

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

EFEITO DA MODULAÇÃO DA ACIL-COA SINTETASE DE CADEIA
LONGA NO DESENVOLVIMENTO, QUALIDADE E
CRITOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN*
VITRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RONIELE SANTANA VALENTE

Uruguaiana
2019

RONIELE SANTANA VALENTE

**EFEITO DA MODULAÇÃO DA ACIL-COA SINTETASE DE CADEIA
LONGA NO DESENVOLVIMENTO, QUALIDADE E
CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mateus José Sudano.

**Uruguaiana
2019**

RONIELE SANTANA VALENTE

**EFEITO DA MODULAÇÃO DA ACIL-COA SINTETASE DE CADEIA
LONGA NO DESENVOLVIMENTO, QUALIDADE E
CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN
VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.
Área de concentração: Fisiologia/Ciências Biológicas II.
Linha de Pesquisa: Fisiologia Endócrina (Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução).

Dissertação defendida e aprovada em 14 de março de 2019.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mateus José Sudano
Orientador
Universidade Federal do ABC

Prof. Dr^a. Francielli Weber Santos Cibirin
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr^a. Vanusa Manfredini
Universidade Federal do Pampa

Dedico este título aos meus pais, Neida e Rogério, minha irmã Gabriela e ao meu esposo Thales.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e me manter sempre firme nos meus propósitos, principalmente nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais Neida e Rogério, e minha irmã Gabriela, por serem a base da minha caminhada desde o início e por acreditarem tanto em mim.

Ao meu esposo Thales, por ser o maior incentivador dos meus estudos e sempre apoiar as minhas escolhas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mateus J. Sudano, por acreditar no meu potencial desde o início da graduação e por toda a atenção e especial dedicação com seus alunos.

A Unipampa, por ser a instituição que me acolheu no início da minha vida acadêmica e ao PMPGCF pela oportunidade de seguir neste caminho.

Aos colegas do LabGen e pesquisadoras da *In Vitro Brasil* pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, vocês foram essenciais.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida durante o período de mestrado acadêmico.

A todos os amigos que torceram para que este dia chegasse.

Obrigada!

RESUMO

Efeito da modulação da Acil-CoA sintetase de cadeia longa no desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem contribuído expressivamente na exploração do potencial de animais geneticamente superiores e no aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos, concedendo ao Brasil posição de destaque frente aos demais países. No entanto, apesar de consolidada, a técnica ainda apresenta alguns desafios como a reduzida sobrevivência dos embriões PIVE após a criopreservação. Um dos fatores apontados como cruciais neste aspecto é o elevado conteúdo lipídico destes embriões quando comparado aos seus homólogos *in vivo*. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* após suplementação do meio de cultivo com moduladores da Acil-CoA sintetase de cadeia longa, uma família de enzimas que participa diretamente na ativação dos ácidos graxos. Os embriões foram cultivados divididos em quatro grupos: suplementação positiva (ACS+) com GW3965 hydrochloride, suplementação negativa (ACS-) com Triacsin C, associação de ambos moduladores (ACS±) e controle. Não houve diferença ($P > 0,05$) nas taxas de produção entre os diferentes grupos. O conteúdo lipídico citoplasmático demonstrou-se aumentado ($P < 0,05$) em ACS+ e reduzido ($P < 0,05$) em ACS- em relação ao grupo controle, enquanto que o perfil de fosfolípidos de membrana não foi alterado pelos tratamentos. O número total de blastômeros não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$), no entanto, o maior número de células apoptóticas foi encontrado em ACS- quando comparado ao grupo controle. Após vitrificação, as taxas de re-expansão não diferiram ($P > 0,05$) 12 h após recultivo. Às 24 h, embriões de grau I de qualidade apresentaram as melhores taxas de eclosão nos grupos ACS+ e controle, sendo que às 48 h o grupo ACS+ igualou as taxas de eclosão de seus embriões de graus I, II e III. A abundância relativa do nível de transcritos gênicos associados ao metabolismo lipídico (*ACSL3*, *ACSL6*, *ACAT1*, *SCD* e *AUH*), choque térmico (*HSP90AA1* e *HSF1*), estresse oxidativo (*GPX4*), angiogênese (*VEGF*), dentre outros genes importantes para o desenvolvimento embrionário, foi afetada por pelo menos um dos tratamentos. Deste modo, identificou-se a efetividade dos tratamentos na modulação do nível de transcritos gênicos de membros da família da Acil-Coa sintetase de cadeia longa e no conteúdo lipídico citoplasmático. A modulação negativa de ACS- e a consequente redução no conteúdo lipídico

não foram eficazes no aumento da criotolerância embrionária enquanto que ACS+ restaurou as taxas de sobrevivência após a vitrificação de embriões com baixa qualidade tornando-as equivalentes aos embriões de excelente qualidade.

ABSTRACT

Effect of modulation of long chain Acil-CoA synthetase on the development, quality and cryosurvival of *in vitro* produced bovine embryos

In vitro embryo production (PIVE) has significantly contributed to the exploitation of the potential of genetically superior animals and to the increase of the reproductive efficiency of the herds, giving Brazil a prominent position in comparison to the other countries. However, despite being consolidated, the technique still presents some challenges such as the reduced survival of the PIVE embryos after freezing. One of the factors identified as crucial in this regard is the high lipid content of these embryos when compared to their *in vivo* counterparts. In this sense, the objective of this work was to evaluate the development of bovine embryos produced *in vitro* after supplementation of the culture medium with long chain Acil-CoA synthetase modulators, a family of enzymes that participate directly in the activation of fatty acids. The embryos were cultivated divided into four groups: positive supplementation (ACS +) with GW3965 hydrochloride, negative supplementation (ACS-) with Triacsin C, association of both modulators (ACS ±) and control. There was no difference ($P > 0.05$) in production rates among the different groups. The cytoplasmic lipid content was increased ($P < 0.05$) in ACS + and reduced ($P < 0.05$) in ACS- in relation to the control group, whereas the membrane phospholipid profile was not altered by the treatments. The total number of blastomers did not differ between groups ($P > 0.05$), however, the highest number of apoptotic cells was found in ACS- when compared to the control group. After vitrification, re-expansion rates did not differ ($P > 0.05$) 12 h after recultivation. At 24 h, quality I embryos showed the best hatched rates in the ACS + and control groups, and at 48 h the ACS + group equaled the hatched rates of their embryos of grades I, II and III. The relative abundance of the level of gene transcripts associated with lipid metabolism (ACSL3, ACSL6, ACAT1, SCD and AUH), thermal shock (HSP90AA1 and HSF1), oxidative stress (GPX4), angiogenesis (VEGF), among other genes important for development embryo was affected by at least one of the treatments. Thus, the effectiveness of the treatments in modulating the level of gene transcripts of members of the long-chain Acil-Coa synthetase family and in the cytoplasmic lipid content was identified. The negative modulation of ACS- and the consequent reduction in lipid content were not effective in increasing embryonic cryotolerance, whereas ACS + restored survival rates after vitrification of embryos with low quality, making them equivalent to the embryos of excellent quality.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. CAPÍTULO I.....	14
2.1 Revisão bibliográfica.....	14
2.1.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões	14
2.1.2 Competência e qualidade embrionária	16
2.1.3 Lipídeos embrionários	20
2.1.4 Criopreservação de embriões.....	22
2.2 Objetivos	25
2.2.1 Objetivo geral	25
2.2.2 Objetivos específicos.....	25
2.3 Hipótese	25
3. CAPÍTULO II	26
3.1 Artigo científico	26
4. CONCLUSÃO	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

O setor agropecuário brasileiro historicamente mantém-se como uma das principais atividades econômicas no cenário nacional e conseqüentemente destaca-se a nível mundial, com expressiva exportação de produtos oriundos de produção agrícola e pecuária, contribuindo ainda para o abastecimento e ocupação de mão de obra da população. A grande extensão de terras e as condições naturais favorecem a expansão das atividades de bovinocultura no país que em 2017 alcançou um efetivo de 214,9 milhões de cabeças (IBGE, 2018).

Com o aumento da competitividade do mercado, tornou-se indispensável a busca pela eficiência produtiva e reprodutiva da bovinocultura brasileira. Neste contexto, o uso de biotécnicas aplicadas à reprodução vem ganhando destaque no âmbito comercial, visto que estas possibilitam uma maximização do potencial reprodutivo de animais selecionados, diminuindo o intervalo de tempo entre gerações, além de contribuírem nos programas de seleção e melhoramento genético animal.

As técnicas de transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE) conferem ao Brasil posição de destaque diante dos demais países. De acordo com Viana (2018) o país foi responsável pela produção de cerca de 375.000 embriões no ano de 2017, representando cerca de 30% da produção mundial. A produção de embriões *in vitro* segue sendo a técnica de eleição, correspondendo a 92,0% do total de embriões gerados. A maioria dos embriões produzidos *in vitro* ainda é transferida a fresco, porém o percentual de congelados (33,7%) segue tendência de crescimento. No caso dos embriões produzidos *in vivo*, o congelamento é a opção preferencial (62,1% do total).

Quando comparados a embriões produzidos *in vivo*, embriões PIVE ainda apresentam menor qualidade e resistência, o que pode ser atribuído as condições de cultivo embrionário (Dode *et al.*, 2013). Um dos principais desafios a serem vencidos para uma maior expansão da PIVE é a maior sensibilidade deste embriões aos procedimentos de congelamento. Desta forma, o estudo da fisiologia do desenvolvimento e o iminente aprimoramento das técnicas laboratoriais empregadas na PIVE tornam-se cruciais para o sucesso desta biotécnica de modo que melhores resultados sejam alcançados.

No decorrer dos últimos anos, ficou claramente demonstrada a existência de diferenças morfológicas e metabólicas de embriões PIVE em relação aos seus homólogos produzidos *in vivo*. Dentre estas diferenças destaca-se um maior conteúdo lipídico citoplasmático, comumente associado a menores taxas de sobrevivência embrionária após o congelamento (Abe *et al.*,

2002) e desvios na abundância relativa de transcritos genéticos importantes para o desenvolvimento embrionário e estabelecimento da gestação (Sudano *et al.*, 2014).

O mecanismo pelo qual embriões PIVE acumulam um maior conteúdo lipídico ainda permanece pouco esclarecido, porém comumente associa-se este aumento com a suplementação dos meios de desenvolvimento embrionário com soro fetal bovino (SFB), utilizado como fonte proteica. Neste sentido, diversas alternativas já foram propostas com o intuito de reduzir o conteúdo lipídico embrionário como remoção e/ou substituição do SFB dos meios de cultivo (Block *et al.*, 2010; Sudano *et al.*, 2011), centrifugação e micromanipulação dos embriões (Ushijima *et al.*, 1999) e adição de delipidantes ao meio de cultivo (Held-Hoelker *et al.*, 2017; Panyaboriban *et al.*, 2018).

A participação dos ácidos graxos na maioria das vias metabólicas, incluindo a β -oxidação e a biossíntese de lipídios complexos (como triacilgliceróis e fosfolípidos), requer sua ativação inicial pela adição de um grupo CoA (Weedon-Fekjaer *et al.*, 2010) resultando na formação de acil-CoA, reação catalisada pela acil-CoA sintetase (ACS) (Soupene e Kuypers, 2008). A Acil-Coa sintetase de cadeia longa é uma das subfamílias da ACS, a qual possui cinco genes identificados com base na homologia de suas sequências, sendo chamados *ACSL1* e *ACSL3* até *ACSL6*, diferidos quanto a sua distribuição tecidual e intracelular.

Triacsin C é um regulador metabólico fúngico que atua como inibidor seletivo competitivo das *ACLS 1, 3 e 4* (Van Horn *et al.*, 2005) inibindo quase completamente a *síntese de novo* de triacilglicerol e fosfolípideo a partir de glicerol em fibroblastos humanos (Igal *et al.*, 1997). Já o GW3965 hydrochloride é capaz de induzir um aumento na expressão de *ACSL3* hepático em hamsters (Dong *et al.*, 2013) e em células do trofoblasto da placenta de humanos (Weedon-Fekjaer *et al.*, 2010). Aparentemente, até o momento não há relatos da ação destes compostos sobre o desenvolvimento embrionário.

Diante do contexto supracitado, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo de desenvolvimento de embriões bovinos com GW3965 hydrochloride e Triacsin C, moduladores positivo e negativo da Acil-Coa sintetase de cadeia longa, respectivamente, analisando-se os seguintes parâmetros: produção embrionária, criotolerância, acúmulo e perfil lipídico, expressão gênica e viabilidade celular.

2. CAPÍTULO I

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões é uma importante ferramenta reprodutiva capaz de formar novos indivíduos através de técnicas laboratoriais que possibilitam uma interação entre oócitos e espermatozoides fora do trato reprodutivo de uma fêmea. A técnica apresenta-se como uma estratégia para obtenção de embriões que podem ser destinados à pesquisa básica e estudo da fisiologia do desenvolvimento embrionário (Rocha-Frigoni *et al.*, 2014), bem como utilizados em escala comercial como forma de exploração do potencial genético de fêmeas selecionadas aumentando a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

O primeiro relato de um mamífero oriundo de PIVE foi registrado em 1959 com o nascimento de um coelho originado de um oócito após FIV (Chang, 1959). Em relação aos animais de produção, o primeiro registro acerca da possibilidade de maturação e fecundação *in vitro* de oócitos bovinos foi ao final dos anos de 1970 e já em 1982 houve o nascimento do primeiro bezerro produzido por fecundação *in vitro* nos Estados Unidos (Brackett *et al.*, 1982). Com a confirmação da viabilidade da técnica poder ser desenvolvida totalmente sob condições laboratoriais, a PIVE recebeu grande impulso. No Brasil a PIVE teve início nos anos de 1990 e desde então o país vem se destacando internacionalmente, sendo responsável por produzir cerca de 345.000 embriões PIVE no ano de 2017 (Viana, 2018) o que representa aproximadamente 60% do total mundial. Tal sucesso está diretamente associado ao maior número de folículos ovarianos encontrados através de aspiração folicular guiada por ultrassonografia em fêmeas bovinas *Bos indicus* (zebuínas), as quais representam cerca de 80% do rebanho brasileiro (Pontes *et al.*, 2010).

Dentre as vantagens da PIVE estão a possibilidade de obtenção de embriões viáveis de fêmeas de alto valor genético saudáveis e inclusive de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes de forma natural. Além disso, fêmeas até o terceiro mês de gestação e a partir dos seis meses de idade podem ser doadoras de oócitos na PIVE (Mello *et al.*, 2016) sendo dispensada a utilização de hormônios. No entanto, apesar de todo o avanço já obtido e dos esforços para o aprimoramento desta biotecnologia, a PIVE ainda apresenta eficiência relativamente reduzida. De acordo com Sirard *et al.* (2006) apenas 30-40% dos oócitos que

passam pelas etapas de maturação, fecundação e cultivo desenvolvem-se até o estágio de blastocisto com índices de gestação em torno, também, de 40%. Esses resultados provavelmente se devem às diferenças em várias características observadas entre os embriões produzidos *in vitro* e os produzidos *in vivo* (Neves *et al.*, 2010). Desta forma, o estudo da fisiologia do desenvolvimento e o consequente aprimoramento das técnicas laboratoriais empregadas na PIVE tornam-se cruciais para o sucesso desta biotécnica de modo que melhores resultados sejam alcançados.

Modificações nas diferentes etapas da PIVE já foram empregadas na tentativa de se obter melhorias na produtividade e na qualidade embrionária. O microambiente onde serão mantidos os oócitos e futuros embriões deve ser adequado e oferecer as condições mínimas necessárias para dar suporte as necessidades metabólicas de cada fase de desenvolvimento. A maturação *in vitro* (MIV) envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito, para que este possa ser fecundado e, posteriormente, se desenvolver até o estágio de blastocisto (Mello *et al.*, 2016). O bloqueio temporário da retomada da meiose tem sido testado em alguns trabalhos (Farghaly *et al.*, 2015; Maziero *et al.*, 2016) como forma de garantir uma melhor sincronia entre maturação nuclear e citoplasmática de modo a preparar por completo o oócito para a fecundação. Sabe-se ainda que oócitos de baixa qualidade (com 1-2 camadas de células do cúmulo) geralmente possuem baixa competência e desenvolvimento meiótico. Lin *et al.* (2018) testaram o efeito combinado da utilização de um agente antioxidante durante o prolongamento da MIV e observaram melhora na qualidade e no desenvolvimento de oócitos de baixa qualidade devido à diminuição na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), apoptose e danos no DNA.

A capacitação espermática ocorre pela remoção dos fatores descapacitantes presentes no plasma seminal, basicamente proteínas e outras substâncias que recobrem a membrana do espermatozoide (Varago *et al.*, 2008). Os diferentes métodos de seleção espermática utilizados na PIVE tem por objetivo a remoção do plasma seminal e de crioprotetores bem como a seleção de espermatozoides viáveis. Dentre os mais utilizados estão o gradiente descontínuo de Percoll, a migração ascendente (*Swin up*) e a lavagem por centrifugação, sendo o gradiente de Percoll o mais utilizado comercialmente (Gonçalves *et al.*, 2008). Em um estudo realizado por Dode *et al.* (2002), os três métodos acima citados foram comparados em relação as taxas de fecundação e tempo de co-cultivo dos oócitos e espermatozoides. Os resultados mostraram não haver influência do método utilizado para seleção espermática na taxa de clivagem embrionária, no entanto, para qualquer um desses o período de co-cultivo que apresentou melhores taxas foi entre 12-18 horas de incubação.

Embora muitos avanços tenham ocorrido, alterações na composição dos meios de cultura utilizados para o desenvolvimento embrionário ainda são as principais estratégias empregadas atualmente na tentativa de aumentar a qualidade e a viabilidade embrionária. Em grande parte, as modificações são realizadas na etapa de cultivo *in vitro* (CIV), momento crucial e decisivo para a formação de embriões de qualidade e além disso, a eficiência das etapas de maturação e fecundação *in vitro* não difere significativamente daquela obtida *in vivo* (Mello *et al.*, 2016). Tradicionalmente, a variável utilizada para a avaliação da eficiência de um sistema de PIVE é a taxa de embriões produzidos durante o CIV. Desta forma, é necessário que o meio onde ocorrerá o desenvolvimento embrionário seja capaz de suprir as necessidades metabólicas do embrião. O meio de CIV mais comumente utilizado é composto por SOF, suplementado com aminoácidos, albumina sérica bovina (BSA - meio semidefinido) e/ou soro fetal bovino (SFB - meio indefinido) (Rocha-Frigoni *et al.*, 2014).

O uso do SFB como fonte proteica no meio de cultivo já foi considerado responsável por causar anormalidades fetais como o gigantismo (síndrome do terneiro grande) causando distocias (Gonçalves *et al.*, 2008). Apesar de a sua utilização proporcionar maiores taxas de produção de blastocistos quando comparados a sistemas sem a sua presença, alternativas como a remoção ou redução da concentração e a sua substituição por BSA (Murillo *et al.*, 2017) visam eliminar variações na concentração de ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas que estão presentes nos diferentes lotes de SFB afetando os resultados de produção. Adicionalmente, o uso do SFB está relacionado com um maior acúmulo lipídico em embriões PIVE. Neste sentido, diversos estudos indicam o acréscimo de delipidantes ao meio de cultivo como uma opção para redução de gotículas lipídicas (Held-Hoelker *et al.*, 2017; Knitlova *et al.*, 2017). Portanto, vale ressaltar que a PIVE tornou-se uma das principais biotécnicas reprodutivas mundiais com destaque para o Brasil, dentro de um período relativamente curto de tempo, o que foi em grande parte possibilitado pelas inúmeras pesquisas desenvolvidas a fim de melhorar a produção e a qualidade embrionária.

2.1.2 Competência e qualidade embrionária

Ao longo das últimas décadas, muitos esforços tem sido concentrados na tentativa de aprimorar os protocolos já existentes de PIVE, de modo que os embriões produzidos alcancem taxas satisfatórias de sobrevivência quando submetidos à transferência para fêmeas receptoras ou a outras biotécnicas laboratoriais. No decorrer dos últimos anos, ficou claramente

demonstrada a existência de diferenças morfológicas e metabólicas de embriões PIVE em relação aos seus homólogos produzidos *in vivo*. Por este motivo, a utilização de testes e análises que predizem a qualidade embrionária no período inicial de desenvolvimento, anteriormente a sua transferência, tornou-se uma ferramenta capaz de avaliar não somente a qualidade do próprio embrião, como também a eficiência do sistema de PIVE como um todo.

A avaliação morfológica dos embriões através de um estereomicroscópio ainda é o método de eleição no momento da classificação de embriões viáveis e não viáveis. A praticidade e a rapidez otimizam a técnica, no entanto, por ser uma avaliação individual e subjetiva é passível de falhas, além de haver variação na avaliação de diferentes profissionais. Tradicionalmente a classificação dos embriões segue a metodologia proposta por Stringfellow e Seidel (1998), na qual os embriões são divididos em graus de qualidade que variam de um (embrião excelente e indicado para comércio internacional) a quatro (embrião degenerado, inviável).

A avaliação da cinética de desenvolvimento embrionário também tem sido utilizada como uma ferramenta para identificação do perfil metabólico dos embriões. Em um estudo desenvolvido por Milazzotto *et al.* (2016) foram comparados os perfis de expressão gênica de embriões bovinos classificados em três grupos: embriões produzidos *in vitro* apresentando desenvolvimento rápido (ao menos 4 células às 21h pós cultivo), lento (2-3 células às 21h pós cultivo) e embriões produzidos *in vivo*. Os autores encontraram um menor número de genes diferencialmente expressos (GDE) entre os blastocistos do grupo de divisão lenta e os produzidos *in vivo*, sugerindo que um perfil de clivagem mais lento pode estar mais próximo do que ocorre fisiologicamente, sendo estes embriões candidatos a possuir maior qualidade. Além disso, foram relacionados o perfil de expressão gênica e o metabolismo energético (piruvato e lactato) dos embriões, sugerindo que diferentes velocidades de clivagem podem estar relacionadas com diferentes perfis metabólicos.

No entanto, ainda com relação a classificação morfocinética, considerações diversas foram encontradas em estudos humanos. Hsieh *et al.* (2018) compararam os resultados obtidos após transferência de embriões humanos distribuídos em dois grupos, sendo estes, blastulação precoce (BP - embriões que apresentam formação da blastocele até 96 horas pós inseminação) e blastulação não precoce (BNP - embriões que apresentam formação da blastocele após 96 horas da inseminação). Neste caso, a transferência de embriões BP resultou em maiores taxas de gestação, implantação e menor número de abortos. Além disso, houve uma taxa de formação de blastocistos mais elevada nos embriões que apresentaram blastulação precoce.

A competência para sobreviver após a transferência pode ser um problema especial para embriões produzidos *in vitro*. As taxas de gestação após a transferência de embriões frescos são frequentemente mais baixas para vacas que recebem embriões produzidos *in vitro* do que para vacas que recebem embriões oriundos de protocolos de superovulação (Hansen *et al.*, 2009). Adicionalmente, é amplamente conhecido que embriões PIVE possuem menor capacidade de sobrevivência e desenvolvimento de gestação quando submetidos a técnicas de congelamento em comparação a embriões produzidos *in vivo* (Sudano *et al.*, 2014; Dos Santos-Neto *et al.*, 2017). A capacidade de re-expansão da blastocela e eclosão da zona pelúcida são os parâmetros que indicam a viabilidade embrionária e a capacidade de retomada do metabolismo após a criopreservação.

A contagem do número total de células tem sido utilizada como um importante parâmetro na avaliação da qualidade de embriões (Costa *et al.*, 2010). O desenvolvimento fetal normal é dependente do número de células totais do embrião, e o estabelecimento de uma proporção adequada entre massa celular interna (MCI) e trofoblasto é considerado essencial para assegurar a viabilidade embrionária (Lane e Gardner, 1997). Em um estudo de De La Fuente e King (1997), foi demonstrado que blastocistos bovinos derivados de PIVE possuem um menor número de blastômeros quando comparados ao seus homólogos *in vivo*, no entanto, uma proporção similar de células é alocada para a MCI mesmo entre blastocistos de espécies geneticamente divergentes. Um rápido procedimento de coloração de núcleos de células embrionárias foi descrito por Pursel *et al.* (1985), tal técnica envolve a coloração com Hoechst 33342, corante DNA específico, onde os núcleos dos embriões fluorescem brilhantemente quando examinados por microscopia de fluorescência imediatamente após a coloração ou após armazenamento prolongado.

Quando expostas a situações de estresse metabólico, as células desenvolvem mecanismos de autodefesa. A apoptose é um processo ativo cuja marca registrada é a autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido a ativação de proteases endógenas e pode ser comparada metaforicamente a um "suicídio celular" (Beatriz e Reason, 2001). A apoptose é considerada um componente vital de vários processos, incluindo renovação celular normal, desenvolvimento e funcionamento adequados do sistema imunológico, desenvolvimento embrionário e morte celular induzida por produtos químicos (Elmore, 2007). Apesar de ser um mecanismo de defesa, um desequilíbrio no número de células apoptóticas nos blastocistos pode levar à morte embrionária precoce ou a formação de anomalias fetais que acarretam em perda gestacional (Brill *et al.*, 1999). A reação de TUNEL, descrita originalmente por Gavrieli *et al.* (1992) permite a detecção *in situ* de células apoptóticas pela marcação de

extensa fragmentação de DNA oligonucleossômico gerada pela atividade de DNAase endógena durante o processo apoptótico (Gjørret *et al.*, 2003).

O sistema de PIVE apesar de bem estabelecido, ainda não é capaz de produzir embriões com a mesma qualidade e competência daqueles produzidos fisiologicamente. Em contraste, blastocistos produzidos *in vitro* exibem uma série de características associadas à criotolerância reduzida, como vacúolos nas células trofoblásticas, uma população esparsa de microvilosidades, uma rede muito reduzida de conexões intercelulares e um grande aumento no conteúdo lipídico (Lonergan *et al.*, 2001). De fato, diversos estudos associam a redução da criotolerância com o excesso de lipídeos embrionários. A técnica de coloração com o corante lipofílico Sudan Black B permite a avaliação do conteúdo lipídico celular, de modo que já foi utilizado com objetivo de avaliar a efetividade de modificações nos meios de desenvolvimento embrionários (Sudano *et al.*, 2011), flutuações no conteúdo lipídico oocitário ao longo do crescimento folicular (Annes *et al.*, 2018) e eficiência da suplementação de meios de cultivo com delipidantes (Meneghel *et al.*, 2017).

Durante a primeira semana de desenvolvimento embrionário além das divisões celulares, ocorrem demais eventos importantes para a formação de um embrião viável como a ativação do genoma (transição materno-zigótica) na fase de 8-16 células (Gonçalves *et al.*, 2008). Diversos estudos já propuseram que os níveis de expressão de mRNA de uma ampla variedade de genes podem ser usados como marcadores da qualidade do embrião, eficácia do meio de cultura e capacidade de sustentar uma gestação bem sucedida. Sudano *et al.* (2014) desenvolveram um estudo no qual foram avaliadas as expressões gênicas de blastocistos bovinos de fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*, produzidos *in vivo* e *in vitro*. Os resultados demonstraram que os níveis de transcritos gênicos foram afetados por subespécies (158 GDE) e origem (532 GDE) o que indica que o ambiente *in vitro* é capaz de acarretar em modificações no perfil transcricional embrionário. Adicionalmente, outras biotécnicas comumente utilizadas, como o congelamento de embriões através do método de vitrificação, também podem ser capazes de induzir o aparecimento de GDE quando comparados os perfis de embriões submetidos ou não à técnica (De Oliveira Leme *et al.*, 2016). A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) é uma ferramenta poderosa para análise e quantificação da expressão gênica. É vantajosa em comparação com o método tradicional de PCR baseado em gel, de modo que a expressão gênica pode ser visualizada em "tempo real" usando um computador durante a amplificação das sequências gênicas de interesse, com capacidade ainda de gerar resultados quantitativos com maior precisão (Thornton e Basu, 2015). A técnica representa uma ferramenta que pode ser utilizada para detecção dos níveis

transcricionais de genes de interesse que são sabidamente superexpressos em condições de maior qualidade embrionária e capacidade de estabelecimento e manutenção de gestação.

2.1.3 Lipídeos embrionários

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos demonstraram a existência de diferenças morfológicas e metabólicas de embriões PIVE em relação aos embriões produzidos fisiologicamente. Dentre estas diferenças destacam-se desvios na abundância relativa de transcritos gênicos importantes para o desenvolvimento embrionário e estabelecimento da gestação (Sudano *et al.*, 2014) e um maior conteúdo lipídico citoplasmático, comumente associado a menores taxas de sobrevivência embrionária após o congelamento (Abe *et al.*, 2002).

Os lipídeos estão presentes em todos os tecidos, são componentes estruturais e funcionais de membranas celulares mantendo sua fluidez além de atuarem como combustível metabólico no fornecimento de energia. Existem evidências de que ao menos quatro classes de lipídeos poderiam ser responsáveis por afetar a sobrevivência embrionária após a criopreservação: triglicerídeos (principalmente armazenado nas gotas lipídicas citoplasmáticas), ácidos graxos livres, colesterol e fosfolípidos (Sudano *et al.*, 2013), sendo os triglicerídeos os lipídeos predominantes no citoplasma de células de mamíferos (McKeegan e Sturme, 2011).

A participação dos ácidos graxos na maioria das vias metabólicas, incluindo a β -oxidação e a biossíntese de lipídios complexos (como triacilgliceróis e fosfolípidos), requer sua ativação inicial pela adição de um grupo CoA (Weedon-Fekjaer *et al.*, 2010) resultando na formação de acil-CoA, reação catalisada pela acil-CoA sintetase (ACS) (Soupene e Kuypers, 2008). A Acil-Coa sintetase de cadeia longa é uma das subfamílias da ACS, a qual possui cinco genes identificados com base na homologia de suas sequências, sendo chamados *ACSL1* e *ACSL3* até *ACSL6*, diferidos quanto a sua distribuição tecidual e intracelular.

O mecanismo pelo qual embriões PIVE acumulam um maior conteúdo lipídico ainda permanece pouco esclarecido, porém comumente associa-se este aumento com a suplementação dos meios de desenvolvimento embrionário com soro fetal bovino (SFB), utilizado como fonte proteica. Espera-se que o SFB forneça energia, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados, entretanto, a presença ou concentração destes componentes podem variar entre os diferentes lotes de produção (Mucci *et al.*, 2006) o que inviabiliza a

repetibilidade dos resultados de produção e qualidade embrionária. Acredita-se que as lipoproteínas presentes no soro possam ser absorvidas pelas células embrionárias (Sata *et al.*, 1999), que o SFB altera o funcionamento da β -oxidação mitocondrial (Abe *et al.*, 2002) ou ainda que uso de soro poderia promover a incorporação de ácidos graxos saturados e colesterol nas membranas celulares, tornando-as menos permeáveis, o que poderia explicar a maior suscetibilidade dos embriões à criopreservação (Barceló-Fimbres e Seidel Jr, 2007). Além disso, estudos demonstraram que a presença do SFB altera a cinética de desenvolvimento do embriões com um efeito bifásico onde inicialmente haveria um atraso nas primeiras divisões celulares (clivagens) e posteriormente uma aceleração do desenvolvimento até a formação da blastocele (Rizos *et al.*, 2002).

O SFB e albumina sérica bovina (BSA) são os suplementos proteicos mais utilizados durante a PIVE, contendo alto e baixo teor lipídico, respectivamente. Deste modo, diversos estudos já propuseram alternativas de alterações da presença e/ou quantidade destes compostos nos meios de produção a fim de se obter embriões de maior viabilidade. A qualidade dos oócitos influencia diretamente na qualidade do embrião que será produzido futuramente. Em um estudo desenvolvido por Del Collado *et al.* (2016) foi realizada uma comparação entre o conteúdo lipídico de oócitos maturados *in vivo*, *in vitro* na presença de SFB e *in vitro* na presença de BSA. Os resultados demonstraram que oócitos maturados na presença de SFB tiveram o conteúdo lipídico aumentado em 18 vezes quando comparados ao grupo com BSA, no entanto, a MIV provocou aumento de conteúdo lipídico mesmo na ausência de SFB. Os autores relatam ainda, que somente oócitos maturados *in vivo* mantiveram uma correlação entre o conteúdo lipídico e mitocôndrias ativas e sugerem a possibilidade de que durante a maturação fisiológica (*in vivo*), a síntese lipídica ocorre concomitantemente com o seu metabolismo por oxidação, impedindo o acúmulo excessivo de lipídios.

Durante a fase de cultivo embrionário, já foi demonstrado que a produção de embriões em meio definido (livre de SFB) pode resultar em taxas de produção equivalentes às obtidas na presença do SFB, obtendo-se índices satisfatórios de prenhez (Block *et al.*, 2010). Adicionalmente, Sudano *et al.* (2011) demonstraram que apenas a redução da concentração do SFB no meios de desenvolvimento já é capaz de acarretar na redução do conteúdo lipídico e aumento da sobrevivência embrionária após congelamento. O desenvolvimento de meios de cultivo livres de SFB tem se apresentado como uma das principais linhas de pesquisas investigadas a fim de se alcançar resultados consistes de produtividade e qualidade embrionária na PIVE.

Outra metodologia que vem sendo comumente adotada na tentativa de redução do conteúdo lipídico embrionário é a suplementação dos meios de cultivo com substâncias químicas que atuam como reguladores metabólicos. Panyaboriban *et al.* (2018) suplementaram o meio de produção de embriões com Forskolin, um delipidante químico, e obtiveram redução do conteúdo lipídico e aumento das taxas de criotolerância. Já Held-Hoelker *et al.* (2017) utilizaram L-carnitina durante a produção de embriões obtendo taxas de produção similares ao grupo controle, porém com redução do conteúdo lipídico citoplasmático. Demais metodologias incluindo a centrifugação e posterior micromanipulação (Ushijima *et al.*, 1999) de embriões já foram propostas como formas de redução de gotículas lipídicas, no entanto, por serem técnicas altamente invasivas e demandarem o manuseio de apenas um embrião por vez, acabam tornando-se inviáveis para aplicação em larga escala, limitando-se apenas ao meio científico.

2.1.4 Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões é uma biotécnica de conservação em N₂ que tem como objetivo manter as células em estado de quiescência, prolongando a viabilidade embrionária durante longos períodos de tempo, sendo reversível após descongelamento. É considerada uma estratégia para superar problemas logísticos associados à transferência de um grande número de embriões frescos e principalmente para a expansão da comercialização de embriões entre países (Sudano *et al.*, 2013). Dentre as suas vantagens estão a otimização das biotecnologias reprodutivas como PIVE e transferência de embriões de modo a preservar embriões excedentes, conservação do material genético de espécies em extinção, prevenção de problemas decorrentes do transporte de animais vivos e adequação da época de parição (Gonçalves *et al.*, 2008).

O primeiro relato de sucesso na sobrevivência de embriões (camundongos) submetidos a congelamento/descongelamento foi registrado por Whittingham *et al.* (1972). Nos anos seguintes, a técnica foi aplicada também com êxito em diferentes espécies, como bovina (Wilmot e Rowson, 1973), ovina (Willadsen *et al.*, 1974), equina (Yamamoto *et al.*, 1982) e humana (Trounson e Mohr, 1983). Desde então, o congelamento de embriões vem sendo amplamente empregado a nível comercial e de acordo com Viana (2018), no Brasil a maioria dos embriões produzidos *in vitro* ainda é transferida a fresco, porém o percentual de congelados (33.7%) segue tendência de crescimento visto que no caso dos embriões produzidos *in vivo*, o congelamento é a opção preferencial (62,1% do total).

O princípio da criopreservação consiste na necessidade de remoção máxima da água do interior das células antes do congelamento, evitando a formação de grandes cristais de gelo que ocasionem danos celulares, de modo que seja possível a retomada do metabolismo celular após seu armazenamento em baixas temperaturas. Assim sendo, quase todas as estratégias de criopreservação são baseadas em dois fatores principais: taxas de aquecimento/resfriamento e crioprotetores (Vajta e Kuwayama, 2006).

De acordo com Mazur (1980) há uma correlação entre a velocidade de congelamento e o surgimento de lesões celulares. Segundo o autor, à medida que a velocidade de congelação aumenta, a sobrevivência após descongelação também aumenta, até que se alcance um índice máximo ideal a partir do qual a maior velocidade de congelamento também acarreta em maiores danos e menor sobrevivência embrionária. Além da curva de velocidade de congelamento, o uso de crioprotetores é indispensável para conferir proteção celular contra a queda de temperatura. Embora os crioprotetores sejam absolutamente necessários e amplamente utilizados nos protocolos de criopreservação, os mecanismos que conferem proteção ao material biológico, bem como a toxicidade e a metabolização celular destes agentes não são completamente esclarecidos e abordados na literatura (Castro *et al.*, 2011). Sabe-se que pelo menos parcialmente, seu efeito de proteção advém da redução do ponto de solidificação das soluções. De acordo com a sua capacidade de penetração nas membranas celulares os crioprotetores são divididos em dois grupos: permeáveis (como glicerol, etilenoglicol e propilenoglicol) e impermeáveis (como sacarose, polietilenoglicol e polivinilpirrolidona). Basicamente dois métodos de criopreservação de embriões são utilizados atualmente, o congelamento lento e a vitrificação.

O congelamento lento ou clássico é um dos mais difundidos e tem por base o uso do glicerol como crioprotetor, tem como principal vantagem o uso de baixas concentrações de crioprotetores, porém permite a formação de cristais de gelo que poderão acarretar em danos celulares. Após período de prévia exposição, o envase dos embriões é feito em palhetas juntamente com a solução crioprotetora, as quais serão alocadas em congeladores programáveis para resfriamento. A queda da temperatura é controlada mantendo-se uma curva constante até atingir a temperatura de -32°C , quando as palhetas contendo os embriões são mergulhadas no nitrogênio líquido (Dode *et al.*, 2013). Após o reaquecimento, os embriões precisam ser alocados em placas de Petri onde ocorrerá a diluição da solução crioprotetora por lavagens sucessivas em soluções de diluição. Alternativamente, Leibo (1983) desenvolveu o método *One-Step* onde a diluição do crioprotetor ocorre ainda na palheta após descongelamento,

possibilitando a transferência para receptoras sem avaliação microscópica prévia. Ainda, o método de Transferência Direta (DT) utiliza o crioprotetor etilenoglicol e imediatamente após descongelamento os embriões são transferidos, não ocorrendo avaliação prévia.

Apesar de o congelamento lento ser o método mais utilizado para embriões produzidos *in vivo*, a vitrificação surgiu como uma alternativa para embriões PIVE. Quando são comparados os resultados de criotolerância e prenhez de ambos os procedimentos considerando-se o método de produção, embriões *in vivo* apresentam resultados similares, tanto para congelamento lento quanto vitrificação (Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 1997), enquanto que embriões PIVE apresentam resultados mais satisfatórios com a vitrificação (Mucci *et al.*, 2006).

Na vitrificação os meios de criopreservação sofrem uma passagem direta do estado líquido para um estado vitrificado e amorfo, sem a ocorrência da cristalização dos meios, o que é possível devido à alta viscosidade dos meios de criopreservação e da grande velocidade de congelamento ($> 20.000^{\circ} \text{C}/\text{min}$) por imersão direta em N_2 , a partir da temperatura ambiente (Gonçalves *et al.*, 2008). A técnica é extremamente rápida e dispensa o uso de aparelhos de congelamento, no entanto, exige maior treinamento do profissional que a desenvolve. Dentre as desvantagens estão a impossibilidade de transferência direta e a necessidade da utilização de altas concentrações de crioprotetores que podem causar toxicidade celular. Em função disso, diversas combinações com diferentes crioprotetores, concentrações e tempo de exposição já foram propostas. Para garantir uma rápida taxa de resfriamento, adota-se o emprego do volume mínimo de solução por amostra, de modo a propiciar contato imediato com o N_2 . Com esta finalidade, foram desenvolvidas ferramentas específicas para acondicionamento dos embriões em microgotas, como *Open Pulled Straw* (OPS) (Vajta *et al.*, 1998), *Cryoloop* (Lane *et al.*, 1999) e *Cryotop* (Kuwayama, 2007).

O efeito da criopreservação em embriões mamíferos reduz as taxas de sobrevivência, levando a consideráveis danos morfológicos e funcionais. Contudo, a extensão da crioinjúria é altamente variável e dependente da espécie, estágio de desenvolvimento e origem do embrião (produzido *in vivo* ou *in vitro*) no momento da criopreservação (Dalcin e Lucci, 2010). Deste modo, algumas estratégias podem ser empregadas para aumentar a criotolerância de embriões PIVE, tais como a modificação nas condições de cultivo para reduzir o acúmulo lipídico, suplementação com agentes lipolíticos, cultivo sob sistema de baixa pressão de oxigênio para minimização do estresse oxidativo e adição de antioxidantes ao meio de cultivo (Dode *et al.*, 2013).

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito das modulações positiva e negativa da Acil-CoA sintetase de cadeia longa sobre o desenvolvimento, qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2.2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* com moduladores positivo e negativo da Acil-CoA sintetase de cadeia longa sobre as seguintes variáveis:

- Taxas de clivagem e produção de embriões;
- Conteúdo e perfil lipídico embrionário;
- Criotolerância;
- Expressão gênica;
- Viabilidade celular (número total de células e percentual apoptótico).

2.3 Hipótese

A modulação negativa da Acil-Coa sintetase de cadeia longa reduz o conteúdo lipídico embrionário e aumenta a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

3. CAPÍTULO II

3.1 Artigo científico

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico o qual ainda está em fase de envio para publicação e por este motivo não será incluso neste documento.

Efeito da modulação da Acil-CoA sintetase de cadeia longa sobre o desenvolvimento, qualidade, conteúdo lipídico e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Roniele Santana Valente¹, Tamie Guibu de Almeida², Mayra Fernanda Alves³, Janine de Camargo¹, Andrea Cristina Basso³, Katia Roberta Anacleto Belaz^{4,5}; Marcos Nogueira Eberlin⁵, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira⁶, Mateus José Sudano^{1,7}.

¹ Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, RS, Brasil; ² Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ³ In vitro Brasil | ABS Pecplan, Mogi Mirim, SP, Brasil; ⁴ Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; ⁵ Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil; ⁶ Universidade Estadual de São Paulo, Assis, SP, Brasil; ⁷ Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil

Palavras chaves: embriões bovinos, lipídeos embrionários, vitrificação, criotolerância

Autor correspondente: Mateus José Sudano mjsudano@gmail.com

4. CONCLUSÃO

Neste estudo avaliou-se uma possível alternativa para redução do acúmulo lipídico durante o desenvolvimento de embriões bovinos PIVE através da suplementação do meio de cultivo com moduladores positivo e negativo da Acil-CoA sintetase de cadeia longa (ACS). Ficou claramente demonstrada a efetividade dos tratamentos na modulação do nível de transcritos gênicos associados ao metabolismo lipídico e ainda o impacto desta modulação sobre o acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas. Apesar da modulação negativa da ACS ter sido efetiva sobre o conteúdo lipídico, este efeito não foi refletido sobre a criotolerância, um indicativo de que outras variáveis, que não apenas o acúmulo lipídico, interferem na capacidade de sobrevivência embrionária após a criopreservação. Por fim, a modulação positiva de ACS elevou a capacidade de eclosão de embriões de menor qualidade quando submetidos à vitrificação, de modo que pode vir a ser considerada uma alternativa para criopreservação do maior número possível dos embriões produzidos *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H. et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002. ISSN 1040-452X.

ANNES, K. et al. Influence of follicle size on bovine oocyte lipid composition, follicular metabolic and stress markers, embryo development and blastocyst lipid content. **Reproduction, Fertility and Development**, 2018. ISSN 1448-5990.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL JR, G. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during *in vitro* culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 74, n. 11, p. 1395-1405, 2007. ISSN 1040-452X.

BEATRIZ, P. M.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001. ISSN 0004-2803.

BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P. Efficacy of *in vitro* embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium1. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 11, p. 5234-5242, 2010. ISSN 0022-0302.

BRACKETT, B. G. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982. ISSN 0006-3363.

BRILL, A. et al. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 16, n. 10, p. 512-519, 1999. ISSN 1058-0468.

CASTRO, S. et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, 2011. ISSN 1678-0345.

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, v. 184, n. 4684, p. 466, 1959. ISSN 1476-4687.

COSTA, E. et al. Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1507-1510, 2010. ISSN 0102-0935.

DALCIN, L.; LUCCI, C. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Belo Horizonte**, p. 149-159, 2010.

DE LA FUENTE, R.; KING, W. A. Use of chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophoctoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. **Zygote**, v. 5, n. 4, p. 309-320, 1997. ISSN 1469-8730.

DE OLIVEIRA LEME, L. et al. Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 724-733. e1, 2016. ISSN 0093-691X.

DEL COLLADO, M. et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 11, p. 1721-1732, 2016. ISSN 1448-5990.

DODE, M.; LEME, L.; SPRÍCIGO, J. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Rev. bras. reprod. anim.**, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2013. ISSN 0102-0803.

DODE, M. et al. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of bos indicus oocytes. **Animal reproduction science**, v. 69, n. 1-2, p. 15-23, 2002. ISSN 0378-4320.

DONG, B. et al. High fructose diet downregulates long-chain acyl-CoA synthetase 3 expression in liver of hamsters via impairing LXR/RXR signaling pathway. **Journal of lipid research**, p. jlr. M032599, 2013. ISSN 0022-2275.

DOS SANTOS-NETO, P. et al. Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of *in vivo* and *in vitro* produced ovine embryos. **Cryobiology**, v. 78, p. 8-14, 2017. ISSN 0011-2240.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007. ISSN 0192-6233.

FARGHALY, T. et al. The effect of temporary meiotic attenuation on the *in vitro* maturation outcome of bovine oocytes. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 51, n. 7, p. 662-671, 2015. ISSN 1071-2690.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **The Journal of cell biology**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992. ISSN 0021-9525.

GJØRRET, J. O. et al. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1193-1200, 2003. ISSN 0006-3363.

GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R.; DE FIGUEIRÊDO FREITAS, V. J. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. Editora Roca, 2008. ISBN 8572417443.

HANSEN, P. J. et al. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 59-66, 2009. ISSN 1448-5990.

HELD-HOELKER, E. et al. Cryosurvival of *in vitro* produced bovine embryos supplemented with l-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. **Theriogenology**, v. 96, p. 145-152, 2017. ISSN 0093-691X.

HSIEH, C.-E. et al. Early blastulation (EB) of day 4 embryo is predictive of outcomes in single embryo transfer (SET) cycles. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 57, n. 5, p. 705-708, 2018. ISSN 1028-4559.

IGAL, R. A.; PING, W.; COLEMAN, R. A. Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA. **Biochemical Journal**, v. 324, n. 2, p. 529-534, 1997. ISSN 0264-6021.

KNITLOVA, D. et al. Supplementation of l-carnitine during *in vitro* maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 102, p. 16-22, 2017. ISSN 0093-691X.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73-80, 2007. ISSN 0093-691X.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 14, n. 7, p. 398-403, 1997. ISSN 1058-0468.

LANE, M. et al. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and sterility**, v. 72, n. 6, p. 1073-1078, 1999. ISSN 0015-0282.

LEIBO, S. A one-step in situ dilution method for frozen thawed bovine embryos. **Cryo-letters**, v. 4, p. 387-400, 1983.

LIN, T. et al. Melatonin supplementation during prolonged *in vitro* maturation improves the quality and development of poor-quality porcine oocytes via anti-oxidative and anti-apoptotic effects. **Molecular reproduction and development**, 2018. ISSN 1040-452X.

LONERGAN, P. et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 41, n. 5, p. 427-437, 2001. ISSN 0926-5287.

MAZIERO, R. et al. Effect of temporary meiotic attenuation of oocytes with butyrolactone I and roscovitine in resistance to bovine embryos on vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 2, p. 204-211, 2016. ISSN 0936-6768.

MAZUR, P. **Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos**. Oak Ridge National Lab., TN (USA). 1980

MCKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 59-67, 2011. ISSN 1448-5990.

MELLO, R. et al. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016.

MENEGHEL, M. et al. Lipid content and cryotolerance of *in vitro*-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 395-400, 2017. ISSN 0100-736X.

MILAZZOTTO, M. P. et al. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 83, n. 4, p. 324-336, 2016. ISSN 1040-452X.

MUCCI, N. et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551-1562, 2006. ISSN 0093-691X.

MURILLO, A. et al. Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. **Reproductive biology**, v. 17, n. 2, p. 162-171, 2017. ISSN 1642-431X.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. sespecial, 2010.

PANYABORIBAN, S. et al. Treatment with chemical delipidation forskolin prior to cryopreservation improves the survival rates of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos indicus*) *in vitro* produced embryos. **Cryobiology**, 2018. ISSN 0011-2240.

PONTES, J. et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, 2010. ISSN 0093-691X.

PURSEL, V. et al. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 24, n. 6, p. 687-691, 1985. ISSN 0093-691X.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002. ISSN 1040-452X.

ROCHA-FRIGONI, N. et al. Produção *in vitro* de embriões ovinos: avanços e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 103 - 109, 2014.

SATA, R. et al. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. **Journal of Reproduction and Development**, v. 45, n. 1, p. 97-103, 1999. ISSN 0916-8818.

SIRARD, M.-A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006. ISSN 0093-691X.

SOUPENE, E.; KUYPERS, F. A. Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. **Experimental biology and medicine**, v. 233, n. 5, p. 507-521, 2008. ISSN 1535-3702.

STRINGFELLOW, D.; SEIDEL, S. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários. **Illinois: Savoy**, v. 3, p. 180, 1998.

SUDANO, M. et al. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Animal Reproduction**, p. 160-167, 2013. ISSN 1806-9614.

SUDANO, M. J. et al. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus in vitro*-and *in vivo*-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 8, p. 1129-1141, 2014. ISSN 1448-5990.

SUDANO, M. J. et al. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211-1220, 2011. ISSN 0093-691X.

THORNTON, B.; BASU, C. Rapid and simple method of qPCR primer design. In: (Ed.). **PCR Primer Design**: Springer, 2015. p.173-179.

TROUNSON, A.; MOHR, L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. **Nature**, v. 305, n. 5936, p. 707, 1983. ISSN 1476-4687.

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, n. 2, p. 534-539, 1999. ISSN 0006-3363.

VAJTA, G. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 51, n. 1, p. 53-58, 1998. ISSN 1040-452X.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236-244, 2006. ISSN 0093-691X.

VAN HORN, C. G. et al. Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. **Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1635-1642, 2005. ISSN 0006-2960.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.; DEN DAAS, J.; RALL, W. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1071-1084, 1997. ISSN 0093-691X.

VARAGO, F.; MENDONÇA, L.; LAGARES, M. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VIANA, J. H. A produção de embriões bovinos em 2017: o mercado em stand-by. **Jornal o embrião**, v. 62, 2018. Disponível em: <
http://www.sbte.org.br/arquivos/jornal/Ed_62_Oembriao_Dez_2018.pdf>.

WEEDON-FEKJAER, M. S. et al. Activation of LXR increases acyl-CoA synthetase activity through direct regulation of ACSL3 in human placental trophoblast cells. **Journal of lipid research**, p. jlr. M004978, 2010. ISSN 0022-2275.

WHITTINGHAM, D.; LEIBO, S.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C. **Science**, v. 178, n. 4059, p. 411-414, 1972. ISSN 0036-8075.

WILLADSEN, S. et al. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 11, p. 560 (Abstract), 1974.

WILMUT, I.; ROWSON, L. Experiments on the low temperature preservation of cow eggs. **Vet. Rec.**, v. 92, p. 686-690, 1973.

YAMAMOTO, Y. et al. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. **J. Reprod. Fertil., Supple**, v. 32, p. 399-403, 1982.