011).

O ácido linoleico (LA) é um ácido graxo poliinsaturado (PUFA) da família ômega-6 e é denominado essencial por não ser sintetizado pelos organismos (SCHMITZ; ECKER, 2008). Sabe-se que o LA é o ácido graxo mais abundante no fluido folicular e sua concentração diminui significativamente de acordo com o aumento do tamanho do folículo (HOMA; BROWN, 1992). Isso sugere que o LA tem um papel importante na regulação da maturação oocitária e que concentrações mais elevadas desse PUFA são necessárias no início desta etapa para que o oócito permaneça no estágio de vesícula germinativa até a retomada da meiose (MAREI et al., 2010).

A maioria dos estudos relatou resultados favoráveis após a utilização de PUFAs sobre a congelabilidade embrionária, devido ao aumento da fluidez da membrana (nível de insaturação), o que pode ser devido tanto à incorporação na membrana do embrião ou na redução do teor de triacilglicerol (HOCHI et al., 1999; TOMINAGA et al., 2000; ZERON et al., 2001; 2002; PEREIRA et al., 2008).

A forma conjugada do LA (CLA), especialmente o isômero *trans*-10, *cis*-12, regula negativamente a expressão de RNAm de algumas proteínas relacionadas com o metabolismo dos lipídios, o que afeta os níveis de ácidos graxos saturados e insaturados, podendo contribuir para alterações na fluidez da membrana e criotolerância (AL DARWICH et al., 2011).

Shehab-El-Deen et al. (2009) observaram que a adição de ácidos graxos não esterificados na etapa de MIV, como o ácido palmítico e esteárico, pode prejudicar a criopreservação dos blastocistos produzidos. Por outro lado, trabalhos mais recentes relataram os possíveis efeitos benéficos que outros ácidos graxos podem proporcionar na MIV, como o ácido linolênico, que ajuda na progressão meiótica ao aumentar a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (MAREI et

al., 2010). Os ácidos araquidônico (C:20:4), eicosapentaenoico (C:20:5) (MARQUES et al., 2007) e o CLA (LAPA et al., 2011), quando adicionados ao meio de maturação, também promovem efeitos benéficos sobre a qualidade embrionária e criopreservação.

O CLA exerce efeitos específicos sobre os adipócitos, por meio da inibição da expressão de vários genes que codificam enzimas de síntese de lipídios (PETERSON et al., 2003; GRANLUND et al., 2005), bem como a atividade da lipoproteína lipase (PARK et al., 1999). Conseqüentemente, o CLA inibe a síntese e absorção de ácidos graxos, resultando em perda de triacilgliceróis dos embriões bovinos cultivados em meio contendo SFB (FERGUSON; LEESE, 1999; CHARPIGNY et al., 2003). Pereira et al (2008) observaram redução do conteúdo dos triacilgliceróis em embriões PIVE, induzida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12, e isso contribuiu para aumento da resistência do embrião à criopreservação, pois segundo os autores, o CLA tem a função de bloquear a entrada de ácidos graxos nos adipócitos, podendo interferir, deste modo, na deposição de ácidos graxos nos embriões. Em 2007, o mesmo grupo verificou que, em meios suplementados com CLA, houve melhora na razão de sobrevivência dos blastocistos depois do congelamento lento e descongelamento (PEREIRA et al., 2008). Outros pesquisadores também demonstraram que a adição do ácido linoleico melhora a sobrevivência pós-descongelamento (IMAI et al., 1997; HOCHI et al., 1999; TOMINAGA et al., 2000; PEREIRA et al., 2007; AL DARWICH et al., 2011) e este efeito pode ser resultado do aumento na conversão de ácidos graxos insaturados na membrana antes do congelamento. Isto pode ocasionar aumento da fluidez da membrana, que pode vir a melhorar a resistência do embrião ao congelamento (HOCHI et al., 1999; TOMINAGA et al., 2000, ACCORSI et al., 2015).

2.4 Criopreservação de embriões produzidos *in vitro*

O processo de criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. O primeiro sucesso desta técnica foi mencionado por Whittingham

(1971), utilizando embriões de camundongos. Desde então, muitas pesquisas têm sido realizadas voltadas à criopreservação de embriões bovinos PIVE, já que os mesmos são mais sensíveis à criopreservação e resultam em taxas de gestação significativamente menores, quando comparados a embriões criopreservados produzidos *in vivo* (HASLER, 1995; FAIR et al., 2001; DOBRISNKY, 2002; MARTÍNEZ et al., 2006).

A maior parte dos métodos de criopreservação é baseada em dois fatores, a utilização de crioprotetores e velocidade de arrefecimento (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

A função do crioprotetor é proteger as células e tecidos durante a congelação e o aquecimento. Sabe-se que uma das principais funções dos crioprotetores é reduzir o ponto de solidificação das soluções durante a congelação, aumentando assim a taxa de sobrevivência das células (LEIBO et al., 1973). Para que uma substância tenha uma boa ação crioprotetora, ela deve atuar elevando a osmolaridade intracelular, controlando a desidratação e, ainda, interagindo com a membrana celular, estabilizando-a (MERYMAN, 1974).

As soluções de criopreservação contêm um ou mais tipos de crioprotetor, vários sais e uma ou mais macromoléculas. De acordo com suas propriedades de difusão através das membranas biológicas, os crioprotetores podem ser divididos em duas categorias: intracelulares, que são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante a criopreservação [glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, etanol, etileno glicol (EG), 1,2 propanodiol, etc]; e extracelulares, que são as macromoléculas e açúcares cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular durante o aquecimento [glicose, lactose, sacarose, polivinilpirrolidona (PVP), etc] (NIEMANN, 1991).

Até o momento, diversas técnicas para a criopreservação de embriões provenientes da PIVE foram desenvolvidas ou vem sendo aperfeiçoadas, a fim de buscar seu melhor aproveitamento e facilitar a comercialização de embriões difusores de genética privilegiada ou mesmo de grande expressão econômica ou científica. Porém, sabe-se que há muito a ser melhorado, visto que a taxa de prenhez pós-descongelação varia em torno de 10% (ACCORSI et al., 2008).

Vários estudos têm demonstrado que os embriões de PIVE são menos resistentes aos procedimentos de criopreservação (HOLM; CALLESEN, 1998), o que está ligado com as características morfológicas e fisiológicas destes embriões (ABE et al, 1999a; b; ENRIGHT et al., 2000). Muitas das diferenças de qualidade podem estar relacionadas com as condições de cultivo, especialmente pela presença de soro, considerado como responsável pelo aumento no acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos nos embriões de PIVE (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2003; MOORE et al., 2007). Embora o mecanismo para o acúmulo de lipídios induzido pelo soro em embriões não seja totalmente compreendido (ABE et al., 2002), o acúmulo de lipídios intracelular pode ser parcialmente responsável pela grande sensibilidade ao congelamento (LEIBO et al., 1993; SEIDEL, 2006). Porém, apesar da alta quantidade de lipídios ser um fator limitante para a criopreservação, existe a necessidade da presença dessas estruturas pelo fato das mesmas serem responsáveis pelo fornecimento energético dentro de qualquer célula. Esse aporte energético é imprescindível para o adequado desenvolvimento embrionário e será dependente dos lipídios oocitários durante as primeiras clivagens (STURMEY et al., 2009). Ainda, além do conteúdo lipídico afetar a sensibilidade e a sobrevivência dos embriões criopreservados (ABE et al., 2002; STURMEY et al., 2009), há outros fatores que devem ser levados em conta, como: a origem do embrião (*in vivo* ou *in vitro*), a razão congelamento e aquecimento, tamanho e estágio de desenvolvimento do embrião, propriedades osmóticas e toxicidade dos crioprotetores (PALASZ et al., 1996).

Para melhorar a criotolerância, o congelamento de embriões foi substituído por técnicas de arrefecimento mais rápidas, tal como a vitrificação (SOMMERFELD; NIEMANN, 1999). Durante a vitrificação, uma maior concentração de crioprotetores é utilizada, induzindo a solidificação da solução sem a formação de cristais de gelo, resultando em altas taxas de sucesso para oócitos e embriões de diferentes espécies (SHAW et al, 1997; PTAK et al., 1999; CAMPOS-CHILLÓN et al., 2006). Segundo Saragusty e Arav (2011), quanto maior a concentração de crioprotetores, maior será a temperatura de transição para o estado vítreo, diminuindo assim a chance de cristalização da água e a formação do gelo. Ainda, pequenos volumes de crioprotetor permitem melhor transferência de calor, aumentando a taxa de

resfriamento. A desvantagem da aplicação da técnica de vitrificação é o aumento do risco de injúrias osmóticas causada pelas altas concentrações de crioprotetores.

A vitrificação é o método mais eficiente para a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (VAJTA et al., 1998), os quais são mais sensíveis à crioinjúrias do que os seus homólogos *in vivo* (POLLARD; LEIBO, 1994), porque eles contêm maior número de gotículas lipídicas intracelulares (ABE et al., 2002), sendo que os triacilgliceróis perfazem a maior parte dos lípidos intracelulares dos embriões (DIEZ et al., 2001). Além disso, a sensibilidade dos embriões PIVE *Bos indicus* é maior do que a dos embriões *Bos taurus* (VISINTIN et al., 2002). A extensão da criolesão é dependente do tamanho e forma das células embrionárias, bem como da permeabilidade da membrana e da sensibilidade e da qualidade dos embriões (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

A sensibilidade à criopreservação é um fator inerente a blastocistos produzidos *in vitro* (IMAI et al., 2002; RIZOS et al., 2001). A melhora na sobrevivência após a criopreservação pode ser atingida ao se alterar as condições de cultivo *in vitro* e/ou ao modificar os métodos tradicionais de criopreservação utilizados (GÓMEZ et al., 2008; MASSIP et al., 1995a).

O acúmulo de lipídios intracelular pode ser parcialmente responsável pela grande sensibilidade ao congelamento (LEIBO et al., 1993; SEIDEL, 2006). Embora a alta quantidade de lipídios seja um fator limitante para a criopreservação, existe a necessidade da presença dessas estruturas pelo fato das mesmas serem responsáveis pelo fornecimento energético dentro de qualquer célula. Esse aporte energético é imprescindível para o adequado desenvolvimento embrionário e será dependente dos lipídios oocitários durante as primeiras clivagens (STURMEY et al., 2009).

Para aumentar a sobrevivência de embriões PIVE após a criopreservação, é necessário aperfeiçoar a técnica de PIVE, bem como melhorar as técnicas de criopreservação. Neste sentido, a vitrificação vem sendo utilizada para tentar produzir maiores taxas de sobrevivência embrionária após a criopreservação (SOMMERFELD; NIEMANN, 1999).

3. HIPÓTESE

A suplementação do meio de cultivo *in vitro* com forskolin e ácido linoleico, seja isoladamente ou em associação, estimula a diminuição da quantidade de lipídios intracitoplasmáticos nos embriões produzidos, os quais se tornam mais resistentes ao processo de criopreservação e, conseqüentemente, geram maiores taxas de prenhez após transferência para receptoras.

4. OBJETIVOS

O presente estudo foi conduzido com o intuito de avaliar os efeitos da suplementação do meio de cultivo *in vitro* com forskolin e/ou ácido linoleico sobre o acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos e crioresistência de embriões bovinos, com a finalidade de otimizar a criopreservação para fins comerciais.

4.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar os efeitos da suplementação do meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos com diferentes concentrações de forskolin sobre as taxas de desenvolvimento embrionário e a quantidade de lipídios intracitoplasmáticos (Experimento 1).
- ✓ Avaliar os efeitos da suplementação do meio de maturação *in vitro* com ácido linoleico sobre a progressão meiótica (Experimento 2A).
- ✓ Avaliar os efeitos da suplementação do meio com ácido linoleico durante diferentes etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos (maturação *in vitro*, cultivo *in vitro* ou em ambos) sobre as taxas de desenvolvimento embrionário e a quantidade de lipídios intracitoplasmáticos (Experimento 2B).

- ✓ Avaliar os efeitos da suplementação do meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos com forskolin e ácido linoleico, isoladamente ou associados, sobre o desenvolvimento embrionário, quantidade de lipídios intracitoplasmáticos, diâmetro embrionário, número de células, potencial de membrana mitocondrial, ocorrência de apoptose e sobrevivência após vitrificação e aquecimento dos embriões (Experimento 3).

- ✓ Avaliar os efeitos do tratamento com forskolin durante o cultivo *in vitro* de embriões zebuínos (*Bos taurus indicus*) sobre o desenvolvimento embrionário, crioresistência à vitrificação, sobrevivência após vitrificação e aquecimento, taxa de prenhez após transferência de embriões frescos ou vitrificados-aquecidos para receptoras bovinas sincronizadas, taxa de nascimentos (MEP, abortos e natimortos) e o peso dos bezerros ao nascimento (Experimento 4).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Condições experimentais

Os experimentos em laboratório foram realizados no Departamento de Produção e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Araçatuba-SP. Os experimentos de campo foram realizados na Fazenda União de Suzanápolis-SP e Cassilândia-MS, entre os meses de agosto de 2014 a maio de 2016. Todas as manipulações envolvendo os animais foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP (Protocolo nº 015587/14).

5.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nos experimentos foram adquiridos da empresa Sigma (Chemical Co. St Louis, MO, USA). Caso contrário, encontram-se especificados no texto. Todos os reagentes são testados para cultivo celular ou embrionário. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA).

O meio de lavagem e seleção de oócitos foi constituído por TCM-199 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de amicacina. O meio de MIV utilizado foi o TCM-199 (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Invitrogen Co.), 0,2 mM de piruvato, 25 mM de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bionique Animal Health, Ontario, Canadá) e 100 UI/mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier).

O meio de fertilização utilizado foi o *Tyrode's albumin lactate pyruvate* (TALP), previamente descrito (PARRISH et al., 1988), contendo 0,2 mM de piruvato, 13 mM de lactato de sódio, 50 µg/mL de amicacina e 40 µL/mL de solução de PHE (20 µM

de penicilamina, 10 μ M hipotaurina, e 2 μ M epinefrina), 10 μ g/mL heparina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos.

O meio de cultivo embrionário utilizado foi o *Synthetic Oviduct Fluid* (SOF) modificado, previamente descrito (VAJTA et al., 1999) e suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BME aminoácidos essenciais, 1% MEM aminoácidos não essenciais, 50 μ g/mL de amicacina, 5 mg/mL de BSA e 2,5% (v/v) de SFB.

O meio de envase embrionário utilizado foi o H-SOF, que consiste do meio SOF modificado suplementado com 20 mM de HEPES, 4 mg/mL de BSA e 5% (v/v) de SFB.

5.3 Obtenção e seleção de oócitos provenientes de ovários de abatedouro

Ovários de vacas abatidas em frigoríficos foram transportados em até 3 horas em solução salina até o laboratório a uma temperatura entre 30-35°C. As punções foliculares foram realizadas com seringa de 10 mL acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL, deixado em decantação por 15 minutos para posterior seleção dos oócitos. Somente complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) com *cumulus* compacto e citoplasma homogêneo (Grau I e II) foram selecionados para os experimentos.

5.4 Maturação *in vitro*

Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem. Posteriormente, foram lavados uma vez em meio de maturação, antes de serem transferidos para o cultivo de maturação. Os CCOs foram maturados em microgotas de 90 μ L de meio de maturação (no máximo, 25 estruturas), cobertas por óleo mineral, em placas de poliestireno no experimento com forskolin ou em poços contendo 500 μ L de meio de maturação (no máximo, 50 estruturas), sem óleo mineral, em placas de cultivo celular de 4 poços nos experimentos com LA. O cultivo de MIV foi realizado durante 22 horas em incubadora a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

5.5 Avaliação da maturação nuclear

Após a maturação, os oócitos foram desnudados por sucessivas pipetagens em solução de hialuronidase 0,2% em PBS, acrescido de 1% PVP. Posteriormente, foram fixados em paraformaldeído 4% por 10 minutos e foram permeabilizados em solução de Triton X-100 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 5 minutos. Em seguida, foram corados com 1 µg/mL de Hoechst 33342 por 15 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram observados em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; excitação 404 nm e emissão 526 nm) para determinação do estágio da meiose. Os oócitos foram classificados em imaturos (configuração nuclear em vesícula germinativa - VG), maduros (metáfase II - MII) e em estádios intermediários (Int) da meiose (incluindo as fases de: quebra da vesícula germinativa - GVBD, metáfase I - MI, anáfase I – AI ou telófase I - TI).

5.6 Fertilização *in vitro*

Nos experimentos 1, 2 e 3 foi utilizado sêmen de um único touro da raça Nelore; no experimento 4 foi utilizado sêmen de um touro diferente, mas também da raça Nelore. O sêmen de ambos os touros utilizados eram pertencentes a uma única partida, de fertilidade previamente comprovada. Em cada réplica dos experimentos, a palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 36°C por 40 segundos e o sedimento foi obtido por centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) em duas fases (250 µL de Percoll 45% sobre 250 µL de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL), durante 7 minutos a 2500xg, em temperatura ambiente. O sedimento recuperado foi ressuspenso em meio de fecundação e avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos/mL de meio TALP-FIV.

Após o cultivo de maturação, os CCOs foram lavados duas vezes em meio de maturação e uma vez em meio TALP-FIV, sendo adicionados 25 CCOs por gota de FIV. Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada gota de

100 μ L de meio TALP-FIV. A fertilização foi realizada a 38,5°C, por até 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade.

5.7 Cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro*

Após a fertilização os prováveis zigotos foram lavados e transferidos para o meio de CIV. O cultivo foi realizado em microgotas de 90 μ L de meio CIV (no máximo, 25 estruturas), cobertas por óleo mineral, em placas de poliestireno, nos experimentos com Forskolin ou em poços contendo 500 μ L de meio CIV (no máximo, 50 estruturas), sem óleo mineral, em placas de cultivo celular de 4 poços, nos experimentos com LA. O cultivo foi conduzido em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e temperatura de 38,5°C por até sete dias. Após 72 horas de cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 72 hpi e o desenvolvimento embrionário foi avaliado às 168 hpi (D7). O dia da fecundação foi estabelecido como dia zero (D0).

5.8 Quantificação de lipídios intracitoplasmáticos e mensuração do diâmetro embrionário

Para avaliação do acúmulo lipídico intracitoplasmático, blastocistos expandidos em D7 foram fixados em solução de paraformaldeído 4% por 2 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, os mesmos foram lavados em PBS-PVP e imersos em solução de etanol 50% em água destilada, durante 2 minutos. Em seguida foram corados com Sudan Black B 1% diluído em etanol 70%, por 2 minutos. Posteriormente, foram imersos 3 vezes, por 5 minutos cada, em solução de etanol 50% e, em sequência, em água destilada acrescida de 1% de PVP. Então, os blastocistos foram colocados em lâminas com glicerol para serem analisados no microscópio de luz (IX51; Olympus, Tokio, Japão). As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) após conversão em escala de cinza e delimitação dos embriões para determinação do diâmetro, da área e da intensidade média (pixels) pela área. A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens. O grupo

Controle foi escolhido como calibrador e o valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de intensidade de pixels (expressos em unidades arbitrárias de intensidade de pixels - UAIP).

5.9 Avaliação da taxa de apoptose embrionária: detecção da fragmentação nuclear através da coloração com “Terminal Transferase Assay” - TUNEL

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

Os embriões foram lavados em PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 10 μ L da mistura (1:9 da enzima e do tampão, respectivamente) para a coloração de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Germany), por 1 hora a 37°C no escuro. Posteriormente, os embriões foram incubados em solução Hoechst 33342 (1 μ g/mL de PBS-PVP) por 30 minutos, em temperatura ambiente.

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

5.10 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi avaliado pela coloração MitoTracker Red[®] (CMXRos, Molecular Probes), de acordo com as recomendações

do fabricante. Os embriões foram lavados duas vezes em PBS e incubados em 0,5 μ M de MitoTracker Red[®] durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus, IX51; 543 nm de excitação e 575 nm de emissão). As imagens obtidas foram armazenadas e posteriormente processadas e analisadas pelo software Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Versão 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, mensurada em pixels. A intensidade do sinal de “background” foi subtraída dos valores medidos das imagens. O grupo Controle foi escolhido como calibrador e o valor de cada imagem foi dividido pela média do calibrador para gerar os níveis de expressão relativa de fluorescência (expressos em UAF). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o potencial de membrana mitocondrial.

5.11 Vitrificação e análise da re-expansão pós-aquecimento

Foi utilizado o protocolo Vitri-Ingá[®] (INGAMED - Produtos Médicos Hospitalares, Perobal, PR, Brasil) para vitrificação e aquecimento. Todos os meios e materiais utilizados foram adquiridos da empresa.

Os embriões obtidos no D7 de desenvolvimento foram retirados da placa de CIV e transferidos para uma placa de poliestireno de 100x20 mm contendo gotas de meio SOFaa. Foram então classificados de acordo com o Manual da IETS (WRIGHT, 2009) sendo selecionados para vitrificação apenas os blastocistos expandidos de grau 1. Em seguida, foram transferidos para gota de solução de vitrificação 1 (VI) por 5 minutos e posteriormente lavados três vezes em gotas da solução de vitrificação 2 (VII), por 20 segundos em cada gota. Os embriões foram retirados com auxílio de uma pipeta, em menos de 2 μ L da solução VI, e depositados na porção final de uma haste de polipropileno de 0,7 mm de espessura, a porção final das hastes foi mergulhada em nitrogênio líquido e seus protetores acoplados. Finalmente, as hastes foram introduzidas em raques previamente identificadas com os grupos experimentais e armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para desvitrificação dos embriões (aquecimento), as hastes foram retiradas do botijão de nitrogênio onde estavam armazenadas e seus protetores foram desacoplados. A porção final das hastes foi imersa na solução de desvitrificação 1 (DV I), até que a microgota fosse desfeita (1 minuto). Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução 2 (DV II) por 3 minutos e, por fim, na solução 3 (DV III) por 5 minutos.

Após esse procedimento, os embriões foram lavados em meio SOFaa e transferidos para placas de CIV (gotas de 100 μ L de meio SOFaa suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, cobertas com óleo mineral). Os embriões foram cultivados *in vitro*, à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% CO₂ em ar, por até 48 horas. Dessa forma foi avaliada a taxa de sobrevivência *in vitro*, expressa pela taxa de re-expansão às 24 e 48 horas após reaquecimento.

5.12 Aspiração folicular guiada por ultrassom

Vinte e duas vacas puras de origem (PO) da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) cíclicas, com idade média de 36 meses, foram utilizadas no experimento (em duas repetições, com um período de descanso de 40 dias).

As fêmeas foram devidamente preparadas, com esvaziamento do reto e lavagem da região perineal, para realização do procedimento anestésico. Prosseguiu-se com a aplicação de 5 mL de lidocaína no espaço intervertebral, entre a última vértebra sacral e a primeira coccígea, previamente tricotomizado. Em seguida, foi realizada a avaliação da população folicular ovariana com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia (Aloka, modelo 500), com transdutor retal 5 MHz. Todos os folículos maiores do que 5 mm visualizados nos ovários foram puncionados para obtenção dos CCOs. Para tanto, foi utilizada agulha calibre 18 G acoplada à sonda convexa transvaginal 5 MHz, com bomba de sucção a vácuo (70 mm/Hg), produzindo um fluxo de 15 mL/minuto. O conteúdo folicular foi recuperado a partir de um circuito de Teflon, de 2mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, ligando a agulha diretamente a um tubo plástico de 50 mL, contendo 10 mL de meio de coleta (constituído de DPBS com 5000 UI de heparina sódica por litro, com temperatura variando entre 36 e 37°C). Após o procedimento de aspiração

folicular, cada tubo de coleta foi previamente identificado com os dados do animal e então conduzido ao laboratório. O material coletado foi depositado em filtro de coleta de embriões, com malha de 80 μm (Millipore™, Bedford, MA, USA) e lavado com DPBS. Os CCOs recuperados no filtro foram transferidos para placas de poliestireno 100X20 mm (Corning Incorporated, NY, USA) e avaliados sob esteriomicroscópio. Após a seleção dos CCOs viáveis (aspecto do citoplasma quanto a cor, homogeneidade e integridade; presença, número de camadas e grau de expansão das células do *cumulus*), os mesmos foram lavados 2 vezes em meio de lavagem e então depositados em criotubos com fundo cônico com meio de maturação e óleo mineral, os quais foram gaseificados com CO_2 e armazenados em estufa de transporte a 38°C (WTA®, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) até a chegada ao laboratório. Após a chegada ao laboratório, os oócitos foram retirados dos criotubos e lavados em meio de maturação até a retirada completa do óleo mineral, sendo então transferidos para o cultivo de maturação. A MIV, FIV e CIV seguiram da mesma forma como já descrito.

5.13 Sincronização das receptoras

Receptoras nelore foram submetidas a protocolo de sincronização em tempo fixo para a transferência dos embriões. Após avaliação ginecológica completa dos animais, por palpação retal, estes foram submetidos ao seguinte protocolo de sincronização: dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis-Pfizer, Brasil) e aplicação de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Bioestrogen®, Biogénesis Bagó, Brasil) no Dia 0; retirada do dispositivo e aplicação de 150 μg de D-Cloprostenol (Croniben®, Biogénesis Bagó, Brasil) e 250 UI de ECG (Novormon®, Zoetis-Pfizer, Brasil) no Dia 8; aplicação 1 mg de Benzoato de Estradiol no Dia 9; e a transferência dos embriões no Dia 17, sem a observação de cio, em animais que apresentaram corpo lúteo (CL1, CL2 e CL3, sendo classificados de acordo com o diâmetro em aproximadamente 20mm, 15mm e 10mm, respectivamente, e o lado que ocorreu a ovulação - Direito ou Esquerdo). O esquema do protocolo de sincronização está representado na Figura 5.

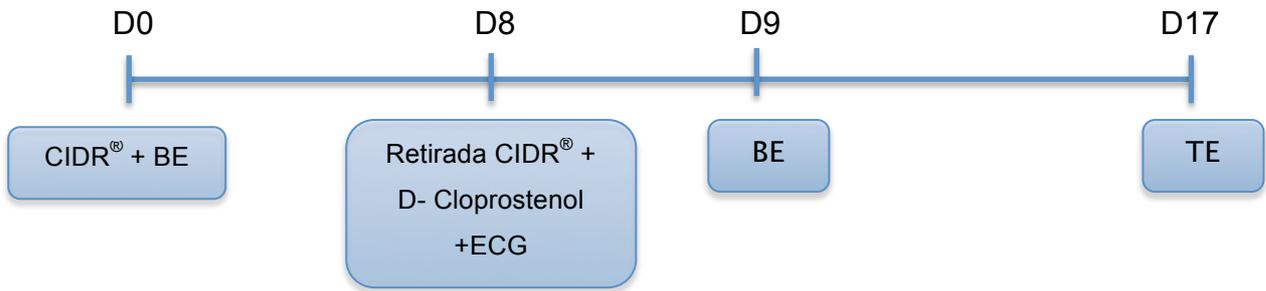


Figura 5: Representação esquemática do protocolo de sincronização das receptoras. BE – benzoato de estradiol, ECG- gonadotrofina coriônica equina, TE – transferência de embriões.

5.14 Avaliação da taxa de concepção

Os animais inovulados foram avaliados após 30 dias da transferência por palpação retal e ultrassonografia (Aloka 500 – probe retal 5 MHz) para diagnóstico de gestação, no qual foi avaliada a presença de vesícula gestacional e batimentos cardíacos dos fetos.

5.15 Sexagem e viabilidade fetal

Após 60 dias da inovulação, os animais com prenhez positiva foram avaliados por ultrassonografia (Aloka 500 – probe retal 5 MHz) para detecção do sexo dos fetos e morte embrionária precoce (MEP).

5.16 Delineamento Experimental

5.16.1 Experimento 1: Efeitos da suplementação do meio de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de forskolin sobre o desenvolvimento embrionário e teor lipídico intracitoplasmático de embriões bovinos

Oócitos (n=772) obtidos por punção folicular de ovários de vacas abatidas foram submetidos à maturação, fertilização e cultivo *in vitro*. Foram utilizadas 25 estruturas por microgota contendo 90 µL de meio, cobertas por óleo mineral, em

estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. No dia 6 do cultivo (D6; como estabelecido por PASCOAL, 2009), foi feita suplementação com Forskolin (F6886 Sigma) nas seguintes concentrações: 0 µM (Controle) 2,5 µM (Forsk 2,5), 5,0 µM (Forsk 5,0) e 10 µM (Forsk 10). O desenvolvimento embrionário foi avaliado no D7 (168 hpi), quando os blastocistos expandidos foram avaliados quanto à presença de lipídios intracitoplasmáticos com auxílio da coloração com Sudan Black B.

5.16.2 Experimento 2: Efeitos da suplementação com ácido linoleico durante diferentes etapas da produção *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário e teor lipídico intracitoplasmático de embriões bovinos

5.16.2.1 Experimento 2A: Avaliação da maturação nuclear

Oócitos (n=96) obtidos por punção folicular de ovários de vacas abatidas foram maturados *in vitro* por 22 horas em incubadora a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar, na presença ou não de ácido linoleico (L1376 Sigma), como se segue: grupo Controle (0 µM de ácido linoleico) e grupo LA MIV (100 µM de ácido linoleico). Oócitos imaturos e após a MIV foram corados com Hoechst 33342 para avaliação da maturação nuclear.

5.16.2.2 Experimento 2B: Avaliação do desenvolvimento embrionário e quantificação intracelular de lipídios

Oócitos (n=526) de vacas abatidas foram maturados *in vitro* em meio suplementado com 100 µM de ácido linoleico (LA MIV) ou sem suplementação (Controle). Após a maturação, os oócitos foram submetidos à fertilização *in vitro* e os prováveis zigotos dos grupos acima descritos foram subdivididos em 2 grupos cada um, sendo cultivados em meio suplementado com 100 µM de ácido linoleico durante todo o período do CIV ou não receberam suplementação. Desta maneira, foram constituídos 4 grupos experimentais: Controle (sem suplementação com LA), LA MIV (suplementação com LA apenas durante a MIV), LA CIV (suplementação com LA

apenas durante o CIV) e LA MIV/CIV (suplementação com LA durante a MIV e durante o CIV). Foram utilizadas placas de cultivo celular de 4 poços, sendo cultivadas no máximo 50 estruturas por poço, contendo 500 µL de meio, sem adição de óleo mineral. Os CCOs foram cultivados em incubadora a 38,5°C, máxima umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A taxa de clivagem foi avaliada 48 hpi, e o desenvolvimento embrionário 168 hpi. Os blastocistos expandidos foram corados com Sudan Black B para avaliação do teor de lipídios intracitoplasmáticos.

5.16.3 Experimento 3: Efeitos da suplementação do meio de cultivo *in vitro* com forskolin e/ou ácido linoleico sobre o desenvolvimento embrionário, taxa de apoptose e criotolerância do embrião bovino

Com base nos resultados dos experimentos 1 e 2, os grupos que apresentaram melhores resultados (Forskolin na concentração de 5,0 µM e suplementação com LA no CIV) foram selecionados para o experimento 3.

Oócitos (n=1242) foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*. Foram utilizadas placas de cultivo celular de 4 poços, sendo cultivadas no máximo 50 estruturas por poço, contendo 500 µL de meio, sem adição de óleo mineral em incubadora a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Após a fecundação, os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOFaa com as seguintes suplementações: sem suplementação até o D6 (144 hpi) e, a partir deste momento, suplementado com forskolin na concentração de 5,0 µM até o final do cultivo (grupo Forsk 5,0); suplementado com 100 µM de LA durante todo o período de cultivo (grupo LA CIV); suplementado com 100 µM de LA durante todo o período de cultivo, com inclusão de forskolin na concentração de 5,0 µM do D6 até o final do cultivo (grupo LA CIV + Forsk 5,0); ou sem suplementação (grupo Controle). A taxa de clivagem foi avaliada 48 hpi, e o desenvolvimento embrionário 168 hpi. Os embriões produzidos foram avaliados quanto ao desenvolvimento, taxa de apoptose pelo ensaio TUNEL, potencial de membrana mitocondrial, concentração de lipídios intracitoplasmáticos e taxa de re-expansão após desvitrificação.

5.16.4 Experimento 4: Efeitos da exposição de embriões bovinos ao Forskolin durante o cultivo *in vitro* sobre a criotolerância embrionária e sobre a taxa de concepção após transferência

Com base nos resultados do experimento 3, o grupo que apresentou melhores resultados (Forskolin na concentração de 5,0 μM) foi selecionado para o experimento 4.

Oócitos (n=1947) de doadoras Nelore registradas foram aspirados e submetidos à maturação, fertilização e cultivo *in vitro*. Foram cultivadas, por doadora, no máximo 25 estruturas por microgota de 90 μL de meio, cobertas por óleo mineral, em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO_2 em ar. Uma parte (50% do total de zigotos obtidos) recebeu suplementação de 5 μM de Forskolin (Forsk 5,0) no dia 6 do cultivo; outra parte dos zigotos foi cultivada em meio sem suplementação (Controle). A taxa de clivagem foi avaliada 48 hpi e o desenvolvimento embrionário foi avaliado as 168 hpi. Os embriões (n=235) produzidos no D7 foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas para avaliação da taxa de prenhez de embriões frescos. O restante dos embriões (n=162) foram vitrificados e posteriormente aquecidos e avaliados antes de serem transferidos para receptoras sincronizadas, para posterior avaliação da taxa de concepção. Os animais com diagnóstico de prenhez positivo aos 30 dias foram avaliados com US aos 60 dias para sexagem fetal e observação de morte embrionária precoce (MEP). Os animais nascidos foram pesados e, ao final da estação de parição, foram avaliadas as taxas de nascimentos, abortos e natimortos.

5.17 Análise estatística

Os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Para as análises em porcentagens (maturação nuclear, taxas de clivagem e de produção de blastocistos) a unidade experimental para cada replicata foi uma microgota da placa de cultivo celular contendo 25 oócitos. Para as demais análises (concentração intracelular de lipídios e potencial mitocondrial, diâmetro do embrião, taxas de apoptose e número total de

células embrionárias), a unidade experimental foi um oócito individual. As taxas de clivagem e de produção de blastocistos foi calculada a partir do número de oócitos inseminados. Os dados foram analisados pela fração de oócitos ou embriões cultivados que atingiram os estágios determinados, reportada em termos de porcentagem.

Os dados dos experimentos 1, 2 e 3 foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey. As porcentagens foram transformadas em arco-seno da raiz quadrada. As variáveis binomiais (re-expansão embrionária pós-aquecimento) foram analisadas pelo teste do Qui-Quadrado. Probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas. Os dados foram avaliados pelo programa JMP (versão 5.0.1, SAS Institute).

Os dados do Experimento 4 foram analisados através de modelo linear misto generalizado com medidas repetidas, como implementado no pacote lme4 do software R v3.2.5 (disponível em: <https://www.r-project.org/>). Foram consideradas como variáveis dependentes binomiais: taxa de clivagem, produção de blastocisto, aproveitamento dos embriões aquecidos e prenhez, relação entre o número de produtos do sexo masculino/feminino e ocorrência de abortos e natimortos. A heterogeneidade de variância destas variáveis foi levada em consideração através da ponderação dos resíduos pelo número de observações de cada registro. O peso ao nascimento foi considerado como variável dependente normal. Todos os modelos incluíram o efeito fixo do tratamento (Controle/Forskolin). Diferenças entre embriões frescos e vitrificados foram ajustadas como efeito fixo nos modelos para taxa de prenhez, relação entre o número de produtos do sexo masculino/feminino, peso ao nascimento e ocorrência de abortos e natimortos. Adicionalmente, efeitos fixos do estágio de desenvolvimento e da qualidade embrionária e do corpo lúteo da receptora foram incluídos nos modelos para prenhez, peso ao nascimento e ocorrência de abortos e natimortos. Em todos os modelos, os efeitos aleatórios das doadoras foram incluídos assumindo-se independência e distribuição normal. Um teste de razão de verossimilhança foi utilizado para testar a hipótese de que a variância devido a doadora é nula. Testes de hipótese para os efeitos fixos foram

baseados em um teste F e sumarizados utilizando-se tabela de análise de variância (ANalysis Of VAriance – ANOVA). Finalmente, diferenças na produção de machos e fêmeas foram testadas por meio de um teste qui-quadrado de aderência, assumindo-se igualdade de proporções.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1

As taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocistos em embriões tratados com diferentes concentrações de forskolin durante o CIV estão representadas na Tabela 1. Não houve diferença ($P>0,05$) nas taxas de clivagem ($80,29\pm 5,46\%$ a $83,30\pm 4,36$) e de produção de blastocistos ($40,53\pm 4,03\%$ a $55,53\pm 3,16\%$) entre os diferentes tratamentos.

Tabela 1. Clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* na presença de diferentes concentrações de Forskolín

Grupos	Nº Oócitos	Clivagem (%Média±EPM)	Blastocistos (%Média±EPM)
Controle	198	80,63 ± 4,26	45,16 ± 0,93
Fosrk 2,5	194	83,06 ± 4,55	52,01 ± 5,47
Forsk 5,0	192	83,30 ± 4,36	55,53 ± 3,16
Forsk 10	188	80,29 ± 5,46	40,53 ± 4,03

Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF; Fosrk 2,5: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 2,5 µM de forskolin no dia 6 do CIV; Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado 5,0 µM de forskolin no dia 6 do CIV; Fosrk 10: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 10 µM de forskolin no dia 6 do CIV. Médias de 4 replicatas. Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$) pelo teste de Tukey.

As concentrações de lipídios intracitoplasmáticos em blastocistos expandidos estão demonstradas nas Figuras 6 e 7 e os valores estão expressos em UAIP. O tratamento com 5,0 µM de forskolin ($0,82\pm 0,04$) proporcionou maior redução ($P<0,05$) no teor lipídico quando comparado com o grupo controle ($1,00\pm 0,03$) e com o grupo Fosrk 10 ($1,06\pm 0,03$), porém não diferiu ($P>0,05$) do grupo Forsk 2,5 ($0,92\pm 0,03$).

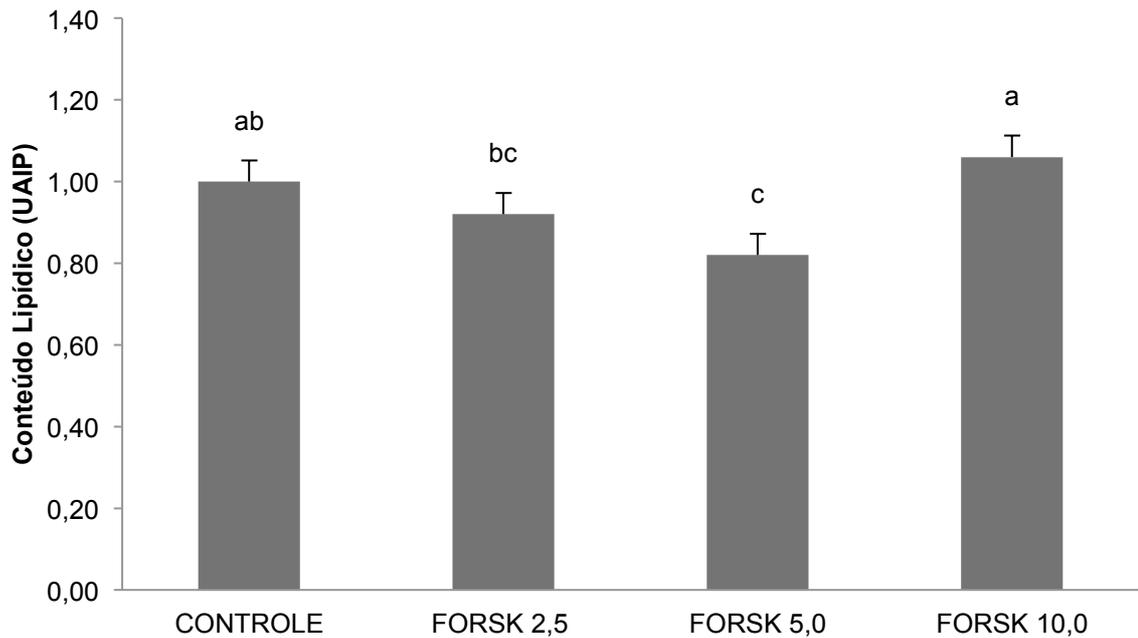


Figura 6: Quantificação de lipídios (em pixels) em blastocistos expandidos cultivados *in vitro* na presença de diferentes concentrações de Forskolina. Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF (n=31); Forsk 2,5: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 2,5 μ M de forskolin no dia 6 do CIV (n=23); Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 5,0 μ M de forskolin no dia 6 do CIV (n=22); Forsk 10: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 10 μ M de forskolin no dia 6 do CIV (n=23). Valores expressos em unidades arbitrárias de intensidade de pixels (UAIP). Médias de 4 replicatas. ^{ab}Valores seguidos por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

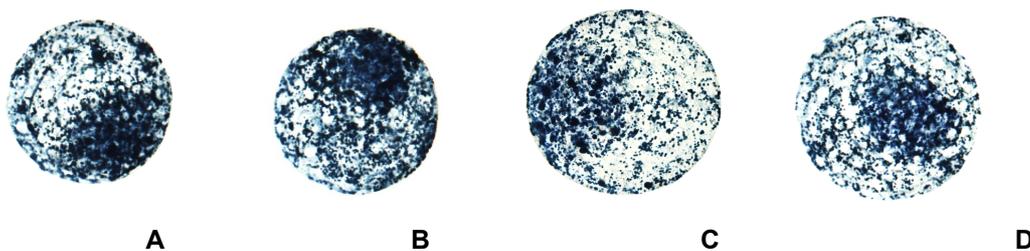


Figura 7: Fotomicrografias representativas de embriões bovinos produzidos *in vitro* na presença de diferentes concentrações de forskolin. Coloração com o corante lipofílico Sudan Black B para determinação do acúmulo lipídico intracitoplasmático. **A:** Controle; **B:** Forskolina 2,5; **C:** Forskolina 5,0 e **D:** Forskolina 10. Aumento: 40x.

Com base nestes resultados (produção de blastocistos e quantidade de lipídios), a dose de 5,0 μM de forskolin foi escolhida para ser utilizada no Experimento 3.

6.2 Experimento 2

6.2.1 Experimento 2A

A maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* na presença de LA está representada na Figura 8. Não houve diferença ($P>0,05$) no estágio da meiose entre o grupo tratado com LA e o grupo controle.

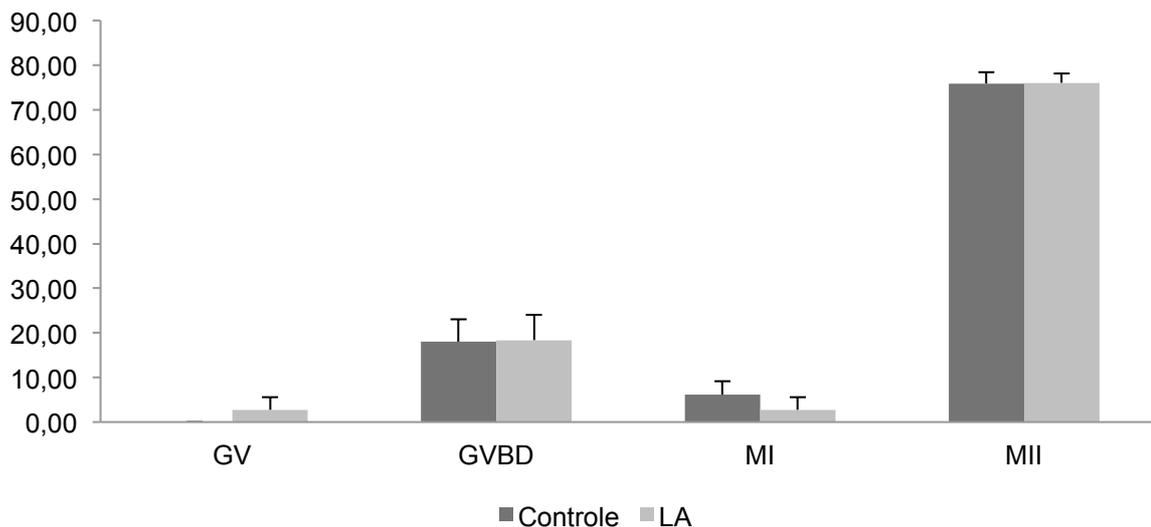


Figura 8. Efeito da adição do ácido linoleico no meio de maturação sobre a progressão da meiose as 22h da MIV. VG: vesícula germinativa; GVBD: quebra de vesícula germinativa; MI: metáfase I e MII: metáfase II; Controle: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB (n=45); LA: oócitos maturados *in vitro* em meio MIV suplementado com 10% SFB e 100 μM de ácido linoleico (n=51). Médias de 3 replicatas. Não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$) pelo teste de Tukey..

6.2.2 Experimento 2B

Os efeitos do tratamento com LA em diferentes etapas da PIVE sobre as taxas de clivagem e de desenvolvimento até o estágio de blastocistos estão representados na Tabela 2. Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de clivagem

(84,45±3,18% a 94,06±0,78%) e de produção de blastocistos (32,93±4,27% a 46,84±4,63%) entre os grupos tratados comparados com o controle.

Tabela 2. Efeitos da suplementação com ácido linoleico durante diferentes etapas da produção *in vitro* (maturação e/ou cultivo embrionário) sobre a clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto

Grupos	N° Oócitos	Clivagem (%Média±EPM)	Blastocistos (%Média±EPM)
Controle	137	94,06 ± 0,78	46,50 ± 2,00
LA MIV	133	88,26 ± 3,95	44,67 ± 9,09
LA CIV	131	85,88 ± 3,53	46,84 ± 4,63
LA MIV/CIV	125	84,45 ± 3,18	32,93 ± 4,27

Controle: embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado com 10% SFB na MIV e em meio SOF suplementado com 2,5% SFB e 2,5% BSA no CIV (n=137); LA MIV: embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado com 10% SFB e 100 µM de LA na MIV e em meio SOF suplementado com 2,5% SFB e 2,5% BSA no CIV (n=133); LA CIV: embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado com 10% SFB na MIV e em meio suplementado com 2,5% SFB, 2,5% BSA e 100 µM de LA no CIV (n=131); LA MIV/CIV: embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado com 10% SFB e 100 µM de LA na MIV e em meio suplementado com 2,5% SFB, 2,5% BSA e 100 µM de LA no CIV (n=125). Médias de 3 replicatas. Não houve diferença entre os tratamentos (P>0,05) pelo teste de Tukey.

As concentrações de lipídios intracitoplasmáticos em embriões, expressas em UAIP, estão representadas na Figura 9. O grupo LA MIV/CIV (0,71±0,06) apresentou maior redução (P<0,05) no teor de lipídios se comparado com os grupos controle (1,00±0,04) e LA MIV (0,92±0,05), mas não diferiu (P>0,05) do grupo LA CIV (0,84±0,04). Imagens representativas de embriões corados com o corante lipofílico Sudan Black B podem ser observadas na Figura 10.

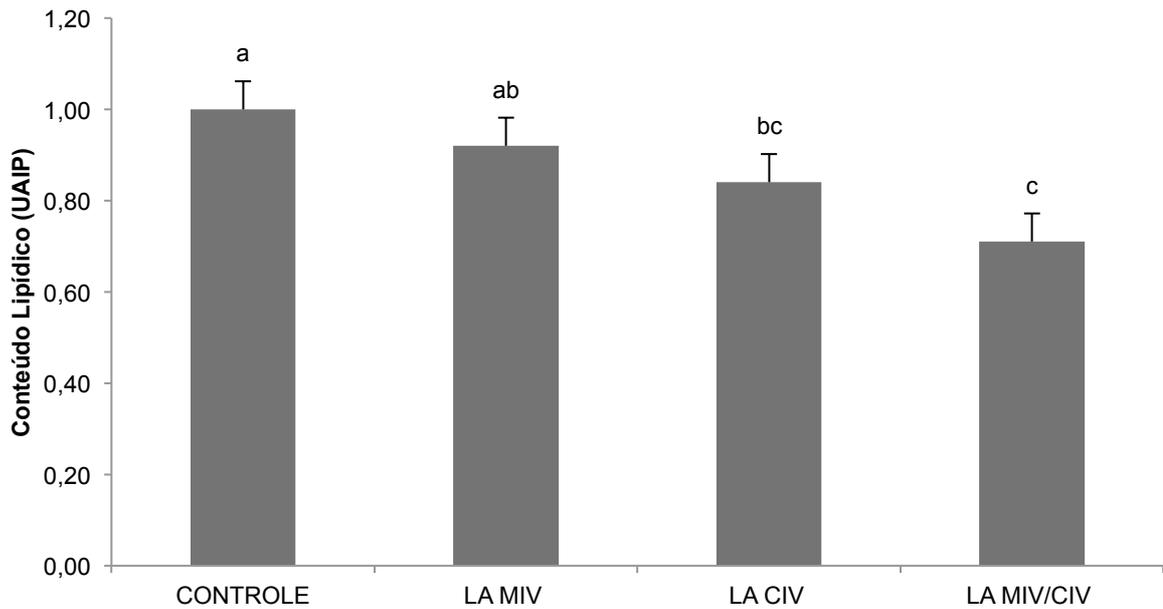


Figura 9. Efeitos da suplementação com ácido linoleico durante diferentes etapas da produção *in vitro* de embriões sobre a quantificação de lipídios intracitoplasmáticos em blastocistos expandidos. Controle: embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado com 10% SFB na MIV e em meio SOF suplementado com 2,5% SFB e 2,5% BSA no CIV (n=137); LA MIV: embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado com 10% SFB e 100 μ M de LA na MIV e em meio SOF suplementado com 2,5% SFB e 2,5% BSA no CIV (n=133); LA CIV: embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado com 10% SFB na MIV e em meio suplementado com 2,5% SFB, 2,5% BSA e 100 μ M de LA no CIV (n=131); LA MIV/CIV: embriões produzidos *in vitro* em meio suplementado com 10% SFB e 100 μ M de LA na MIV e em meio suplementado com 2,5% SFB, 2,5% BSA e 100 μ M de LA no CIV (n=125). Valores expressos em unidades arbitrárias de intensidade de pixels (UAIP). Médias de 3 replicatas. ^{abc} Valores seguidos por letras distintas, para cada variável, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

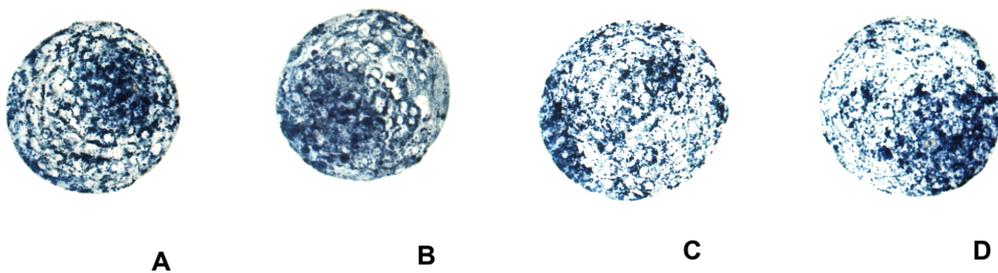


Figura 10: Fotomicrografias representativas de embriões bovinos tratados com ácido linoleico em diferentes etapas da produção *in vitro*. Coloração com o corante lipofílico Sudan Black B para determinação do acúmulo lipídico intracitoplasmático. **A:** Controle; **B:** LA MIV; **C:** LA CIV e **D:** LA MIV/CIV. Aumento: 40x.

Com base nos resultados do presente experimento, o grupo suplementado com com LA no CIV foi escolhido para o Experimento 3, já que proporcionou

diminuição no teor de lipídios intracitoplasmáticos em comparação com o grupo controle. Embora o grupo LA MIV/CIV tenha proporcionado a maior redução no teor de lipídios intracitoplasmáticos observada neste estudo, este tratamento não foi escolhido para ser utilizado no experimento 3 devido ao fato da produção de blastocistos ter sido numericamente inferior aos demais tratamentos.

6.3 Experimento 3

As taxas de clivagem e de desenvolvimento até a fase de blastocisto em embriões tratados com forskolin e/ou ácido linoleico durante o cultivo *in vitro* estão sumarizadas na Tabela 3. Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de clivagem ($84,28\pm 2,21\%$ a $86,39\pm 1,96\%$) e de produção de blastocistos ($47,21\pm 3,87\%$ a $51,64\pm 5,53\%$) entre os grupos.

Tabela 3. Efeitos da suplementação com forskolin e/ou ácido linoleico durante o cultivo *in vitro* sobre a clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto

Grupos	N° Oócitos	Clivagem (%Média±EPM)	Blastocistos (%Média±EPM)
Controle	312	85,78 ± 3,07	49,99 ± 3,32
Fosrk 5,0	311	86,24 ± 3,14	47,21 ± 3,87
LA CIV	310	84,28 ± 2,21	51,64 ± 5,53
LA CIV + Forsk 5,0	309	86,39 ± 1,96	47,87 ± 3,95

Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF; Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com $5,0 \mu\text{M}$ de forskolin no dia 6 do CIV; LA CIV: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com $100 \mu\text{M}$ de LA; LA CIV + Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com $100 \mu\text{M}$ de LA e com adição de $5,0 \mu\text{M}$ de forskolin no dia 6 do CIV. Médias de 8 replicatas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

Foi observada diminuição no teor de lipídios, expresso em UAIP, em embriões do grupo Forsk 5,0 ($0,86\pm 0,04$) quando comparado aos grupos controle ($1,0\pm 0,02$) e LA CIV ($1,02\pm 0,02$; $P<0,05$). No entanto, o grupo LA CIV + Forsk 5,0 ($0,95\pm 0,03$) não diferiu de nenhum dos tratamentos anteriormente mencionados ($P>0,05$). Estes resultados estão sumarizados na Figura 11 e imagens

representativas de embriões corados com o corante lipofílico Sudan Black B podem ser observadas na Figura 12.

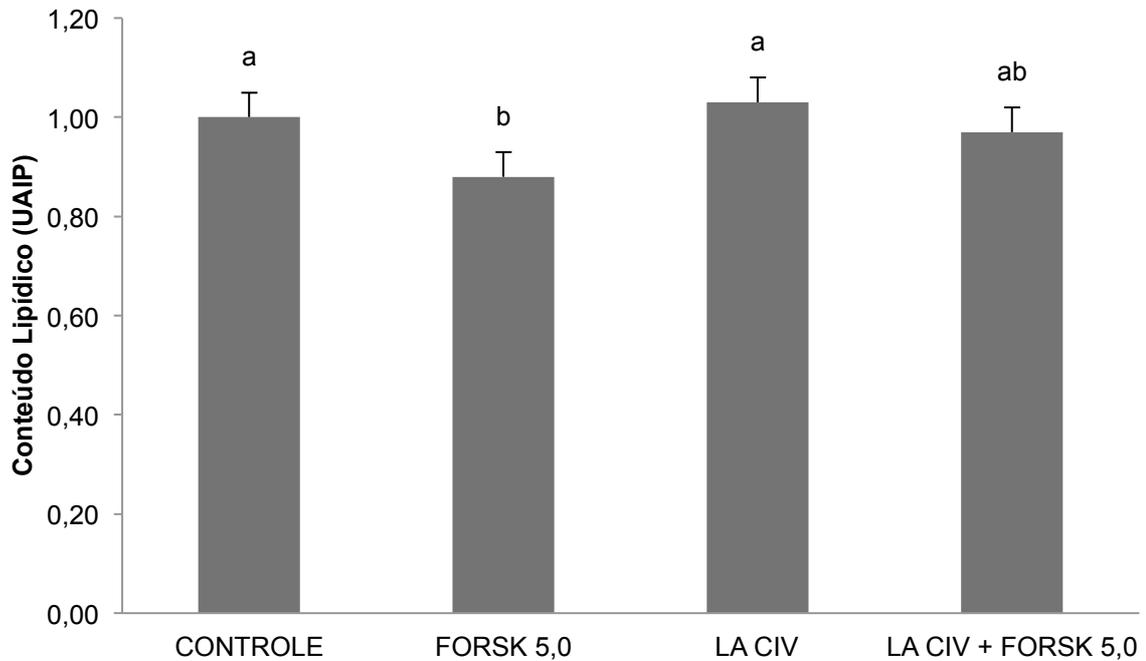


Figura 11. Quantificação de lipídios intracitoplasmáticos em blastocistos expandidos cultivados *in vitro* na presença de forskolin e/ou ácido linoleico. Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF (n=38); Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 5,0 μ M de forskolin no dia 6 do CIV (n=25); LA CIV: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 μ M de LA durante todo o período de cultivo (n=32); LA CIV + Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 μ M de LA durante todo o período de cultivo e com adição de 5,0 μ M de forskolin no dia 6 do CIV (n=29). Valores expressos em unidades arbitrárias de intensidade de pixels (UAIP).. Médias de 3 replicatas. ^{ab} Valores seguidos por letras distintas, para cada variável, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

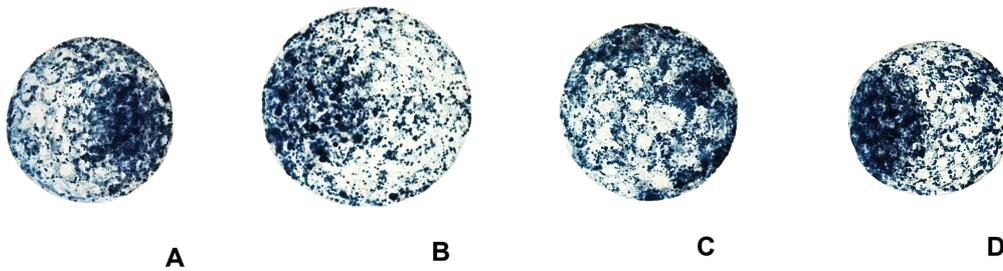


Figura 12: Fotomicrografias representativas de embriões bovinos tratados com forskolin e/ou ácido linoleico durante o cultivo *in vitro*. Coloração com o corante lipofílico Sudan Black B para determinação do acúmulo lipídico intracitoplasmático. **A:** Controle; **B:** Forsk 5,0; **C:** LA CIV e **D:** LA CIV + Foslrk 5,0. Aumento: 40x.

O diâmetro de embriões do grupo suplementado com forskolin ($180,8 \pm 4,6 \mu\text{m}$) foi maior ($P < 0,05$) quando comparado com o de embriões do grupo controle ($167,9 \pm 2,5 \mu\text{m}$) e do grupo LA CIV ($164,9 \pm 2,5 \mu\text{m}$), porém não diferiu ($P > 0,05$) do grupo LA CIV + Forsk 5,0 ($169,9 \pm 2,5 \mu\text{m}$). Os resultados estão representados na Figura 13.

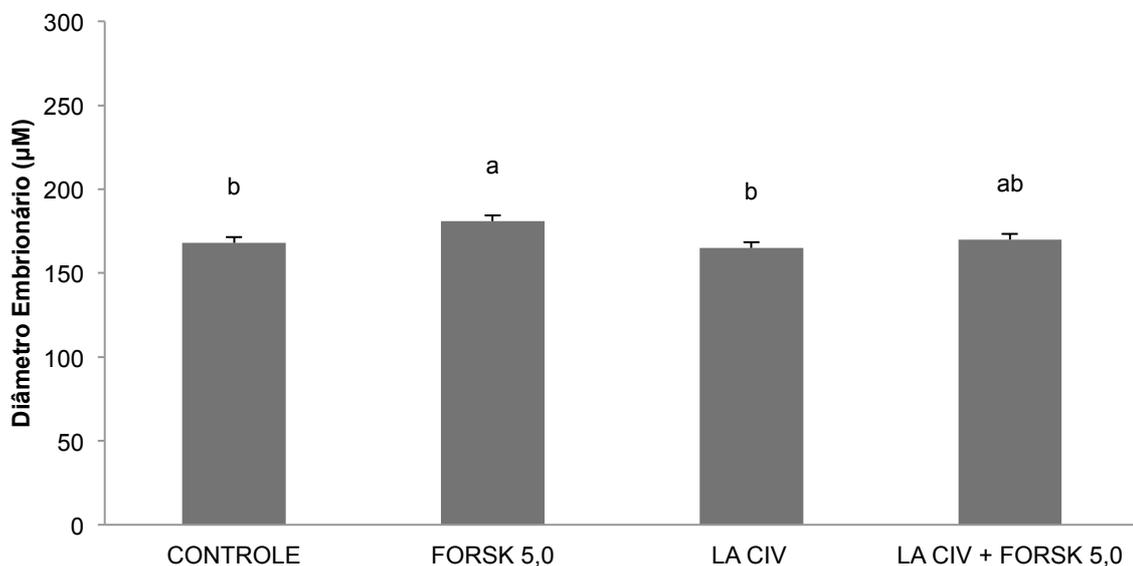


Figura 13: Avaliação do diâmetro de blastocistos expandidos cultivados *in vitro* na presença de forskolin e/ou ácido linoleico. Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF (n=38); Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF com 5,0 µM de forskolin no dia 6 do CIV (n=25); LA CIV: embriões cultivados *in vitro* em meio meio SOF suplementado 100 µM de LA durante todo o período de cultivo (n=29); LA CIV + Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 µM de LA durante todo o período de cultivo e com adição de 5,0 µM de forskolin no dia 6 do CIV (n=32). Médias de 3 replicatas. ^{ab} Valores seguidos por letras distintas, para cada variável, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

O número total de células de blastocistos bovinos (Figura 14) foi maior ($P < 0,05$) no grupo suplementado com forskolin ($83,5 \pm 3,5$) se comparado com o grupo controle ($69,1 \pm 2,5$), mas não diferiu ($P > 0,05$) dos grupos LA CIV e LA CIV + Forsk 5,0 ($71,8 \pm 3,1$ e $75,1 \pm 5,6$, respectivamente).

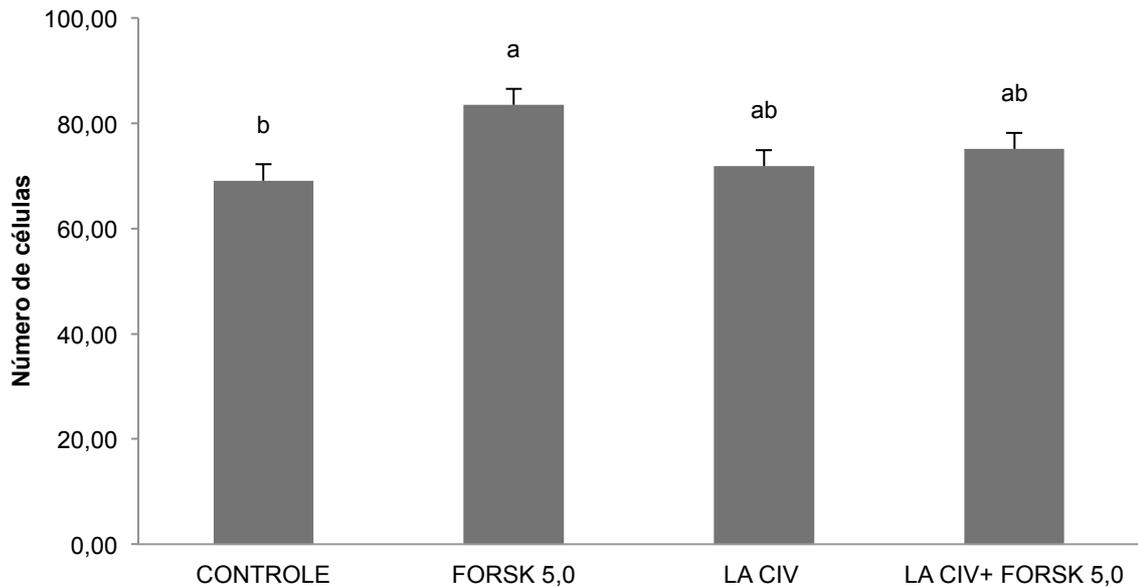


Figura 14: Número total de células em blastocistos bovinos cultivados *in vitro* na presença de forskolin e/ou ácido linoleico. Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF (n=33); Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 5,0 μM de forskolin no dia 6 do CIV (n=36); LA CIV: embriões cultivados *in vitro* em meio meio SOF suplementado com 100 μM de LA durante todo o período de cultivo (n=33); LA CIV + Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 μM de LA durante todo o período de cultivo e com adição de 5,0 μM de forskolin no dia 6 do CIV (n=33). Médias de 5 replicatas. ab Valores seguidos por letras distintas, para cada variável, diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Não houve diferença ($P > 0,05$) quanto ao potencial mitocondrial, expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, entre os diferentes tratamentos ($1,0 \pm 0,1$ a $1,1 \pm 0,1$), como demonstrado na Figura 15.

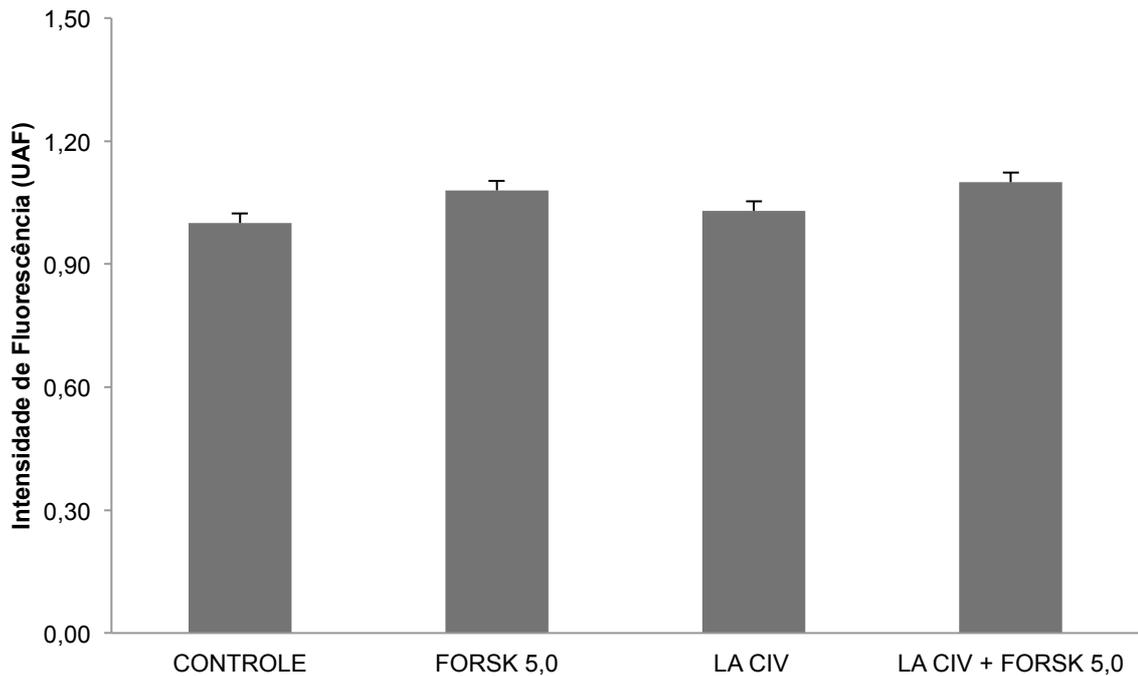


Figura 15: Potencial mitocondrial em blastocistos bovinos cultivados *in vitro* na presença de forskolin e/ou ácido linoléico. Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF (n=48); Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 5,0 μM de forskolin no dia 6 do CIV (n=53); LA CIV: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 μM de LA durante todo o período de cultivo (n=49); LA CIV + Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 μM de LA durante todo o período de cultivo e com adição de 5,0 μM de forskolin no dia 6 do CIV (n=47). Valores expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). Médias de 5 replicatas. Não houve diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Da mesma forma, não houve diferença ($P > 0,05$) quanto à taxa de apoptose entre os tratamentos ($8,7 \pm 0,9$ a $10,4 \pm 1,2$), conforme demonstrado na Figura 16.

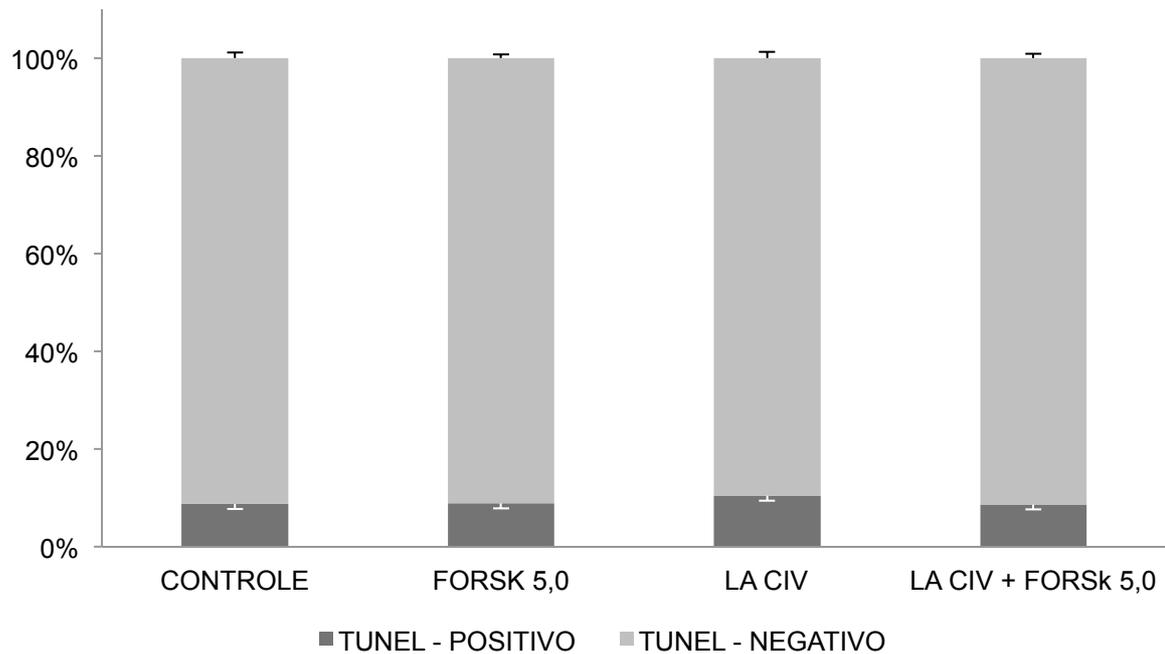


Figura 16: Proporção de blastômeros em apoptose (TUNEL-positivo) e de blastômeros normais (TUNEL-negativo) em blastocistos bovinos cultivados *in vitro* na presença de forskolin e/ou ácido linoleico. Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF (n=33); Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 5,0 μ M de forskolin no dia 6 do CIV (n=36); LA CIV: embriões cultivados *in vitro* em meio meio SOF suplementado com 100 μ M de LA durante todo o período de cultivo (n=33); LA CIV + Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 μ M de LA durante todo o período de cultivo e com adição de 5,0 μ M de forskolin no dia 6 do CIV (n=33). Médias de 3 replicatas. Não houve diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P>0,05$).

As taxas de sobrevivência de embriões após o aquecimento estão demonstradas na Tabela 4. Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de re-expansão imediata (0h) entre os tratamentos (30,8% a 41,9%). No entanto, a taxa de re-expansão após 24 horas de cultivo e de eclosão após 48 horas de cultivo foram maiores ($P<0,05$) no grupo tratado com forskolin (71,4%) quando comparado aos grupos controle (46,2%) e LA CIV + Forsk 5,0 (45,2%); porém, não diferiu ($P>0,05$) do grupo LA CIV (65,1%).

Tabela 4. Taxas de sobrevivência pós-aquecimento de blastocistos bovinos cultivados *in vitro* na presença de forskolin e/ou ácido linoleico

Grupos	N° Embriões	Re-expansão	Re-expansão e
		imediate (0h) N (%)	Eclosão (24-48h) N (%)
Controle	39	12 (30,8)	18 (46,2) ^b
Forsk 5,0	35	14 (40,0)	25 (71,4) ^a
LA CIV	43	14 (32,6)	28 (65,1) ^{ab}
LA CIV+ Forsk 5,0	31	13 (41,9)	14 (45,2) ^b

Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio; Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 5,0 μM de forskolin no dia 6 do CIV; LA CIV: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 μM de LA durante todo o período de cultivo; LA CIV + Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 100 μM de LA durante todo o período de cultivo e com adição de 5,0 μM de forskolin no dia 6 do CIV. Médias de 5 replicatas. ^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$).

Com base nos resultados do presente experimento, o tratamento Foslolin 5,0 μM foi escolhido para o Experimento 4.

6.4 Experimento 4

Para todas as variáveis dependentes estudadas, não foram encontradas diferenças entre os grupos controle e Forsk 5,0 ($P > 0,05$; Tabela 5). A transferência de embriões submetidos ao procedimento de vitrificação resultou em menores taxas de prenhez em comparação à transferência de embriões frescos ($P < 0,05$; Tabela 6). Observou-se um número significativamente superior ($P < 0,05$) de fetos machos ($n=88$) em comparação a fêmeas ($n=42$), porém nenhuma das variáveis independentes apresentaram associação com esta diferença ($P > 0,05$; dados não apresentados). Como esperado, diferenças de peso foram atribuídas apenas ao efeito de sexo, com animais machos apresentando peso médio $1,8 \pm 0,6$ kg superior ao das fêmeas (dados não apresentados). O efeito aleatório da doadora foi significativo ($P < 0,05$) apenas para taxa de clivagem e produção de blastocisto, explicando 29,14% e 14,3% da variância total destas variáveis, respectivamente.

Tabela 5. Variáveis analisadas de acordo com os tratamentos (Controle X Forskolin)

Variável	Tratamentos	
	Controle	Forskolin
% Clivagem (N° clivados / N° total oócitos)	82,02±2,19 (630/718)	86,28 ± 2,57 (635/714)
% Blastocistos (N° blastocistos / N° total oócitos)	36,26±3,33 (248/718)	36,10±2,62 (262/714)
% Aproveitamento após aquecimento (N° blastocistos vitrificados/ N° blastocistos re- expandidos após aquecimento)	59,90±7,13 (85/45)	56,77±7,12 (78/37)
Taxa de concepção embriões frescos aos 30 dias (N° blastocistos transferidos/ N° de vacas prenhes)	39,17±4,89 (153/73)	43,10±5,02 (163/75)
Taxa de concepção embriões vitrificados aos 30 dias (N° blastocistos transferidos/ N° de vacas prenhes)	25,00 ± 6,53 (44/11)	30,77 ± 7,39 (39/12)
% Mortalidade [N° nascidos / N° mortes (MEP, aborto e NM*)]	14,75±4,54 (61/9)	14,52±4,47 (62/9)
Peso ao nascimento (Kg) (N° bezerros nascidos)	39,79±0,35 (52)	39,30±0,46 (53)

Dados apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF; Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 5,0 µM de forskolin no dia 6 do CIV; *O cálculo da taxa de mortalidade incluiu a mortalidade embrionária precoce (MEP; diagnosticada aos 30 dias após a inovulação), abortos e natimortos (NM). Médias de 4 replicatas. Não houve diferença entre os tratamentos pelo teste F (P>0,05).

Tabela 6. Variáveis analisadas de acordo com o tipo de embrião (Fresco X Vitricado)

Variável	Tipo de embrião	
	Fresco	Vitricado
Taxa de concepção aos 30 dias (N° blastocistos transferidos/ N° de vacas prenhes)	57,91±3,71 ^a (234/125)	21,73±5,00 ^b (82/23)
% Mortalidade [N° nascidos/ N° mortes – (MEP, aborto e NM*)]	14,00±3,47 (100/14)	17,39±7,90 (23/4)
Peso ao nascimento (Kg) (N° bezerros nascidos)	39,49±0,35 (86)	39,70±0,35 (19)

Dados apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). Controle: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF; Forsk 5,0: embriões cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado com 5,0 µM de forskolin no dia 6 do CIV; *O cálculo da taxa de mortalidade incluiu a mortalidade embrionária precoce (MEP; diagnosticada aos 30 dias após a ovulação), abortos e natimortos (NM). Médias de 4 replicatas. ^{ab}Letras distintas na mesma linha indicam diferença entre os tratamentos pelo teste F (P>0,05).

7. DISCUSSÃO

Como o excessivo acúmulo lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro* tem sido associado frequentemente à perda de viabilidade e ao aumento das injúrias causadas pela criopreservação, este experimento foi desenvolvido com o objetivo de testar a adição, ao meio de cultivo *in vitro*, do agente lipolítico forskolin e do agente inibidor da lipogênese ácido linoleico, isoladamente ou associados, sobre o conteúdo lipídico intracitoplasmático embrionário e crio-resistência ao processo de vitrificação.

Há uma quantidade crescente de evidências que sugerem que a qualidade intrínseca do oócito é o fator chave para determinar a proporção de oócitos que se desenvolvem até o estágio de blastocisto, mas o ambiente de cultivo pós-fecundação é o principal fator determinante da qualidade dos mesmos (RIZOS et al, 2003; LONERGAN et al., 2003). Desta forma, como esperado, as taxas de clivagem e de produção de blastocistos não foram afetadas no estudo desenvolvido para testar as diferentes doses de forskolin, visto que os tratamentos foram feitos durante a etapa de cultivo do embrião, e não durante a maturação oocitária. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Paschoal et al. (2012), que relataram não haver diferenças entre as taxas de desenvolvimento de embriões que foram cultivados com ou sem 10 µM de forskolin durante 24 horas (46,8% com SFB e 33,3% sem soro). Da mesma forma, Sanches et al. (2013) não observaram diferenças nas taxas de produção de blastocistos após tratamento dos embriões com 10 µM de forskolin durante 48 horas (45,3%) em comparação com embriões não tratados (39,9%).

Por outro lado, a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* está diretamente relacionada com as condições de cultivo (RIZOS et al, 2003; LONERGAN et al., 2003). A adição de SFB no meio de cultura foi identificada como sendo o principal fator responsável pelas diferenças morfológicas (ABE et al., 1999b; PEREIRA et al, 2008) e fisiológicas do embrião, quando em comparação com embriões produzidos na ausência de SFB (RIZOS et al., 2003) ou em embriões produzidos *in vivo* (PASCHOAL et al., 2012). Algumas destas diferenças incluem o aumento do número e tamanho das gotículas lipídicas (ABE et al., 1999a; RIZOS et al., 2003) e

diferenças na qualidade dos embriões (FERGUSON; LEESE, 1999; PASCHOAL et al., 2012).

Para evitar o indesejável acúmulo de lípidos, vários estudos tentaram substituir o soro no meio de cultura (MINGOTI et al, 2009). No entanto, apesar de os seus potenciais efeitos prejudiciais sobre a qualidade embrionária (RIZOS et al., 2003), o soro contém substâncias que são benéficas para o desenvolvimento embrionário, tais como fatores de crescimento e agentes quelantes de metais pesados (STEIN, 2007). Por esta razão, tem sido difícil evitar ou encontrar um substituto adequado para o soro em formulações de meios de cultivo *in vitro*, particularmente para laboratórios que trabalham com finalidade comercial. Como o acúmulo lipídico tem sido associado frequentemente à perda de viabilidade embrionária e ao aumento das injúrias causadas pela criopreservação, neste experimento foi investigado o efeito da lipólise química com a utilização do forskolin, na tentativa de diminuir o acúmulo lipídico do citoplasma de embriões produzidos *in vitro*, na presença de SFB. Os resultados demonstraram redução significativa nos lipídios com a dose de 5,0 μM de forskolin.

Com relação ao ácido linoleico, testou-se sua efetividade na diminuição da concentração intracitoplasmática de embriões quando adicionado à maturação *in vitro* (efeito nos oócitos), quando adicionado ao cultivo *in vitro* (efeito nos embriões) ou quando adicionado à MIV e ao CIV (efeito nos oócitos e nos embriões). Devido ao fato de ter sido incluído na MIV (grupo LA MIV), foi testado seu efeito sobre a progressão da meiose, uma vez que resultados inconsistentes foram relatados sobre os efeitos da suplementação com LA em oócitos bovinos; embora Marei et al (2010) tenham relatado ausência de efeito sobre a maturação de oócitos incubados na presença de LA a 50 μM , Homma e Brown (1992) relataram que esta mesma concentração de LA teve efeito inibidor sobre a quebra da VG. Essa discrepância poderia ser explicada, em parte, por causa de diferentes condições experimentais e pela utilização de diferentes fontes de LA, já que Homa e Brown (1992) utilizaram o LA conjugado à albumina. Em nosso estudo, não foi utilizado LA conjugado à albumina e, portanto, nossos achados corroboram com os de Marei et al (2010), já que o LA em dose maior (100 μM) não interferiu na progressão da meiose.

Independente do momento da PIVE em que o LA foi adicionado ao meio, não houve alteração nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos. Da mesma forma, o desenvolvimento embrionário não foi afetado pela suplementação do meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos com a associação de forskolin e ácido linoleico. Desta forma, os resultados do presente estudo corroboram com as evidências relatadas por Rizos et al. (2003) e Lonergan et al. (2003), que sugerem que a qualidade intrínseca do oócito, mas não o ambiente de cultivo pós-fecundação, é o fator chave para determinar a proporção de oócitos que se desenvolvem até o estágio de blastocisto. Por outro, como proposto por estes autores, o ambiente de cultivo pós-fecundação tem efeito determinante na qualidade dos embriões, o que foi avaliado no presente estudo pela concentração de lipídios intracelulares e criotolerância dos embriões produzidos, não foram diferentes entre os tratamentos.

Embora alguns estudos já tenham sido desenvolvidos visando avaliar os efeitos lipolíticos do forskolin, ainda não está estabelecido o melhor protocolo, incluindo a dose mais efetiva e a duração do tratamento. Em estudo de Paschoal et al. (2012), não foi observado efeito do tratamento com forskolin na dose de 10,0 μM durante 24 horas sobre a taxa de sobrevivência embrionária pós-vitrificação em comparação com embriões produzidos *in vivo*. Da mesma forma, Sanches et al. (2013) não observaram diferença entre as taxas de re-expansão da blastocle e eclosão dos embriões expostos a 10,0 μM de forskolin durante 48 horas (87,5% e 70,5%, respectivamente), em comparação com os embriões que não foram tratados com o agente lipolítico antes de vitrificação (79,2% e 63,3%, respectivamente). Desta forma, a condição estabelecida no presente estudo (dose de 5,0 μM de forskolin durante 24 horas antes da vitrificação) demonstrou ser mais efetiva do que aquelas propostas nos estudos anteriores. A diminuição da dose efetiva pode ser benéfica, uma vez que, como anteriormente citado, o forskolin estimula a lipólise através da ativação da adenilato ciclase, aumentando os níveis de AMPc e a ativação de lipases (HONNOR et al., 1985; LAFONTAN; BERLAN, 1993). Uma vez que os efeitos do AMPc são inespecíficos, já que regula distintas funções fisiológicas (SEAMON et al., 1981; HO; SHI, 1982; EK et al., 1997; ARRESE et al., 1999), é possível que o forskolin possa induzir efeitos sobre as células embrionárias que são

ainda desconhecidos (SANCHES et al.; 2013). Embora os resultados do presente estudo tenham demonstrado a efetividade de menores concentrações de forskolin sobre a lipólise, mais estudos são necessários visando a avaliação dos efeitos desta droga sobre o metabolismo ou a expressão genômica e proteômica do embrião. De toda maneira, como esperado, o uso do forskolin melhorou os resultados de sobrevivência embrionária após desvitrificação, como consequência da diminuição do teor de lipídios intracitoplasmáticos. Esses achados confirmam que a utilização de agentes lipolíticos é uma estratégia valiosa para melhorar a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, visando a produção de blastocistos com maiores taxas de sobrevivência pós-criopreservação.

Da mesma forma, a adição de LA em diferentes momentos da PIVE promoveu a diminuição na quantidade de lipídios nos embriões, corroborando com os resultados obtidos pela equipe de Pereira (2007, 2008), que relatou que a suplementação com LA diminuiu significativamente a quantidade de lipídios acumulados no citoplasma de blastocistos, o que refletiu no aumento da sobrevivência após a criopreservação. Adicionalmente, Hochi et al. (1999) produziram mórulas bovinas mais resistentes à criopreservação após adicionar ácido linoleico conjugado à albumina ao meio de cultivo *in vitro*. Porém, contrariamente ao esperado, a diminuição na quantidade de lipídios observada nos embriões tratados com LA durante o CIV não ocasionou, no presente estudo, melhora na sobrevivência de embriões vitrificados após o aquecimento. Estes achados são contrários aos resultados de Accorsi (2008), Tominaga et al. (2000) e Accorsi et al. (2015) que observaram que a adição de LA ao meio de cultivo aumentou a taxa de criotolerância. Este efeito seria esperado, pois o ácido linoleico é capaz de reduzir o conteúdo lipídico total presente nos embriões, como também a quantidade de lipídios em diferentes tipos celulares atuando, principalmente, na redução da captação e da síntese de ácidos graxos (LOOR; HERBEIN, 1998; BAUMGARD et al., 2000; BROWN et al., 2001; PARIZA et al., 2001). Acredita-se que os mecanismos moleculares envolvidos na redução da síntese lipídica incluam uma diminuição coordenada na expressão de RNAm de importantes enzimas lipogênicas associadas às rotas de síntese de gordura (BAUMGARD et al.; 2002; GERVAIS et al., 2009). As diferenças atribuídas aos achados do presente estudo e do estudo de

Accorsi et al. (2015) podem ser explicadas pelas diferenças metodológicas, pois estes autores utilizaram meio semi-definido e atmosfera controlada, diferentemente de nossa proposta.

Já a suplementação do meio com LA associado ao forskolin durante o cultivo *in vitro* foi parcialmente eficaz para promover a redução do conteúdo lipídico intracitoplasmático, que foi semelhante ao do grupo tratado com forskolin, porém não diferiu do grupo controle. No entanto, não foram observadas diferenças na taxa de sobrevivência pós reaquecimento dos embriões deste grupo.

Outros aspectos analisados neste estudo para determinação da qualidade embrionária foram a ocorrência de apoptose e a função mitocondrial, não sendo observada diferença entre os tratamentos propostos. A apoptose é um fenômeno fisiológico que ocorre durante a embriogênese e tem o propósito de eliminar danos e células não viáveis que podem vir a comprometer o desenvolvimento do embrião (FEUGANG et al., 2004). A mitocôndria tem papel crucial no equilíbrio entre a prevenção e indução da apoptose mediante liberação do citocromo C e fator indutor de apoptose (AIF), que ativam as pró-caspases 2, 3 e 9 (SHCHEPINA, 2002). A família de genes Bcl-2 é uma das vias que atua na regulação da resposta apoptótica, sendo que suas proteínas podem inibir ou propagar o processo apoptótico (AFFORD; RANDHAWA, 2000). Resumidamente, a Bcl-2 previne a apoptose através da manutenção do potencial de membrana mitocondrial e, conseqüentemente, inibe a liberação do citocromo C. A BAX por sua vez, altera o potencial de membrana mitocondrial com conseqüente liberação do citocromo C e ativação das caspases 9 e 3, culminando com a apoptose celular (YANG; RAJAMAHENDRAN, 2002). Neste contexto, o potencial de membrana mitocondrial é utilizado como indicador de atividade mitocondrial e pode auxiliar na compreensão de processos fisiológicos e patológicos nos quais a função mitocondrial está envolvida (VANBLERKOM et al., 2003). Desta forma, os tratamentos propostos neste estudo mantiveram a qualidade e viabilidade embrionária, como era o desejado.

Foi observado, no presente estudo, o aumento no número de células totais e, conseqüentemente, do diâmetro dos embriões tratados com forskolin na dose de 5,0 µM. Paschoal (2013) também observou aumento no número de células, porém na

dose de 2,5 μ M, diferente do observado por Barceló-Fimbres e Seidel Jr. (2007) e Cuello et al. (2013), que não encontraram diferenças no total de células quando utilizaram o etosulfato de fenazina e o forskolin para reduzir a quantidade lipídica. Já com relação ao LA, o aumento no número de células não foi observado, similarmente ao encontrado por outros autores (TOMINAGA et al., 2000).

Resultados do presente estudo mostram que é possível obter aceitável índice de concepção (57,9%) ao se transferir embriões bovinos produzidos *in vitro*. Contudo, esse percentual reflete o atual estágio de desenvolvimento da técnica de PIVE e corresponde a um índice bem inferior aos obtidos com embriões oriundos de TE, cujos resultados giram ao redor de 70-80% para embriões transferidos a fresco e de 40-50% para os criopreservados (GREVE et al. 1993). A viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* é inferior aos obtidos através de TE (GREVE, 1992; GREVE et al. 1993) e isso provavelmente acontece devido às alterações morfo-funcionais que ocorrem em decorrência das condições *in vitro* (AVERY; GREVE, 1995).

A taxa de concepção dos embriões transferidos a fresco (57,9%) foi superior a dos embriões desvitrificados (21,7%), todavia isso era esperado pois este achado pode ser observado no campo com frequência (relato pessoal), já que a vitrificação pode ser considerada uma potente causadora de danos físicos, químicos e térmicos que podem aumentar a apoptose em blastocistos (SUDANO et al., 2011).

Com relação à taxa de concepção após transferência de embriões, não houve interferência da adição do forskolin ao meio de cultivo *in vitro* (30,77%), concordando com os dados obtidos por Sanches et al. (2013), que obtiveram 48,8% de concepção nos embriões tratados com forskolin.

A interrupção da gestação, em bovinos, é maior durante o período embrionário, ou seja, da concepção à organogênese (dia 1 a 42), do que durante os períodos fetal (término da diferenciação dos órgãos - dia 42 a 280) ou neonatal, que se estende do parto até o dia 28 após o mesmo (HUBBERT, 1974; FARIN et al., 2006). Em embriões produzidos *in vitro*, as taxas de perdas embrionária, fetal e perinatal são maiores do que as observadas em programas de inseminação artificial e transferência de embriões produzidos *in vivo* (LONERGAN et al., 2007). Índices de abortos entre 9 e 47% têm sido relatados (DAVIS et al., 1989; REICHENBACH et al.,

1992; MASSIP et al., 1995a; REINDERS et al., 1995) no primeiro e segundo trimestre de prenhez de embriões produzidos *in vitro*, o que discorda dos resultados do nosso trabalho onde foi observada a ocorrência de 3,25% de abortos. Allen (1997) menciona índices de 26 a 40% de morte embrionária precoce (MEP), representando 60 a 80% do total de perdas de gestações, o que discorda dos achados do presente estudo, onde foi observada 3% de MEP nos embriões produzidos *in vitro* transferidos a fresco e 17% de MEP nos embriões aquecidos. Em programas de PIVE, a prevalência de natimortos e de morte neonatal varia de 2,4% a 15,6% em novilhas e 17,9% em vacas (FARIN et al., 2006). Segundo Boyd et al. (1969); Kastelic (1996) e Vasconcelos et al. (1997), ao redor de 8% de gestações terminam em perda fetal, discordando dos dados obtidos neste presente trabalho, onde foi observada uma taxa de natimortos de 5,6% em vacas. A morte perinatal é atribuída, em parte, como consequência das distocias associadas ao tamanho elevado dos fetos. Além disso, o aumento da duração da gestação, o desenvolvimento insuficiente e inadequado funcionamento da placenta e as falhas nos mecanismos metabólicos necessários para a vida extra-uterina são considerados problemas que diminuem a viabilidade dos neonatos (FARIN et al., 2006).

A determinação do sexo fetal tem diversas implicações na indústria animal (RIBADU; NAKAO, 1999). Exames mais tardios, ao redor de 90 dias, dificultam a determinação do sexo e aumentam as chances de erro de diagnóstico. No presente trabalho com exame ao redor dos 60 dias, obteve-se 100% de acertos nos diagnósticos, diferente dos resultados de Stroud (1996), que obteve 3,0% de erros, e de Barros e Visintin (2001), que relataram erros da ordem de 2,4 e 3,9%.

A distribuição de sexos de bezerros produzidos através de inseminação artificial tem sido relatada ser ao redor de 1:1, com 52,9% de machos e 47,1% de fêmeas (FOOTE, 1975). Essa tendência também prevalece entre embriões e bezerros produzidos em programas de TE (KING et al., 1991; KING et al., 1995). Contudo, a proporção de sexos de bezerros resultantes de embriões produzidos *in vitro* difere dessa esperada relação (VAN SOOM; DE KRUIF, 1992; MASSIP et al., 1995b; HASLER et al., 1995; KOCHHAR et al., 2001). Avelino et al. (2002) realizaram um experimento de aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e PIVE

em vacas de diversas raças e, por meio da sexagem fetal, diagnosticou-se uma incidência de 64% de machos; o mesmo foi observado no presente trabalho, onde foi observada uma diferença na proporção de machos e fêmeas de 62% e 38%, respectivamente. O mecanismo utilizado para explicar a desigual distribuição de machos e fêmeas, a partir de embriões bovinos produzidos *in vitro*, envolve fatores que possam favorecer o espermatozóide que carrega o cromossomo Y, antes da fertilização e suporte preferencial, pós-fertilização, ou uma seletiva vantagem de embriões machos sobre embriões fêmeas sob condições *in vitro* (KOCHHAR et al., 2001; KOCHHAR et al., 2003). Gutierrez-Adan et al. (2001) também relataram que o meio SOF com soro fetal não somente acelera o desenvolvimento, mas também incrementa a sobrevivência de blastocistos machos.

Desde o início da década de 90 foi observado que embriões bovinos produzidos *in vitro* resultavam em nascimentos de animais de tamanho incomum (YOUNG et al., 1998; BERTOLINI; ANDERSON, 2002). Como uma população, a distribuição do peso corporal de fetos e neonatos derivados da PIVE possui um deslocamento para direita na curva normal de peso ao nascer (FARIN et al., 2006), ou seja, o peso médio desses fetos está acima do limite máximo do peso considerado normal (BERTOLINI; ANDERSON, 2002). Considerando que as alterações no desenvolvimento ocorrem em apenas uma parte dos fetos derivados do sistema *in vitro*, pode-se concluir que aqueles animais que não são considerados “grandes” apresentam-se normais quanto ao seus desenvolvimentos. No presente experimento, a adição de forskolin não alterou o peso ao nascimento dos animais, somente foi observado diferença de peso nos bezerros machos, que apresentaram, em média, 1,8 kg a mais do que as fêmeas.

Desta forma, os resultados encontrados no presente estudo permitem concluir que o tratamento com forskolin na concentração de 5,0 μ M durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos foi eficiente para proporcionar a redução da quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos e, conseqüentemente, melhorar a criotolerância. Todavia, isto não acarretou em melhorias nas taxas de concepção, bem como não afetou o peso dos bezerros nascidos.

8. CONCLUSÃO

Em face dos resultados obtidos, conclui-se que:

- o forskolin, na dose de 5,0 μ M, 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.; CHARPIGNY, G.; KODJA, S.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; MERMILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C. Differences in lipids composition between *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 53, 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.

ACORSI, 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.

ACCORSI, 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 embrionic 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.181-187, 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 lipogenesis 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 phosphatidylethanolamines 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 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.

FEUGANG, J. M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of β -Mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by 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.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, 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. **Biosíntese 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. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related 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 delipation 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. Criopreservation of mammalian embryos and oocytes: recente advances. **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 developmentally 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 médium during early embryonic development. **Journal Reproduction Development**, v. 45, p. 97-103, 1999.

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

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 curvival 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**, 4ª 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 sensivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 271–278, 2002.