



PÂMELLA ALVES CORREIA

**ETOSSULFATO DE FENAZINA NA MATURAÇÃO *IN*
VITRO DE OÓCITOS BOVINOS**

**LAVRAS - MG
2019**

PÂMELLA ALVES CORREIA

**ETOSSULFATO DE FENAZINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. José Camisão de Souza
Orientador

Prof. Dra. Jasmin
Coorientadora

LAVRAS – MG
2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Correia, Pâmella Alves.

Etossulfato de fenazina na maturação *in vitro* de oócitos
bovinos / Pâmella Alves Correia. - 2019.

82 p.

Orientador(a): José Camisão de Souza.

Coorientador(a): Jasmin

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Embriões bovinos. 2. MIV. 3. Vitrificação. I. de Souza, José
Camição. II. j, Jasmin. III. Título.

PÂMELLA ALVES CORREIA

**ETOSSULFATO DE FENAZINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
BOVINOS**

**FENAZINE ETOSSULFATE IN *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE
OOCYTES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Reprodução Animal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2019

Dr. José Camisão de Souza - UFLA

Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira - EPAMIG

Dr. José Nélio de Sousa Sales - UFJF

Dra. Jasmin - UFRJ

Prof. Dr. José Camisão de Souza
Orientador

Prof. Dra. Jasmin
Coorientadora

LAVRAS – MG
2019

Aos meus afilhados, Victor Leônidas e Helena, e ao Leônidas Augusto por me lembrarem diariamente o verdadeiro sentido da vida, me fazerem lutar por um mundo melhor e me trazerem a alegria de viver.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ninguém se faz sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor. Felizmente, em minha jornada fui agraciada com inúmeros anjos que me trouxeram até aqui: meu porto seguro e irmã Ingrid; minha mãe, a mulher mais batalhadora e forte que conheço; meu pai amado; meu amor; minha Ohana Alvarenga Fernandes que me apoia e inspira; famílias Alves, Correia, Lopes, Pinto e Chaves, dos quais herdei desde o mindinho torto até esse temperamento “sereno”; Larissa, Letícia, Miss, Fael e tantos amigos de longa data que afortunadamente continuam fazendo parte da minha vida; EVZ-UFG com seus mestres e meus colegas, com os quais trilhei cinco anos de descobertas, amadurecimento e sonhos; aos meus dias passados no CEBC e PABL, que me permitiram um grande crescimento profissional e me ofereceu boa parte do conhecimento que hoje possuo; UFMT e ENVN por ampliarem meus horizontes tanto no quesito pessoal quanto profissional; UFLA, em especial ao Departamento de Zootecnia por me permitir novas experiências na área da Reprodução Animal; CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa que permitiu a realização dessa etapa (o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil, Código de Financiamento 001); EPAMIG, sobretudo Dr. Marcos Brandão pela parceria e apoio técnico durante a fase de experimentos; ao Cenatte Embriões com toda a rede técnica, em especial Raphael e Thaís, pela oportunidade de realização do experimento, receptividade, aprendizado, ensinamentos repassados, confiança e paciência de compartilhar a grande experiência na área de produção *in vitro* de embriões; UFRJ, sobretudo Dra. Jasmin pela disponibilidade, conhecimentos trocados e todas as conversas cheias de ensinamentos; ao meu orientador e ser humano admirável José Camisão, GERE e seus membros pela parceria diária, trocas de experiências e amizade; a todas as cidades mineiras pelas quais passei que me receberam calorosamente, em especial aquelas pessoas que dividiram seu lar comigo, Aline, Elizanne e companheiros que passaram pela Paragominas; e claro, todos os animais que um dia já cruzaram meu caminho, por despertarem sempre o melhor de mim; a todos vocês minha ETERNA GRATIDÃO!!!

“Fala-me e eu esquecerei; ensina-me e eu poderei lembrar; envolva-me e eu
aprenderei.”

(Benjamim Franklin)

RESUMO

O objetivo foi avaliar diferentes doses do etossulfato de fenazina (PES) durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos e suas consequências até o descongelamento nos embriões vitrificados. As concentrações 0; 0,16; 0,4 e 1,0 μM foram avaliadas sobre as taxas de produção de embriões, de eclosão e de expansão, conteúdo lipídico e características morfológicas. Oócitos de frigorífico (n=2.232) foram maturados durante 24 horas, parte foi submetido a análise de fluorescência, os demais foram cultivados até D7, destes os embriões grau I foram vitrificados, posteriormente aquecidos e cultivados por 48 horas. Um mínimo de 550 CCOs por tratamento foram maturados em 13 réplicas resultando em 400 embriões vitrificados. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SAS[®]. A taxa de embriões produzidos para o Controle (C=41,5 \pm 1,8, n=237) foi maior (P <0,01) em relação ao PES0,16 (32,5 \pm 1,7, n=182) e PES1 (32,6 \pm 1,7, n=186), mas não diferiu do PES0,4 (35,6 \pm 1,7, n=210). Os grupos tratados não diferiram entre si. A taxa de eclosão (P =0,10) tendeu a ser maior para o PES1 (34,3 \pm 5,6, n=32) e o PES0,4 (32,4 \pm 5,6, n=38) em relação ao Controle (27,2 \pm 5,7, n=13) e PES0,16 (22,4 \pm 5,8, n=17). A taxa de expansão ao fim de 48 horas de cultivo foi igual (P <0,05) para o Controle (27,1 \pm 5,2, n=20), PES0,16 (24,3 \pm 5,6, n=20) e PES1 (10,3 \pm 2,0, n=12). Sendo que os grupos PES0,4 (17,7 \pm 3,5, n=10) e PES1 não diferiram entre si. Maior proporção de oócitos do PES1 (P <0,01) atingiram estágios avançados de meiose (>90%) do que o Controle (50%). Não houve efeito de tratamento sobre a quantidade de células apoptóticas ou da MCI. No D9 houve aumento de células apoptóticas (P <0,01) e redução do número de células totais (P <0,01) e da MCI (P <0,01) nos blastocistos. A concentração de lipídios (triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol) nos oócitos foi menor (P <0,01) nos grupos tratados em relação ao Controle. Os triglicerídeos do PES1 e PES0,4 não diferiram do Controle durante o cultivo; no PES0,16 foram maiores (P=0,01) do que o Controle. As concentrações de fosfolipídios e colesterol do PES0,4 e PES0,16 foram maiores (P <0,01) do que no Controle e PES1. Os blastocistos que sobreviveram e eclodiram após 48 horas do descongelamento foram 77% do PES0,4, 72% do PES1, contra 44% para o PES0,16 e 25% para o Controle indicando que houve efeito positivo do tratamento. A concentração de lipídeos foi diminuída pelo PES nos oócitos, mas aparentemente houve um efeito compensatório na fase de cultivo, portanto o PES usado somente durante a MIV pode levar a aumento de lipídeos nos embriões.

Palavras-chave: PES. MIV. Embriões bovinos. Vitrificação. Aquecimento.

ABSTRACT

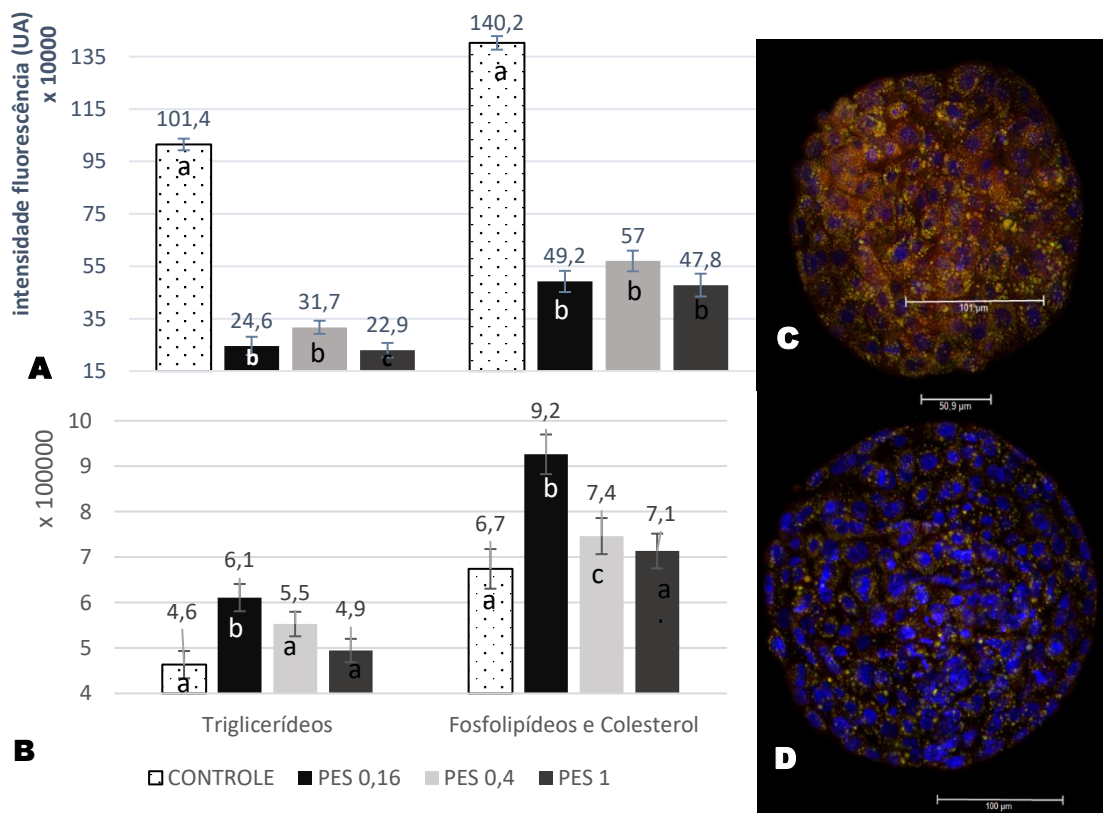
The objective was to evaluate different doses of phenazine ethosulfate (PES) during in vitro maturation of bovine oocytes and their consequences until thawing in vitrified embryos. The concentrations 0; 0.16; 0.4 and 1.0 μ M were evaluated on embryo production, hatching and expansion rates, lipid content and morphological characteristics. Refrigerator oocytes (n = 2,232) were matured for 24 hours, part was subjected to fluorescence analysis, the others were cultured to D7, of which the grade I embryos were vitrified, then heated and cultured for 48 hours. A minimum of 550 CCOs per treatment were matured in 13 replicates resulting in 400 vitrified embryos. Data were analyzed by SAS® statistical package. The rate of embryos produced for the Control (C = 41.5 ± 1.8 , n = 237) was higher (P < 0.01) compared to PES0.16 (32.5 ± 1.7 , n = 182) and PES1 (32.6 ± 1.7 , n = 186), but did not differ from PES0.4 (35.6 ± 1.7 , n = 210). The treated groups did not differ from each other. The hatching rate (P = 0.10) tended to be higher for PES1 (34.3 ± 5.6 , n = 32) and PES0.4 (32.4 ± 5.6 , n = 38) in Control (27.2 ± 5.7 , n = 13) and PES0.16 (22.4 ± 5.8 , n = 17). The expansion rate after 48 hours of cultivation was the same (P < 0.05) for the Control (27.1 ± 5.2 , n = 20), PES0.16 (24.3 ± 5.6 , n = 20) and PES1 (10.3 ± 2.0 , n = 12). The groups PES0.4 (17.7 ± 3.5 , n = 10) and PES1 did not differ from each other. Higher proportion of PES1 oocytes (P < 0.01) reached advanced meiosis stages (> 90%) than Control (50%). There was no treatment effect on the amount of apoptotic cells or MCI. In D9 there was an increase in apoptotic cells (P < 0.01) and a reduction in the number of total cells (P < 0.01) and MCI (P < 0.01) in blastocysts. Lipid concentration (triglycerides, phospholipids and cholesterol) in oocytes was lower (P < 0.01) in treated groups compared to Control. PES1 and PES0.4 triglycerides did not differ from Control during cultivation; in PES0.16 were higher (P = 0.01) than Control. The phospholipid and cholesterol concentrations of PES0.4 and PES0.16 were higher (P < 0.01) than in Control and PES1. Blastocysts that survived and hatched 48 hours after thawing were 77% of PES0.4, 72% of PES1, versus 44% of PES0.16 and 25% of Control indicating a positive treatment effect. Lipid concentration was decreased by PES in oocytes, but apparently there was a compensatory effect in the culture phase, so PES used only during IVM may lead to lipid increase in embryos.

Keywords: PES. MIV. Bovine embryos. Vitrification. Heating.

RESUMO INTERPRETATIVO E GRÁFICO

Elaborado por Pâmella Alves Correia e orientado por José Camisão de Souza e Jasmin.

Há uma demanda mundial por eficiência, e com a produção de alimentos essa necessidade se intensifica. Alimentar o mundo é um grande desafio, um dos caminhos para esse desenvolvimento é o investimento em melhoramento genético. A produção de embriões *in vitro* (PIV) é uma técnica muito interessante nesse sentido, capaz de armazenar material genético por tempo indeterminado e melhorar a logística de transporte de embriões, mas que ainda não apresenta resultados satisfatórios e é alvo de muitos estudos. Pois imitar tudo que se passa dentro do organismo animal não é tarefa fácil, a PIV é uma realidade comercialmente hoje, mesmo assim os embriões produzidos têm várias diferenças daqueles originados *in vivo*. Uma dessas alterações é o acúmulo de lipídeos no embriões PIV, o que não ocorre nos gerados no animal. Sendo uma das causas da baixa sobrevivência desses embriões ao congelamento. Testou-se o fármaco etossulfato de fenazina (PES), para verificar se ele era capaz de reduzir as gotas lipídicas e melhorar a crioresistência dos embriões. Todas as doses testadas do fármaco reduziram as gotas lipídicas no início do desenvolvimento do zigoto, mas isso não se manteve no embrião criopreservado. A dose de 0,4 μM não prejudicou a produção de embriões e teve resultados interessantes quanto à viabilidade embrionária após o congelamento. O PES não teve efeitos deletérios na qualidade do embrião produzido, induziu a maturação nuclear e reduziu a concentração de lipídeos nos oócitos, mas isso não se manteve nas demais fases do desenvolvimento embrionário, portanto o fato de diminuir gota lipídica não foi o mais determinante para a criotolerância neste estudo.



A- Média de intensidade de fluorescência para os lipídeos presentes nos oócitos maturados com PES. **B-** Avaliação da concentração de lipídeos nos embriões. **C-** Embrião do Controle. **D-** Embrião do PES 0,4. Embriões corados com DAPI (células - azul) e Nile red (gotas lipídicas - amarelo). Valores são expressos em unidades arbitrárias (UA).

^{abc}Médias com sobrescritos incomuns diferem entre grupos para cada tipo de lipídeo. $P < 0,05$.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Histórico do uso de etossulfato de fenazina (PES) na produção in vitro de embriões mamíferos.....	36
TABELA 2 – Histórico da produção in vitro de embriões bovinos ($P < 0,0001$) durante o período de novembro de 2018 a fevereiro de 2019 por réplica.	46
TABELA 3 - Produção in vitro de embriões bovinos (média dos quadrados mínimos \pm erro padrão) e diferentes concentrações de etossulfato de fenazina (PES).....	47
TABELA 4 - Diâmetro dos oócitos maturados com etossulfato de fenazina.....	49
TABELA 5 - Embriões maturados com etossulfato de fenazina, fixados à fresco e após 48 horas do descongelamento para avaliação celular do número total de células, quantidade de células na massa celular interna (MCI) e células apoptóticas.	51
TABELA 6 - Número total de células nos embriões provenientes de oócitos maturados com etossulfato de fenazina.	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Rota da via das pentoses e atuação do PES. A glicose é fosforilada pela hexoquinase (HK) para formar glicose-6-fosfato (G-6-P) que pode entrar na glicólise ou na via PPP. G6PDH e 6PGDH são duas enzimas da via PPP que requerem o NADP como cofator. O PES oxida NADPH a NADP⁺ e desse modo ativam as enzimas que requerem NADP da via PPP. A ribose pode alimentar a via PPP a jusante da G6PDH e ser metabolizada em ribose-5-fosfato (R-5-P). A R-5-P é convertido em PRPP pela PRPP sintetase, e a PRPP é absolutamente necessária para a geração de purinas, pirimidinas e nucleotídeos de piridina (Adaptado de Downs et al., 1998).. 31

FIGURA 2 - Gotas lipídicas nos oócitos bovinos maturados com doses de 0,16; 0,4 e 1 µM de PES, e Controle (CTRL). (A) - Oócitos bovinos corados com Nile Red para avaliação da concentração de triglicerídeos (filtro verde, acima), fosfolipídios e colesterol (filtro vermelho, abaixo). (B) - Média de intensidade de fluorescência para os lipídeos presentes nos oócitos maturados com PES. Valores são expressos em unidades arbitrárias (UA). ^{abc}Médias com sobrescritos incomuns diferem entre grupos para cada tipo de lipídeo. P<0,0001. 48

FIGURA 3 - Distribuição citoplasmática das gotas lipídicas nos oócitos maturados com PES. (G) Geral (I) Intermediário (P) Periférico. P <0,0295. 49

FIGURA 4 - Fase de desenvolvimento dos oócitos bovinos maturados com PES e corados com DAPI. Os oócitos foram classificados de acordo com a fase da meiose em vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase 1 (M1), anáfase-telófase (A) e metáfase 2 (M2). (A) – Visualização das fases de maturação por microscopia de fluorescência. Seta fina indica célula do cumulus. Seta grossa mostra o corpúsculo polar. (B) – Percentual de oócitos pertencentes a cada fase da maturação de acordo com o grupo tratado com diferentes doses do PES (0,16; 0,4 e 1 µM) ou Controle (CTRL). P<0,0065. 50

FIGURA 5 - Representação de blastocistos bovinos no D7 e D9 do desenvolvimento embrionário, após maturação com PES, corados para avaliação do número total de células presente nos embriões (DAPI), contagem de células da MCI (SOX 2) e células apoptóticas (TUNEL). 51

FIGURA 6 - Embriões bovinos no D7 corados com DAPI para avaliação do número total de células após serem maturados com 1 e 0,16 µM de PES. P <0,05..... 52

FIGURA 7 - Avaliação dos lipídios embrionários. (A) - Embriões bovinos em D9 (48h após descongelamento) corados com DAPI (azul) e Nile Red (filtro verde – triglicerídeos; filtro vermelho – fosfolipídios e colesterol) para avaliação da qualidade embrionária. (B) - Avaliação da concentração de lipídeos nos embriões. (C) - Avaliação da concentração de lipídeos e sua relação com a quantidade de células embrionárias. ^{abc}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma classe de lipídios, diferem P <0,05. 53

FIGURA 8 - Embriões bovinos no D7 e D9. (A) - Embriões bovinos corados com DAPI (azul) e Nile Red (filtro verde – triglicerídeos; filtro vermelho – fosfolipídios e colesterol) para avaliação da qualidade embrionária. (B) - Concentração dos diferentes lipídeos detectados pelo Nile Red no D7 e D9. P < 0,0001. (C) - Avaliação da relação da concentração de lipídeos com a quantidade de células presentes nesses embriões. P < 0,0001. (D) - Avaliação da relação da concentração de fosfolipídios e colesterol com a quantidade de células presentes nos embriões de D7 e D9. Interação dia com tratamento: P = 0,05..... 55

FIGURA 9 - Distribuição citoplasmática das gotas lipídicas entre os embriões bovinos no D7 e D9 corados com Nile Red. Elas se concentravam na região da MCI (MCI), distribuída em volta das células dos blastocisto (pericelular) ou dispersa por todo o citoplasma (G). Efeito de dia: $P < 0,0001$ 56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	anáfase-telófase
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
CCOs	complexo cumulus-oócitos
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
DAPI	4'6-diamidino-2-fenilindole
DMPBS	soro fisiológico tamponado com fosfato
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNP	dinitrofenol
EROS	espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	dinucleótido de flavina e adenina reduzida
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FSH	hormônio folículo estimulante
G-6-P	glicose-6-fosfato
G6PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
GLUTs	glicoproteínas de transporte de glicose
GSH	glutathiona reduzida
HK	Hexoquinase
Hx	Hipoxantina
LC	l-carnitina
M1	metáfase I
M2	metáfase II
MCI	massa celular interna
MIV	maturação <i>in vitro</i>
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NR	nile red
PES	etossulfato de fenazina
PIV	produção <i>in vitro</i>
PPP	pentose fosfato
PVA	álcool poli vinílico
R-5-P	ribose-5-fosfato
RE	retículo endoplasmático
ROI	região de interesse
rTdT	enzima recombinante terminal deoxynucleotidyl transferase
RVG	rompimento da vesícula germinativa
SFB	soro fetal bovino
SGPP1	gene lipídico transmembrana
TCM	<i>tissue culture médium</i>
VG	vesícula germinativa
6PGDH	6-fosfogluconato desidrogenase

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1.	Acúmulo lipídico na produção <i>in vitro</i> de embriões	18
2.2.	Impactos do acúmulo lipídico na criopreservação	21
2.3.	Maturação oocitária <i>in vitro</i> e o acúmulo lipídico	23
2.4.	A atividade da via das pentoses na produção <i>in vitro</i> de embriões	27
2.5.	Etossulfato de fenazina na produção <i>in vitro</i> de embriões	29
3.	HIPÓTESE	38
3.1.	Objetivo geral	38
3.2.	Objetivo específico	38
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1.	Local do experimento	38
4.2.	Delineamento experimental	38
4.3.	Procedimentos	38
4.3.1.	Maturação <i>in vitro</i>	39
4.3.2.	Análise da maturação oocitária e gotas lipídicas	39
4.3.3.	Fertilização <i>in vitro</i>	41
4.3.4.	Cultivo <i>in vitro</i>	42
4.3.5.	Vitrificação e descongelamento dos embriões	42
4.3.6.	Quantificação do conteúdo lipídico intracelular	43
4.3.7.	Imunocitoquímica e índice apoptótico embrionário	43
4.4.	Análise estatística	44
5.	RESULTADOS	45
5.1.	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos maturados com etossulfato de fenazina	45
5.2.	Efeitos do etossulfato de fenazina nos oócitos	47
5.2.1.	Efeito etossulfato de fenazina nas gotas lipídicas	47
5.2.2.	Efeitos etossulfato de fenazina no diâmetro oocitário	49
5.2.3.	Efeitos etossulfato de fenazina nas fases da maturação	49
5.3.	Efeitos do etossulfato de fenazina nos embriões	50
5.4.	Efeitos do etossulfato de fenazina nos lipídios embrionários	52
6.	DISCUSSÃO	56
6.1.	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos maturados com etossulfato de fenazina	56
6.2.	Efeitos do etossulfato de fenazina no acúmulo lipídico oocitário	58
6.3.	Efeitos do etossulfato de fenazina nos embriões	61

6.3.1.	Efeitos do etossulfato de fenazina nos lipídios embrionários	63
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
8.	CONCLUSÃO	66
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o aumento de produção na pecuária visa não só a expansão do número de animais, mas, principalmente, o aumento de sua eficiência (MILAZZOTTO et al., 2008). O Brasil está situado no cenário mundial como usuário e fornecedor de genética bovina (PELLEGRINO et al., 2013), e a produção de embriões é responsável por boa parte desse fornecimento. Na produção *in vitro* (PIV) os embriões passam por eventos importantes como maturação, fertilização, clivagem, reprogramação epigenética, compactação, diferenciação, blastulação, expansão, eclosão, alongamento e implantação para o desenvolvimento adequado e o estabelecimento da prenhez (DEAN et al., 2003; JIANG et al., 2014; SUDANO et al., 2016). Além de aumentar o número de produtos/vaca/ano, em média, de uma cria/semana/doadora, a PIV permite a utilização de animais de diferentes idades e estágios fisiológicos como doadoras de oócitos (SPRÍCIGO et al., 2015; SENA-NETTO et al., 2016).

Um rigoroso controle de qualidade durante todas as etapas da PIV é necessário para produzir um embrião de qualidade e criopreservável, sendo este o maior obstáculo para maior disseminação do uso de embriões bovinos PIV, devido à sua sensibilidade à criopreservação (LEIBO e LOSKUTOFF, 1993; SUDANO et al., 2010; SUDANO et al., 2013). Dentre as técnicas de criopreservação, a vitrificação possibilita aos meios de criopreservação passagem direta do estado líquido para o estado vitrificado sem haver cristalização do meio, prevenindo assim danos causados pelo frio, e evitando a formação de cristais de gelo (SUDANO et al., 2010), o que a torna uma opção muito interessante e prática comercialmente.

Para a PIV de embriões, os oócitos são retirados do ambiente natural e submetidos a condições distintas do fisiológico, o que ocasiona estresse oxidativo (WANG et al., 2002), alterações mitocondriais, apoptose exacerbada, bloqueio da meiose oocitária e do desenvolvimento embrionário (AGARWAL et al., 2005; CROCOMO et al., 2012). Esses eventos alteram o metabolismo normal do embrião e dificultam ainda mais uma boa resposta ao processo de vitrificação.

Diversos estudos confirmam a presença de conteúdo lipídico significativamente maior em embriões PIV em comparação com aqueles derivados do desenvolvimento *in vivo* (ABE et al. 2002; ABE e HOSHI 2003; BARCELÓS-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b; SUDANO et al., 2011; PRASTOWO et al., 2016). Esses estudos relacionaram a menor qualidade e alta sensibilidade à criopreservação dos embriões provenientes da PIV, comparados aos produzidos *in vivo*, com características como citoplasma muito elétron-denso, crescimento lento, metabolismo excessivo de substratos energéticos e sensibilidade térmica (SUDANO et al., 2011; LEÃO et al., 2012). Além disso, seu excessivo conteúdo lipídico também é um fator determinante (SEIDEL Jr, 2006; HORVATH et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; LEÃO et al., 2012), o que reduz as taxas de concepção em relação aos embriões produzidos *in vivo* (SUDANO et al., 2010; SUDANO et al., 2011).

Os lipídios são biomoléculas essenciais das células, compõem a membrana plasmática bem como as membranas de várias organelas. Eles estão envolvidos na transdução de sinal como mediadores lipídicos, incluindo fosfatidilinositóis,

esfingolípídios e eicosanoides (DI PAOLO e CAMILLI, 2006). Ainda, desempenham funções importantes em uma série de processos biológicos chave, incluindo proliferação celular, migração, diferenciação, quimiotaxia, pinocitose, sobrevivência e alterações metabólicas (KATSO et al., 2001; CANTLEY et al., 2002; SUDANO et al., 2016). Existem evidências de que pelo menos quatro classes de lipídios afetam a sobrevivência após a criopreservação, são eles: os triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e os fosfolípídios (GHANEM et al., 2014). Estes podem influenciar negativamente a sobrevivência embrionária nos processos de criopreservação (MUCCI et al., 2006; LIMA et al., 2015).

Um possível mecanismo para a redução da criotolerância dos embriões PIV é a peroxidação dos lipídios poli-insaturados contidos nestes embriões (SEIDEL Jr, 2006) aumentando a produção de radicais livres, que pode ser acentuada pelo processo de criopreservação (BEITZ, 1996; SUDANO et al., 2010). Dessa forma, o excesso de lipídios nos embriões aumentaria a produção de radicais livres e acentuaria o processo de morte embrionária (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b; LIMA et al., 2015). Ainda, embriões que metabolizam grande quantidade de glicose comprometem sua capacidade de desenvolvimento. A disponibilidade de uma pequena quantidade de glicose é destinada para a via pentose-fosfato (PPP), fornecendo a ribose-5-fosfato, que será utilizada na síntese de ácidos nucleicos, e a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADPH), que atua na síntese das membranas celulares, além de atuar como antioxidante (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2011). Nos embriões PIV, a estimulação excessiva da glicólise pode aumentar os precursores da síntese proteica e de lipídios, o que favorece a formação de lipídios intracitoplasmáticos juntamente com o desequilíbrio do estado de redução-oxidação desses embriões, acarretando no distúrbio da função mitocondrial, o que resulta no acúmulo lipídico (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007; DIAS et al., 2016).

A disfunção mitocondrial é a alteração da capacidade das mitocôndrias produzirem ATP suficiente para atender as exigências das células. As mitocôndrias geram espécies reativas de oxigênio (EROS) como subproduto tóxico em resposta à fosforilação oxidativa. As EROS incluem superóxido, hidróxido e peróxido, os quais são altamente reativos e podem causar danos às organelas, lipídios, proteínas e DNA, danos definidos como estresse oxidativo. Entretanto, EROS possuem funções celulares como vias de sinalização, regulação de cálcio, apoptose, translocação de mitocôndrias e metabolismo. A falha em qualquer uma dessas funções acarreta algum tipo de distúrbio (BRAND e NICHOLLS, 2011) que nos embriões PIV resulta no acúmulo lipídico (DIAS et al., 2016), já citado.

A alteração do perfil lipídico da membrana é observada no estágio de 8 a 16 células e pode estar relacionado à aquisição de moléculas reguladoras do metabolismo da gordura, após ativação do genoma embrionário, que resulta em diferenças no perfil lipídico na mórula e no blastocisto devido à remodelação e especialização da membrana lipídica (SUDANO et al., 2016). Baseado nessa característica fisiológica trabalhos que tentam modular o metabolismo lipídico no embrião têm focado em alterações no cultivo *in vitro* (CIV) a partir dessa fase, em que ocorre maior metabolismo e conseqüentemente formação de gotículas lipídicas. Mas, estudos recentes demonstram que o acúmulo

lipídico começa desde a retirada do oócito do seu ambiente de origem (DEL COLLADO et al., 2013; DEL COLLADO et al., 2017), e impactam a qualidade embrionária.

Foi demonstrado que em algumas espécies, como a bovina e a murina, esse acúmulo acontece durante a maturação *in vitro* (MIV) quando há exposição dos gametas a ambientes não fisiológicos (YANG et al., 2012; DEL COLLADO et al., 2015; DEL COLLADO et al., 2017). Mudanças notáveis em numerosas classes lipídicas também foram observadas em oócitos imaturos e embriões pré-implantação, independente dos meios de cultura (SUDANO et al., 2016). E ainda, observou-se aumento do conteúdo lipídico nos embriões PIV quando comparado aos *in vivo*, cogitando que isto pode ter acontecido em consequência do acúmulo que acontece durante a MIV (DEL COLLADO et al., 2015; DEL COLLADO et al., 2017).

O uso de substâncias delipidantes na maturação e meios de cultura *in vitro* tem sido amplamente abordado, com o intuito de diminuir o conteúdo lipídico em oócitos e embriões (DIAS et al., 2017). Dentre os moduladores do metabolismo lipídico, o etossulfato de fenazina (PES) tem se mostrado eficiente em melhorar a qualidade embrionária (GAJDA et al., 2008), reduzir o acúmulo lipídico no período pós-compactação (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr et al., 2007b) e aumentar a criosobrevivência em embriões (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr et al., 2007a; SUDANO et al., 2010; GHANEM et al., 2014; VAQUERO et al., 2015). Além de favorecer reações enzimáticas da via PPP (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007a; SUDANO et al., 2011; DIAS et al., 2016).

Sendo assim, vários estudos estão sendo realizados com o intuito de melhorar a resistência dos embriões PIV ao processo de criopreservação. A redução ou remoção do soro fetal bovino (SFB) do meio de cultivo, a adição de substâncias químicas para alterar o metabolismo lipídico, uma remoção mecânica ou a modulação da composição lipídica da membrana têm sido descritos como algumas alternativas para a melhoria da sobrevivência do embrião após a criopreservação (SUDANO et al., 2013; DIAS et al., 2017).

Contudo, até o momento, a maioria dos trabalhos realizados com o PES, na tentativa de diminuir o acúmulo lipídico focaram na fase de cultivo *in vitro*. Apenas Downs et al. (1998) usou o PES na MIV para avaliar o envolvimento da via das pentoses na indução meiótica de oócitos de camundongos, se limitando à avaliação do rompimento da vesícula germinativa e o conteúdo de substrato energético resultante. Como estudos atuais demonstram que o acúmulo lipídico começa desde a fase de maturação (DEL COLLADO et al., 2015; DEL COLLADO et al., 2017) e isso afeta a qualidade embrionária, propõe-se que o PES também atua de forma eficiente na fase de desenvolvimento oocitário, melhorando a eclosão embrionária após descongelamento.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Acúmulo lipídico na produção *in vitro* de embriões

Estudos demonstraram que, enquanto a origem *in vivo* ou *in vitro* de oócitos é o principal fator que determina a taxa de desenvolvimento embrionário (RIZOS et al.,

2002), o ambiente de cultura é conhecido por ser o fator mais importante na determinação da qualidade dos embriões resultantes (RIZOS et al., 2002; RIZOS et al., 2003). Dentre os fatores capazes de afetar a qualidade embrionária em oócitos e embriões de mamíferos, o conteúdo lipídico intracelular afeta a qualidade do embrião, o potencial de desenvolvimento e a criotolerância (NAGANO et al., 2006; GAD et al., 2012).

A resposta do embrião ao estresse foi descrita como “teoria do embrião tranquilo”, que é definida como o estado metabólico normal durante o desenvolvimento embrionário inicial. Uma taxa metabólica baixa é um preditivo de viabilidade de embriões PIV e está relacionada com o desenvolvimento do blastocisto, semelhante ao observado em embriões *in vivo*, que naturalmente são “tranquilos” (LEESE, 2012; DIAS et al., 2016). Estudos em embriões bovinos pré-implantação demonstraram que quanto mais silencioso o metabolismo embrionário, os embriões se tornam menos susceptíveis a danos estruturais e funcionais (LEESE, 2012). Ao contrário, quando o metabolismo é mais acentuado, maior o nível de danos e maior utilização de energia, visando à reparação dos mesmos (BAUMANN et al., 2007).

Mas sabe-se que os embriões PIV exibem desenvolvimento acelerado, diâmetro menor a partir da fase de blastocisto, anormalidades mitocondriais (CROSIER et al., 2001) como cristas periféricas e formato circular (FAIR et al., 1997), redução na quantidade de microvilosidades que recobrem a membrana plasmática e das junções GAP, diminuindo o contato entre as células do trofoblasto (BONI et al., 1999), diferenças metabólicas (KHURANA e NIEMANN, 2000; LIMA et al., 2015) e maior quantidade de lipídios do que os produzidos *in vivo* (PEREIRA et al., 2007; LEÃO et al., 2012).

As gotículas lipídicas são os locais onde os lipídios são armazenados e, no caso dos embriões bovinos, os triglicerídeos são os lipídeos mais abundantes no oócito e embrião (FERGUSON e LEESE, 1999). Eles são os componentes majoritários do núcleo da gota lipídica citoplasmática nestas células. Os triglicerídeos 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 (DEL COLLADO et al., 2013). Os triglicerídeos correspondem a 50% da massa lipídica total em embriões produzidos *in vivo*. No entanto, essa proporção pode alcançar até 88% da massa de lipídeos em embriões PIV (PEREIRA et al., 2008; LEÃO et al., 2012).

Conforme exigido pelo corpo, esses lipídios armazenados são usados para produzir energia, como componentes de membrana e na sinalização lipídica (SOUZA et al., 2015). Como o caminho mais importante para a produção de ATP ocorre nas mitocôndrias pelo ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, qualquer dano a essa organela pode resultar em mudanças no metabolismo lipídico geral (STURMEY et al., 2009; SUDANO et al., 2016). Assim desorganizando um processo que é essencial para o desenvolvimento homeostático dos embriões.

Existem três teorias que explicariam a biossíntese das gotas lipídicas (WALTHER e FARESE et al., 2009); a primeira é aquela na qual os lipídeos neutros (triglicerídeos e ésteres) são sintetizados entre as duas camadas da membrana retículo-endoplasmática, aumentando gradualmente em forma globular, e exteriorizando-se rodeados pela membrana exterior do RE como uma gota lipídica independente. Um segundo modelo é

aquele no qual a gota é formada por ambas camadas da membrana do RE. No último modelo, a gota é formada dentro de pequenas vesículas da bicamada que se mantém presa ao RE até serem transportadas do RE à gota lipídica para completar a formação da mesma (revisado por DEL COLLADO et al., 2013).

O tempo entre a ovulação e o implante embrionário afeta a quantidade de lipídios que podem ser armazenados em um embrião, pois quanto maior esse período, maior pode ser o acúmulo de lipídios (SUDANO et al., 2012; DIAS et al., 2017). Durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional, o excesso de lipídios pode ser sequestrado na célula e usado pelas mitocôndrias para aumentar a produção de ATP necessária para a compactação e a formação do blastocisto (TARAZONA et al., 2006; GAD et al., 2012).

Essas gotículas lipídicas possuem ainda função protetora na célula. Moléculas anfipáticas são abundantes nos ácidos graxos e comprometem a integridade da membrana, mas uma vez os ácidos graxos transformados em triglicerídeos, esses são incorporados nas gotículas, se tornando inertes e “inofensivos”. Esse fato explicaria o excesso de gotículas lipídicas em embriões bovinos PIV. Assim, as gotículas lipídicas atuam como transportadoras de ácidos graxos (SOUZA et al., 2015; DIAS et al., 2016).

Os mecanismos de deposição lipídica nos embriões PIV ainda não estão bem esclarecidos. Estudos comprovaram que o meio de cultivo embrionário é um fator determinante na qualidade dos blastocistos (RIZOS et al., 2003; SUDANO et al., 2011), e que o aumento do número de gotas lipídicas citoplasmáticas pode ocorrer devido a anormalidades no metabolismo energético embrionário, incluindo o “*Crabtree effect*” – quando as células tendem a favorecer o metabolismo via glicólise, em vez da via de fosforilação oxidativa, muito mais eficiente, que é a preferência da maioria das outras células (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a) - ou como resultado da suplementação do meio de cultivo com SFB (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2002; SUDANO et al., 2011; SUDANO et al., 2013).

Especulam-se alguns mecanismos que explicariam este acúmulo lipídico, dentre eles pode-se citar: as lipoproteínas contidas no SFB utilizado como fonte energética durante a PIV poderiam ser internalizadas pelas células embrionárias aumentando o conteúdo lipídico citoplasmático (ABE et al., 2004; ABE e HOSHI, 2003; DIEZ et al., 2001; LIMA et al., 2015; SUDANO et al., 2010); a presença do soro alteraria a β -oxidação em função de uma disfunção mitocondrial, e os lipídios que deveriam ser utilizados como fonte energética ficam acumulados (CROSIER et al., 2001; ABE et al., 2002; LIMA et al., 2015); e o embrião seria induzido a realizar uma neossíntese de triglicerídeos em função da presença do soro (SUDANO et al., 2010).

O uso do SFB, pelo fornecimento desregulado de lipídios, pode promover a incorporação de ácidos graxos saturados e colesterol na membrana embrionária. Esta ficará menos permeável e mais rígida, o que explica a baixa criotolerância do embrião PIV frente à criopreservação (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b; SUDANO et al., 2010). Del Collado et al. (2015) observaram que a inadequada migração de gotículas lipídicas e mitocôndrias em meios suplementados com SFB também poderiam afetar as taxas de desenvolvimento.

A adição de SFB ao meio de cultura *in vitro*, além de resultar no acúmulo de lipídios (CROSIER et al. 2001; ABE et al. 2002; ABE e HOSHI 2003), resulta em menor atividade mitocondrial (CAGNONE e SIRARD 2014). Uma diminuição na densidade de mitocôndrias maduras quando comparados aos embriões *in vivo* ainda reforça a causa da menor criotolerância dos embriões PIV (CROSIER et al., 2001; FARIN et al., 2004; SENA-NETTO et al., 2016). O que poderia, por sua vez, prejudicar a oxidação dos ácidos graxos, ocasionando aumento na deposição de lipídios (RANKIN et al., 2009) devido à incapacidade das mitocôndrias de metabolizar gotículas lipídicas (PRASTOWO et al., 2016).

De forma geral, sabe-se que ambientes de cultura subótimos podem resultar em um declínio na criotolerância de blastocistos bovino devido a uma tríade de fatores negativos aos embriões: maior produção de EROS, disfunção mitocondrial e acúmulo de lipídeos (PRASTOWO et al., 2016). Estudos mostram que genes relativos ao metabolismo de lipídeos são mais expressos nos embriões *in vivo* que nos *in vitro* (GAD et al., 2012). Tais resultados sugerem que esses embriões podem ser incapazes de utilizar os lipídeos internos para a produção de ATP, o que poderia ser devido à insuficiente atividade mitocondrial. Isso explicaria outras diferenças morfológicas, como o citoplasma mais escuro observado nos embriões PIV (SENA-NETTO et al., 2016).

Hoje, diversas pesquisas têm focado na relação entre o excesso de lipídeos na PIV e a criotolerância embrionária, seja em relação à função fisiológica dos lipídeos, ou quanto aos inconvenientes provocados pelo acúmulo exagerado dessas gotas lipídicas no citoplasma celular de oócitos e embriões mantidos *in vitro* (DEL COLLADO et al., 2013).

2.2. Impactos do acúmulo lipídico na criopreservação

O grande desafio para maior disseminação de embriões bovinos PIV é a resposta embrionária à sobrevivência após a criopreservação (SUDANO et al., 2013) que resulte em taxas de prenhez aceitáveis a partir de embriões criopreservados (MORATÓ et al., 2010; LEÃO et al., 2012). Criopreservação nos permite o aproveitamento de receptoras com estro natural, transporte de embriões congelados de forma menos onerosa, a programação de nascimentos de acordo com o manejo de cada propriedade, possibilidade de armazenamento dos embriões enquanto se realiza teste de progênie, e ainda permite a criação de bancos de embriões de animais geneticamente superiores ou em risco de extinção (SERAPIÃO et al., 2005; SENA-NETTO et al., 2016).

O uso da criopreservação em embriões mamíferos obteve seu primeiro relato de sobrevivência com Whittingham em 1971, utilizando embriões de camundongos. O primeiro nascimento de bezerro proveniente de embrião criopreservado foi em 1973 (WILMUT e ROWSON, 1973). A criopreservação de embriões tem por objetivo a conservação do metabolismo celular em estado quiescente, restabelecido após um período de estocagem, retomando seu desenvolvimento normal. Isso é obtido através do armazenamento em baixas temperaturas, que induz a parada da atividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular, possibilitando a conservação de células por tempo indeterminado (GORDON, 2003; SENA-NETTO et al., 2016).

Submeter oócitos e embriões a temperaturas abaixo de zero é um processo que transcende a capacidade fisiológica da célula. Logo, o mecanismo de defesa para

sobreviver nessas condições é limitado e necessita de apoio externo (VAJTA e NAGY, 2006). Desta forma, a capacidade de sobrevivência do material biológico ao processo de criopreservação depende de sua tolerância aos agentes crioprotetores, desidratação, resfriamento e descongelamento (SANTOS et al., 2008). A tentativa de melhorar as taxas de sobrevivência de embriões PIV são limitadas a experimentos que modificam os métodos de criopreservação ou modificam os sistemas de cultivo para tornar os embriões mais criotolerantes (SENA-NETTO et al., 2016).

Quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário, a fase de blastocisto é preferencial para a criopreservação de embriões bovinos. Principalmente devido a maior proporção núcleo-citoplasma e o maior número de células, neste caso se houver lesão em alguma célula ainda assim há recuperação embrionária (MENEZO, 2004). Blastocistos e blastocistos expandidos vitrificados apresentam melhores taxas de eclosão do que quando vitrificado na fase de blastocistos iniciais (VAJTA et al., 1996; LIMA et al., 2015).

A baixa tolerância do embrião PIV à criopreservação (RIZOS et al., 2002; ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b; SUDANO et al., 2010) é frequentemente associada ao aumento da acumulação lipídica citoplasmática em comparação com os embriões derivados *in vivo* (PRASTOWO et al., 2016). Há evidências de que pelo menos quatro classes de lipídios afetam a sobrevivência embrionária após a criopreservação: triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e fosfolipídios (SUDANO et al., 2013; SUDANO et al., 2016; DIAS et al., 2017). No entanto, os exatos mecanismos que causam a redução da criotolerância devido ao acúmulo acentuado de lipídios não estão esclarecidos. Sugere-se que os principais motivos sejam as alterações na fluidez e função da membrana plasmática que ocasionam complicações relacionadas à permeabilidade celular aos crioprotetores; o isolamento térmico promovido pelos lipídios contra as baixas temperaturas que acabam interferindo na velocidade de perda do calor durante o processo de criopreservação (KIM et al., 2001; SUDANO et al., 2012); ou que a peroxidação dos lipídios produza radicais livres acentuando o processo de morte embrionária (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b; LIMA et al., 2015).

Foi demonstrado que a peroxidação dos lipídios é aumentada pelo processo de criopreservação (SEIDEL Jr., 2006), o que gera aumento dos radicais livres advindos da deterioração de lipídios poli-insaturados (BEITZ, 1996). Assim, o aumento de gotículas lipídicas nos embriões pode exacerbar a produção de radicais livres estimulando o processo de morte embrionária (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007a; SENANETTO et al., 2016).

Ademais, os ácidos graxos livres liberados da lipólise das gotas também podem passar a compor a membrana plasmática, provocando seu endurecimento. A fluidez da membrana determina a intensidade da lesão a ser causada na mesma durante o congelamento do embrião (DOMINGUES et al., 2014). Foi demonstrado que células com membranas plasmáticas mais flexíveis e mais permeáveis sofrem menos danos (SEIDEL Jr, 2006). Nessa situação o estresse osmótico (ZERON et al., 2001) é o principal responsável pela desregulação da porção lipídica da membrana citoplasmática (LEÃO et al., 2012), o que explicaria mais uma vez a susceptibilidade dos embriões às técnicas de criopreservação (GÓMEZ et al., 2008; DEL COLLADO et al., 2013).

As modificações nos lipídeos de células submetidas a temperaturas de congelamento estão entre os principais danos celulares, devido a movimentação de água e crioprotetores, nesse processo (AL DARWICH et al., 2010). Quando há a redução da temperatura, há uma transição entre a fase líquida para a fase de gel, que pode alterar de forma irreversível a integridade de algumas regiões da membrana, o que causaria a morte celular (HORVATH et al., 2006). Esse fato é dependente da composição lipídica da membrana celular. Portanto, tanto a composição quanto o conteúdo de lipídeos das células e/ou da membrana plasmática são importantes e devem ser analisados quando se busca melhorar a crioresistência (SEIDEL Jr, 2006; LEÃO et al., 2012).

Há duas maneiras de melhorar a sobrevivência embrionária após a criopreservação (SEIDEL Jr, 2006). Por modificações na técnica de criopreservação, por exemplo, variando a concentração e o tipo do crioprotetor, estudando diferentes tempos e temperaturas dos procedimentos de criopreservação, e usando aditivos como açúcares e surfactantes, que geralmente melhoram os resultados, mas são limitadas e insuficientes para melhorar as taxas de sobrevivência ao descongelamento. O que nos leva para a segunda opção, alterações na composição dos meios de cultivo embrionário de embriões PIV para que se desenvolvam sem exacerbado acúmulo lipídico intracelular e resultem em embrião mais resistente à criopreservação (LEIBO e LOSKUTOFF, 1993; SEIDEL Jr, 2006; SUDANO et al., 2011; SENA-NETTO et al., 2016).

2.3. Maturação oocitária *in vitro* e o acúmulo lipídico

Durante todo o seu desenvolvimento ovariano, o oócito se encontra no estágio diplóteno da prófase I, o reinício da meiose, ou maturação, tem início após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro. A retirada do oócito do contato com as células foliculares, é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear (GONÇALVES et al., 2007; PENITENTE-FILHO et al., 2014). Em bovinos, são necessárias de 20 a 24 horas para a maturação nuclear ser finalizada, processo caracterizado pela passagem do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II (PELLEGRINO et al., 2013). Nos sistemas habituais de produção *in vitro*, 80% dos oócitos imaturos completam a metáfase II da meiose II (DOMINKO e FIRST, 1997). No entanto, só aproximadamente 40% dos oócitos fertilizados alcançam o estágio de blastocisto (WARD et al., 2002; SIRARD et al., 2006; LIMA et al., 2015).

A maturação é composta pela maturação nuclear, citoplasmática e molecular. Durante a maturação, os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: a quebra da vesícula germinativa, o desaparecimento do nucléolo, a condensação da cromatina, a extrusão do primeiro corpúsculo polar, a formação do segundo fuso meiótico (MEINECKE et al., 2001; LIMA et al., 2015) e a segregação cromossômica (FERREIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014).

A maturação citoplasmática envolve síntese de proteínas (SIRARD et al., 1998), modificações moleculares (KUBELKA et al., 2000), redistribuição das organelas intracelulares (STOJKOVIC et al., 2001), maturação dos mecanismos de liberação do Ca^{2+} (WANG et al., 2003) e dinâmica dos filamentos do citoesqueleto (LIMA et al., 2015). Os filamentos do citoesqueleto movimentam as organelas citoplasmáticas e atuam

na segregação cromossômica (FERREIRA et al., 2008). O citoplasma também sofre alterações na modulação da síntese de proteínas e reorganização de organelas citoplasmáticas, como redução do tamanho do Complexo de Golgi, aumento gradativo de lipídeos, compactação do nucléolo e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana do oócito (FERREIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014).

Outro aspecto a ser considerado na MIV, é o fato de que os oócitos que se encontram em diferentes fases da oogênese após serem retirados do ambiente folicular, iniciam o processo de reativação da meiose (PINGUS et al., 1935). Isso faz com que alguns oócitos alcancem a metáfase II prematuramente, isto é, sem que seja acompanhada pela maturação citoplasmática (DEL COLLADO et al., 2013). A falta de sincronia entre a maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos é apontada como causa importante da baixa viabilidade dos embriões resultantes (DURANTHON et al., 2001) que, consequentemente, são menos criotolerantes.

Durante a seleção dos oócitos, após a aspiração folicular, é difícil identificar oócitos com maior ou menor competência, pois a maturação nuclear *in vitro* ocorre de forma assíncrona em relação à maturação citoplasmática (SIRARD et al., 1998; GONÇALVES et al., 2015). Quando o oócito atinge o estágio de metáfase II de forma síncrona, as mitocôndrias, juntamente com gotas lipídicas, assumem posição central na célula (HYTTEL et al., 1997; FERREIRA et al., 2008), o que nem sempre acontece durante a MIV, podendo indicar um dos problemas não só para a maturação oocitária, mas também para o desenvolvimento embrionário, pois essa distância física entre as organelas provavelmente provoca deficiência na β -oxidação (DEL COLLADO et al., 2013).

A mitocôndria tem papel de extrema importância, já que é um componente-chave da maquinaria metabólica, responsável por fornecer a energia a ser consumida no processo de maturação (KRISHER e BAVISTER, 1998; STOJKOVIC et al., 2001). O movimento de mitocôndrias para áreas de grande consumo de energia é crucial para o oócito e para os blastômeros do embrião durante períodos críticos do ciclo celular. De acordo com estudos prévios, durante a maturação, as mitocôndrias sintetizam o ATP necessário para a síntese de proteínas que darão suporte à conclusão dos processos de maturação e desenvolvimento embrionário subsequente (KRISHER e BAVISTER, 1998; STOJKOVIC et al., 2001; FERREIRA et al., 2008).

Durante a maturação oocitária e o desenvolvimento precoce do embrião, vários fatores de estresse ambiental, como o estresse oxidativo, podem prejudicar a integridade e a atividade mitocondrial, resultando em apoptose ou desenvolvimento embrionário anormal (GAD et al., 2012; LEROY et al., 2005). Estudos mostram que o número de mitocôndrias presentes no citoplasma do oócito varia de acordo com o estágio de desenvolvimento em que este se encontra. Oócitos primários contêm aproximadamente 6.000 mitocôndrias, e esse número aumenta para mais de 100.000, durante a maturação citoplasmática (FERREIRA et al., 2008).

Não há formação de novas organelas até a fase de blastocisto (EBERT et al., 1988), as mitocôndrias oocitárias são responsáveis pelo aporte energético do embrião até essa fase (VAN BLERKOM, 2011). Por isso é de extrema importância que durante a MIV ocorra a redistribuição mitocondrial e lipídica adequadamente. O que compreende, além

da migração síncrona das organelas, uma quantidade equilibrada das mesmas (DEL COLLADO et al., 2013).

Durante a pré-maturação e maturação *in vivo*, há um acúmulo fisiológico de lipídios no oócito (FAIR et al., 2003; LEROY et al., 2005). Pode haver grande variação na quantidade de gotículas lipídicas entre os diferentes oócitos coletados de um mesmo ovário. Acredita-se que a partir do momento em que os oócitos perdem a ligação com as células foliculares passam a utilizar uma fonte de energia intracelular para produção de ATP necessário para a síntese proteica, retomada da meiose e maturação citoplasmática (KIM et al., 2001; FERGUSON e LEESE, 1999; LIMA et al., 2015). Este fato reforça a ideia de que os oócitos tendem a acumular reserva lipídica durante a pré-maturação (AARDEMA et al., 2008; LIMA et al., 2015).

Em bovinos, embora estudos mais antigos mostrassem diminuição dos triglicerídeos citoplasmáticos no decorrer da MIV (FERGUSON e LEESE, 1999; KIM et al., 2001), a espectrometria de massas provou que há aumento desses lipídeos nos oócitos durante a MIV (FERREIRA et al., 2009; DEL COLLADO et al., 2017b; DEL COLLADO et al., 2013). A ausência do acúmulo lipídico nos oócitos maturados *in vivo* poderia ser explicada pela possível síntese de lipídeos concomitante a sua metabolização na via de β -oxidação. Há trabalhos que demonstram que somente oócitos maturados *in vivo* mostraram correlação entre quantidade lipídica e mitocôndrias ativas, isso pode indicar adequada β -oxidação celular nesses oócitos e deficiência nos oócitos maturados *in vitro* (DEL COLLADO et al., 2013). Deve-se considerar que mesmo o oócito tendo uma capacidade adaptativa aos compostos EROS (FERREIRA et al., 2009) excessiva β -oxidação produziria quantidade maior dessas substâncias, que por sua vez, poderiam provocar danos mitocondriais (revisado por MCKEEGAN e STURMEY, 2012), levando à necessidade do uso de antioxidantes (DEL COLLADO et al., 2013).

As EROS são produzidas e encontradas em todos os sistemas biológicos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001; LUZ et al., 2011). Elas são geradas de forma fisiológica durante a respiração celular, quando o oxigênio molecular (O_2) é reduzido por elétrons liberados formando o superóxido O_2^- . A partir daí o superóxido pode ser derivado em outras moléculas formando várias EROS como o HO ou H_2O_2 (AL-GUBORY *et al.*, 2010; DEL COLLADO, 2017).

Assim, estudos sugerem que o estado redox da célula pode interferir em diversos eventos celulares, incluindo apoptose, necrose, oxidação de aminoácidos, ácidos nucleicos e ácidos graxos, principalmente os poli-insaturados presentes na membrana das células (AGARWAL et al., 2003; HOSSEINI et al., 2009). Apesar desses diversos efeitos deletérios, a membrana é um dos componentes celulares mais atingidos em decorrência da oxidação dos ácidos graxos ou peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (MELLO-FILHO et al., 1983; LUZ et al., 2011).

A peroxidação lipídica é iniciada por um radical hidroxila que abstrai um átomo de hidrogênio a partir de ácidos graxos poli-insaturados da membrana ou ácidos graxos livres resultando na formação de radical lipídico. Uma vez que o radical lipídico é formado, ele tende a estabilizar-se por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. Em condições aeróbicas, o dieno conjugado rapidamente se combina com o oxigênio formando o radical peroxil, que propaga o processo oxidativo. O radical peroxil é capaz

de retirar hidrogênio de outra molécula lipídica, gerando moléculas reativas, álcoois tóxicos, cetonas, aldeídos e ciclopentonas. As membranas das células e organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados. A fluidez da membrana relaciona-se com a presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol e danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana. Além disso, a peroxidação lipídica influi diretamente na permeabilidade da bicamada lipídica, aumentando sua permeabilidade aos íons cálcio (ISPADA et al., 2018).

O estresse do RE pode ser consequência e/ou causa do estresse oxidativo celular. Chama-se de estresse oxidativo quando a célula não possui antioxidantes suficientes para neutralizar EROS geradas pela célula (AL-GUBORY *et al.*, 2010; DEL COLLADO, 2017). A proteção adaptativa do oócito aos metabólitos da oxidação mitocondrial que são geradas no decorrer da maturação oocitária ocorre até o estágio de duas células, por meio das peroxidases e glutatonas. Essa proteção não está presente no estágio de embrião, e por isso, se a atividade mitocondrial continua sendo alta durante o desenvolvimento embrionário, e a célula não é capaz de eliminar a produção excessiva de EROS, a sobrevivência do zigoto poderá ser comprometida (FERREIRA et al., 2009; DEL COLLADO e al., 2013).

A reserva lipídica deverá prover as necessidades energéticas solicitadas nos processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, pela oxidação dos ácidos graxos para produção de ATP. Durante a oogênese, desde a progressão do folículo primordial até o estágio de metáfase II ocorrem inúmeras modificações, havendo vários momentos em que os oócitos podem acumular lipídios (STURMEY et al., 2009; DEL COLLADO et al., 2013; LIMA et al., 2015). Foi demonstrado que o acúmulo de lipídios na espécie bovina ocorre durante a MIV dos oócitos (DEL COLLADO et al., 2017b).

Existem três mecanismos possíveis de acúmulo lipídico: o aumento da síntese de lipídeos no oócito; diminuição da oxidação dos ácidos graxos, a β -oxidação; e por último a incorporação destes lipídeos desde o meio, ou desde as células do cumulus (DEL COLLADO et al., 2017). Apesar de existirem poucos relatos sobre a capacidade do oócito de sintetizar lipídeos, Auclair et al. (2013) descreveram o aumento da proteína ácido graxo sintetase durante a MIV nos oócitos, demonstrando que o oócito pode ser capaz de sintetizar ácidos graxos e do possível aumento de síntese durante a MIV. Alguns ácidos graxos, como os ácidos graxos de cadeia longa têm a capacidade de acúmulo durante a maturação oocitária (AARDEMA et al., 2011), e sua adição na MIV, na forma de ácido palmítico e esteárico, pode prejudicar a criopreservação dos blastocistos produzidos (SHEHAB-EL-DEEN et al., 2009).

Foi demonstrado que oócitos humanos e murinos com excessivo acúmulo lipídico possuem maiores níveis dos marcadores de estresse do RE (WU et al., 2010; YANG et al., 2012). Os resultados demonstram que a MIV provoca aumento de lipídeos em todo o complexo cumulus-oócito (CCOs), majoritariamente em ácidos graxos de cadeia longa, o que provocaria aumento do estresse nestas células. Os resultados também suportam a ideia de que o aumento do acúmulo lipídico consequente da MIV e a diminuição da β -oxidação, combinado com o estresse oxidativo, podem levar ao estresse do RE e a apoptose celular (DEL COLLADO et al., 2017).

O uso de estimulantes da β -oxidação durante a MIV provoca redução de acúmulo lipídico em oócitos durante a maturação e embriões em desenvolvimento, com efeitos positivos nas taxas de desenvolvimento (TAKAHASHI et al., 2013). O SFB permite boas taxas de maturação e desenvolvimento embrionário, mas oócitos maturados em meio contendo este composto apresentam diferenças frente aos maturados *in vivo* em relação à distribuição e/ou quantificação de lipídeos e mitocôndrias. Embora a redução da concentração do SFB durante a MIV permita a obtenção de taxas satisfatórias de maturação e de desenvolvimento embrionário, não há atenuação dos efeitos negativos do soro sobre a maturação citoplasmática e migração das mitocôndrias e lipídeos oocitários (DEL COLLADO et al., 2013; DEL COLLADO et al., 2016; DEL COLLADO et al., 2017).

A MIV gera CCOs metabolicamente desregulados e estressados, provoca aumento de lipídeos no CCOs, diminuição de GSH (glutathiona reduzida) e da atividade mitocondrial nos oócitos, acompanhado por desregulação massiva das vias relacionadas ao metabolismo e homeostase nas células do cumulus durante a MIV. Ainda, o sistema *in vitro* causa aumento do metabolismo da glicose, de síntese e acúmulo lipídico, além da diminuição da ativação da via de β -oxidação, e aumento do estresse celular. Como não há alterações nas vias do metabolismo lipídico nos blastocistos PIV, a possibilidade de que o acúmulo lipídico embrionário descrito nos embriões seja originário da MIV ou das fases iniciais do desenvolvimento fica evidente (DEL COLLADO et al., 2017).

2.4. A atividade da via das pentoses na produção *in vitro* de embriões

Nos embriões PIV, o excesso de estimulação da glicólise pode levar ao aumento dos precursores da síntese proteica e de lipídeos, o que favorece a formação de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas e causa o desequilíbrio do estado de redução-oxidação desses embriões. Tais eventos acarretarão distúrbio da função mitocondrial, o que resulta em acúmulo lipídico (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007a; DIAS et al., 2016).

A glicose é um dos substratos mais utilizados na produção de energia durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário pós-compactação (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), ao ser oxidada via glicólise ou via PPP (KHURANA e NIEMANN, 2000; LIMA et al., 2015). A estimulação da via PPP usando receptores de elétrons como o PES e pirrolino-5-carboxilato resulta em aumento dependente da dose na taxa de retomada meiótica e aumento do metabolismo de glicose (DOWNS et al., 1998). A via PPP também está envolvida na progressão de todos os estágios da meiose no oócito (SUTTON-McDOWALL et al., 2005; HERRICK et al., 2006; SUTTON-McDOWALL et al., 2010).

A glicose pode entrar no embrião por três mecanismos: transporte passivo por gradiente de concentração por canais de água; transporte facilitado usando membros das glicoproteínas de transporte de glicose (GLUTs) independentes de Na^+ ; e transporte ativo usando sistema portador de Na^+ (LEPPENS-LUISIER et al., 2001; SCOTT e WHITTINGHAM, 2002). Como a participação de sistemas ativos de transporte de glicose em embriões pré-implantados permanece incerta, os principais mecanismos

que direcionam glicose para o embrião podem ser via gradiente de concentração e transporte facilitado por GLUTs (PANTALEON e KAYE, 1998; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a).

O ATP é reconhecido como a moeda energética essencial para a maturação oocitária (MARTINS et al., 2007). A via PPP é menos utilizada do que as outras vias e tem como função captar glicose para a síntese de purinas ou NADPH, o que depende do processo ser oxidativo ou não. O NADPH é produzido por oxidação da glicose-6-fosfato em 6-fosfoglucoactona pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e é utilizado para promover a integridade citoplasmática durante os processos metabólicos, contribuindo para a manutenção do estado redox pela redução da glutatona em GSH (SUTTON-McDOWALL et al., 2010), promovendo assim um sistema antioxidante celular benéfico (MARTINS et al., 2007; GULART et al., 2015).

Outro produto da via PPP é o fosforibosilpirofosfato, substrato para síntese de purinas, as quais são fundamentais na síntese de nucleotídeos formadores de novos RNAm, controlando assim a maturação nuclear (SUTTON-McDOWALL et al., 2010). Finalmente, a via do polioli leva à oxidação de glicose com geração de sorbitol e frutose pelas enzimas aldo-redutase e sorbitol desidrogenase. Esses substratos são considerados fontes alternativas de energia para o oócito, embora ainda não se saiba em que circunstâncias e para quais funções elas seriam importantes (GULART et al., 2015).

Embriões PIV metabolizam grandes quantidades de glicose comprometendo sua capacidade de desenvolvimento (DIAS et al., 2017). A via de metabolização da glicose irá depender das relações ATP/ADP e NADPH/NADP existentes no citosol celular (LIMA et al., 2015). Na via glicolítica, o resultado dessa metabolização é a formação de ATP, uma vez que a relação ATP/ADP é baixa, e a relação NADPH/NADP é alta, a glicose vai ser degradada pela via glicolítica e a via PPP é inibida (DIAS et al., 2017). A ativação da via PPP ocorrerá quando a relação ATP/ADP for alta e a relação NADPH/NADP for baixa, assim, uma pequena quantidade de glicose é direcionada para ser metabolizada por essa via, resultando em ribose-5-fosfato, que é usado na produção de NADPH atuando na síntese de membranas celulares (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2011; DIAS et al., 2017). A oxidação da glicose via PPP ocorre no citosol celular e tem como principais produtos a ribose-5-fosfato e o NADPH (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007a; LIMA et al., 2015).

A ribose-5-fosfato é a pentose constituinte dos nucleotídeos que compõe os ácidos nucleicos, e de muitas coenzimas, como o ATP, NADH, FADH₂ e coenzimas (KHURANA e WALES, 1989). O NADPH, é necessário na redução das vias biosintéticas comoceptor de elétrons, participa na transformação do malato em piruvato (na síntese de ácidos graxos), e atua contrapondo os efeitos deletérios de radicais livres (WALES e DU, 1993; HARVEY et al., 2002; LIMA et al., 2015). Assim, a estimulação excessiva da glicólise pode levar ao aumento nos precursores da síntese proteica e lipídica, favorecendo a formação de lipídeos intracitoplasmáticos, juntamente com desequilíbrio no estado de oxidação-redução desses embriões, resultando em desordem da função mitocondrial, e conseqüentemente em acumulação de lipídios (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007a; DIAS et al., 2017).

A geração de pentose para síntese de nucleotídeos de purinas, pirimidinas e piridinas é uma importante função da via PPP, essa via também está envolvida na geração de equivalentes redutores (NADPH) pela ação de G6PDH e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) que desempenham papel importante na biossíntese de lipídios e de esteroides. Além disso, o NADPH, atuando através de enzimas como a NADPH oxidase, poderia modular a atividade de oxidantes, que demonstraram participar na sinalização mitogênica (DOWNS et al., 1998).

Vale ressaltar que embriões que metabolizam grande quantidade de glicose comprometem sua capacidade de desenvolvimento. Somente pequena quantidade de glicose é direcionada para a via PPP que fornece a ribose-5-fosfato, utilizada na síntese de ácidos nucleicos; e NADPH, que atua na síntese das membranas celulares, além de atuar como antioxidante (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2011; DIAS et al., 2016).

Ademais, os resultados da razão ATP/ADP demonstraram que oócitos maturados *in vitro* possuem menor atividade mitocondrial e menor metabolismo oxidativo em relação aqueles originários do processo *in vivo*. Baixos níveis de ATP/ADP estão correlacionados com o aumento da glicólise e diminuição da atividade mitocondrial (MALDONADO e LEMASTERS, 2014; DEL COLLADO et al., 2017). Assim o papel do metabolismo lipídico durante a maturação oocitária vem ganhando importância (DEL COLLADO et al., 2017).

2.5. Etossulfato de fenazina na produção *in vitro* de embriões

Técnicas que diminuam o acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos, como a remoção parcial dos mesmos por estímulo da lipólise química no citoplasma celular ou pela diminuição da captação e síntese de ácidos graxos pelas células (DIAS et al., 2016) estão sendo estudadas para melhorar a qualidade dos embriões PIV.

Estudos realizados com embriões em estágios iniciais de desenvolvimento evidenciaram que a remoção física das gotas lipídicas é capaz de aumentar a tolerância destes embriões à criopreservação. Contudo, o método de delipidação é demasiadamente trabalhoso e demorado, além de alterar o potencial de desenvolvimento dos embriões após a transferência para as receptoras. Dessa forma, os estudos têm buscado métodos não invasivos e menos laborosos, que reduzam a quantidade de lipídeos no citoplasma dos embriões bovinos PIV, melhorando assim a sua criotolerância (MARINHO et al., 2010).

Muitos agentes delipidantes são testados na tentativa de melhorar a viabilidade embrionária após o descongelamento sem prejudicar o número de embriões produzidos, dentre eles: L-carnitina, forskolin, ácido linoleico, etossulfato de fenazina (PES) e suas associações. A L-carnitina reduz a quantidade de lipídios no citoplasma embrionário, sugerindo que sua utilização pode resultar em embriões com maior resistência a criopreservação. O Forskolin, ativador farmacológico da adenil ciclase, também tem sido testado e se mostrado eficiente na redução da quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos embrionário quando usado no cultivo e melhora a criotolerância de embriões bovinos PIV (MENEGHEL et al., 2016). Durante a MIV de oócitos, ele tem sido ferramenta importante tanto na tentativa de sincronizar a maturação nuclear e citoplasmática, quanto na diminuição do conteúdo lipídico dos mesmos (FU et al., 2011;

LIMA et al., 2015). Quando vitrificados, os embriões cultivados com forskolin obtém taxa de eclosão superior ao grupo não tratado dentre diferentes soluções de vitrificação. O seu uso no cultivo de embriões PIV de bovinos da raça Nelore pode melhorar a criotolerância dos embriões (SANCHES et al., 2009), sem afetar a taxa de concepção (MENEGHEL et al., 2016).

Entretanto, a suplementação com alguns desses agentes delipidantes não afetou a qualidade, mas afetou negativamente a produção de embriões em trabalhos recentes (DIAS et al., 2016). Além disso, a suplementação com diversos agentes delipidantes se mostram promissores na melhora dos resultados à criopreservação, mas muito ainda se questiona sobre o seu momento de introdução no meio e suas consequências na qualidade ou quantidade de embriões gerados. Possibilidades que vem sendo testadas por diversos pesquisadores ao redor do mundo.

Uma alternativa que tem demonstrado ser eficaz na diminuição do conteúdo lipídico dos embriões PIV sem lesionar a zona pelúcida é o uso de reguladores metabólicos (SEIDEL Jr, 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b). A suplementação do meio de cultivo com reguladores metabólicos visa estimular a utilização dos lipídios na produção de energia necessária aos embriões ao longo do seu desenvolvimento. Dessa forma, seria possível produzir embriões de melhor qualidade, mais resistentes aos processos de criopreservação e conseqüentemente, com melhores taxas de concepção (LIMA et al., 2015).

O etossulfato de fenazina (PES) é um regulador metabólico que inibe a síntese de ácidos graxos, o que já foi demonstrado durante a PIV de embriões bovinos. O PES é capaz de equilibrar o metabolismo energético e reduzir o acúmulo de lipídios, já que este químico oxida NADPH a NADP^+ (DE LA TORRE -SANCHEZ et al., 2006a; SUDANO et al., 2011; SUDANO et al., 2013), estimulando a via das pentoses e, dessa forma, diminuindo a produção de lipídeos (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr., 2007a). O mecanismo de ação do PES no embrião pré-implantacional é baseado no uso de substrato energético prontamente metabolizável pela via glicolítica, seguido do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias para produzir energia na forma de ATP (SUDANO et al., 2013).

O PES ao oxidar o NADPH em NADP^+ ativa as duas primeiras reações enzimáticas na fase oxidativa desta via, convertendo a glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato, e o 6-fosfogluconato em ribose-5-fosfato (Figura 1) (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b). Segundo Dufrasnes et al. (1993) o uso do PES aumenta na ordem de 10 vezes a utilização da glicose, na via PPP, o que reduz a glicólise em 50%. Esta diferença ocorre provavelmente porque o NADPH é necessário para algumas vias importantes; por exemplo, além de estar envolvido na biossíntese de lipídios (WALES e DU, 1993; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b).

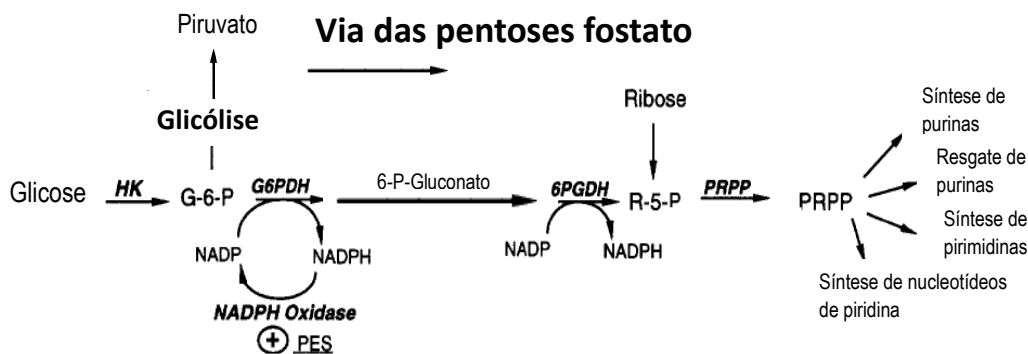


FIGURA 1 - Rota da via das pentoses e atuação do PES. A glicose é fosforilada pela hexoquinase (HK) para formar glicose-6-fosfato (G-6-P) que pode entrar na glicólise ou na via PPP. G6PDH e 6PGDH são duas enzimas da via PPP que requerem o NADP como cofator. O PES oxida NADPH a NADP⁺ e desse modo ativam as enzimas que requerem NADP da via PPP. A ribose pode alimentar a via PPP a jusante da G6PDH e ser metabolizada em ribose-5-fosfato (R-5-P). A R-5-P é convertido em PRPP pela PRPP sintetase, e a PRPP é absolutamente necessária para a geração de purinas, pirimidinas e nucleotídeos de piridina (Adaptado de Downs et al., 1998).

Assim, adição de PES no período pós-compactação estimulou a utilização da glicose pela via das PPP e, conseqüentemente, o aumento da produção e qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a; SUDANO et al., 2010).

Esse redutor foi inicialmente usado em oócitos de camundongos (DOWNS et al., 1998) e embriões bovinos (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b). Além de estimular a via PPP, mostrou diminuir a produção de lipídios (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a). Com a oxidação do NADPH, torna-o indisponível para a produção lipídica, já que esta coenzima é requerida para a biossíntese de vários lipídios, particularmente os ácidos graxos de cadeia longa (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b; SUDANO et al., 2010). De uma forma geral, o uso de PES no período pós-compactação tem demonstrado redução do acúmulo de lipídios embrionários e aumento da sobrevivência após a criopreservação (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b; SUDANO et al., 2010; SUDANO et al., 2011; SUDANO et al., 2013).

O'Fallon e Wright (1986) calcularam o metabolismo de glicose através de radiomarcadores em zigotos coletados de camundongos e cultivados com PES. Esse fármaco estimulou a via das pentose-fosfato. A atividade da via PPP variou com o estágio de desenvolvimento, sendo maior no grupo de 2 células (15,8%) e menor no blastocisto tardio (3,2%). O efeito líquido do PES foi aumentar a atividade da PPP de 12% para 71%. Ainda, demonstrou-se que o PES não exerce efeito sobre o metabolismo mitocondrial.

Em 1988, o PES foi utilizado em camundongos para avaliar o desvio da via das pentoses, à dose de 25 µM. A produção de CO₂ a partir do carbono 1 da glicose aumentou quase 5 vezes na presença de PES. O metabolismo da glutamina (que pode servir como substrato energético para embriões de mamíferos) foi significativamente reduzido em 33% na presença de PES. Por outro lado, todos os embriões cultivados na presença de 25 µM de PES retraíram no final do período de medição e não se desenvolveram, sugerindo-

se um bloqueio no nível da piruvato quinase, isto é, a última etapa glicolítica antes da formação do piruvato de blastocistos bovinos (RIEGER e GUAY et al., 1988).

Em outro trabalho o PES foi usado em camundongos na concentração de 10 μM e também aumentou a taxa de utilização de glicose pela via PPP de uma maneira dependente da dose. A via PPP foi responsável por cerca de 2% da utilização da glicose. Um a dois por cento do total de glicose metabolizada em 24 horas foi retido em macromoléculas e o PES estimulou a via das pentose-fosfato pelo menos dez vezes, apesar da redução geral de 50% na glicólise. Mas essa dose também causou a degeneração embrionária (DUFRAONES et al., 1993).

Partindo da hipótese de que a via das pentoses fosfatadas participa da indução meiótica dos oócitos de camundongos, DOWNS et al. (1998) avaliaram CCOs quanto ao rompimento da vesícula germinativa em meio enriquecido com 4 mM de hipoxantina (promove a parada meiótica) associado a doses de 0,1; 0,25; 0,5 e 1 μM de PES e verificou que o PES desencadeou um aumento dependente da dose na maturação meiótica em CCOs contendo hipoxantina em cultura de 17 a 18 horas. Estes resultados suportam a proposição de que o metabolismo da glicose pela PPP é importante no mecanismo de indução meiótica. Mais de 96% dos oócitos foram submetidos à degradação da vesícula germinativa nas concentrações mais elevadas de PES testados (1 μM) em comparação com apenas 45-52% dos oócitos do grupo Controle.

Em um segundo momento, nesse mesmo estudo, DOWNS et al. (1998) avaliou CCOs quanto ao rompimento da vesícula germinativa em meio enriquecido com 4 mM de hipoxantina associado a doses de 2,5 e 10 μM de PES e ainda analisou o conteúdo de substrato energético de glicose, piruvato e lactato. A análise do conteúdo de substrato energético no meio condicionado revelou que o consumo de glicose aumentou de 0,45 nmol/CCOs a 0 M PES para 1,11 e 1,62 nmol/CCOs a 2,5 e 10 μM , respectivamente. Isto foi acompanhado por aumentos dependentes da dose na produção de piruvato e lactato. No grupo com 2,5 μM de PES, a diferença na produção de piruvato e lactato em relação à observada na ausência do fármaco foi responsável por 67% do aumento do consumo de glicose. Esse valor aumentou para 91% a 10 μM PES. O aumento do consumo de glicose em resposta ao tratamento com PES é consistente com o estímulo da via PPP, embora o aumento coincidente na produção de lactato e piruvato sugira que porção significativa da glicose consumida seja encaminhada pela glicólise.

Uma nova tentativa de uso do PES foi feita, dessa vez com a adição de PES na concentração de 0,9 μM no D4 do cultivo, e obteve um efeito tóxico. Entretanto, doses menores de PES (0,1 e 0,3 μM) não apresentaram diferença com relação à taxa de produção de blastocisto, massa celular interna (MCI) e número de células quando comparadas com o grupo Controle (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a).

Em outro trabalho, De La Torre-Sanchez et al. (2006b) relataram que com o tratamento dos embriões PIV com 0,3 μM PES obtiveram acúmulo lipídico significativamente menor quando comparado com grupos tratados com DNP ou NaN_3 e o Controle *in vitro*. Mesmo assim, o acúmulo lipídico do grupo com PES ainda foi maior que o Controle *in vivo*, que teve menor acúmulo de lipídio citoplasmático. Gotículas lipídicas pequenas foram mais numerosas em embriões produzidos *in vivo* que em embriões PIV tratados com PES; gotículas lipídicas de tamanho médio foram mais

abundantes para PES que para embriões PIV, porém reduziram quando comparadas ao Controle *in vitro*, e as grandes gotas lipídicas eram mais escassas para embriões produzidos *in vivo* e PES. Da mesma maneira, Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007a) utilizando 0,3 μM de PES a partir do dia 2,5 do cultivo obtiveram menor acúmulo de lipídio citoplasmático quando comparado com o grupo Controle, e o grupo suplementado com 1 ou 3 $\mu\text{g/mL}$ de cerulenin.

Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2007a) relataram que a adição de PES aos meios de cultura do D2,5 teve efeito benéfico na sobrevivência dos embriões após o congelamento convencional e vitrificação, não havendo diferença entre os dois métodos. A sobrevivência de embriões foi 92, 85 e 60% dos expostos ao PES, Controle e produzidos com adição de 10% SFB; respectivamente. Fato este atribuído a redução do conteúdo lipídico citoplasmático do embrião resultante da utilização do PES no estágio de pós-compactação embrionária.

Esse mesmo grupo ainda avaliou o uso de 0,3 μM de PES, 30 μM de Dinitrofenol (DNP), suas associações e 10% de SFB no D2,5 do cultivo. O acúmulo de gotas lipídicas médias diminuiu para PES, DNP e DNP+PES, quando comparado com o Controle e SFB (62, 82, 64 vs. 119 e 266 gotículas lipídicas, respectivamente). Gotas lipídicas grandes foram mais escassas para PES e DNP que o Controle, e mais abundantes para SFB que todos os outros tratamentos. Os embriões tratados com SFB acumularam 4,3 vezes e o Controle 2 vezes mais gotículas lipídicas do que os embriões tratados com PES. Os embriões tratados com PES acumularam mais lipídios do que os embriões produzidos *in vivo*, mas menos do que o Controle *in vitro* ou o tratamento com DNP (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr., 2007b).

Ao avaliar as taxas de prenhez, nascimento e desenvolvimento pós-natal desses embriões verificou-se que o uso do PES durante a CIV não afetou as taxas de prenhez em comparação com o Controle aos 35 ou 98 dias de gestação, e não teve efeito no desenvolvimento fetal pós-natal dos bezerros nascidos. Fetos oriundos de PIV que foram abortados tiveram o desenvolvimento fetal e placentário retardado em comparação com aqueles que foram a termo, mas não houve diferença na perda fetal entre o tratamento com PES e Controle (BARCELÓ-FIMBRES et al., 2009).

Gajda et al. (2008) estudando a qualidade embrionária de embriões suínos, observaram que o uso de 0,025; 0,05 e 0,075 μM de PES em embriões no estágio de 1-2 células além de melhorar o desenvolvimento embrionário, resultou no aumento da qualidade do embrião, levando a redução de 25% da incidência de apoptose nos embriões tratados com PES. Visto que os embriões suínos contêm uma concentração consideravelmente maior de ácidos graxos do que outros embriões de mamíferos (MCEVOY et al., 2000), houve diferença entre grupo 0,025 μM PES e Controle em porcentagem de embriões clivados e doses de 0,05 μM ou 0,075 μM PES diferiram do Controle quanto a produção de blastocistos expandidos (75,5, 60 e 65,7% respectivamente). Observou-se taxas um pouco maiores de embriões, mórula e blastocistos em grupos tratados com PES em comparação com o Controle, no entanto, um número ligeiramente maior de células em blastocistos foi observado no grupo Controle. Resultados da qualidade embrionária mostraram que a apoptose teve baixa incidência em embriões cultivados com PES em comparação àqueles cultivados sem PES (GAJDA et

al., 2008). Posteriormente, a cultura de embriões suínos em meio com PES demonstrou aumentar a proporção de formação de mórula e blastocisto, reduzir o índice de fragmentação de DNA e o conteúdo lipídico citoplasmático de blastocistos cultivados. No entanto, o uso de PES durante a CIV não teve efeito significativo na sobrevivência do blastocisto suíno após a vitrificação (GAJDA et al., 2011).

Em relação à suplementação com PES na CIV, Sudano et al. (2010) relataram que embriões cultivados com 3 μ M de PES no D2,5 e D4 reduziram o acúmulo lipídico nos embriões bovinos PIV e não alterou a porcentagem de apoptose dos blastocistos frescos. No D2,5 prejudicou o desenvolvimento embrionário, não favoreceu a criotolerância, reduziu o número de células após o descongelamento, aumentou o número de células apoptóticas dos blastocistos aquecidos, produziu menos blastocistos por oócito e por estruturas clivadas do que os grupos PES D4 e Controle. No D4 o PES aumentou a taxa de sobrevivência após a vitrificação, não alterou a porcentagem de produção de blastocisto, escore do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade dos embriões. A adição de PES ao meio, tanto no D2,5 como no D4, reduziu o conteúdo de gotículas lipídicas médias e grandes. No entanto, apenas a adição de PES no D2,5 reduziu o número de pequenas gotículas e promoveu redução ainda mais pronunciada de grandes gotas. Independente da retirada de SFB ou adição de PES ao meio de cultura, o grupo Controle *in vivo* apresentou menor acúmulo de lipídios, menor taxa de apoptose e maior criotolerância. Usando apenas SFB a 2,5% e adição de PES do D4 aumentou a sobrevivência dos embriões de PIV após a vitrificação.

Nessa situação, cogitou-se que a maior exposição dos embriões ao PES, a partir do D2,5, tenha alterado o equilíbrio do estado de redução-oxidação pela possibilidade de ter atuado como NADPH oxidase provocando aumento na produção das EROS devido a oxidação do NADPH (GEISZT e LETO, 2004), uma vez que essa coenzima desempenha grande papel na redução da glutatona intracelular (GARDNER e LANE, 1997), um importante antioxidante para o embrião (RIEGER, 1992). Associado a isto, a maior sensibilidade dos embriões criopreservados às EROS (GUÉRIN et al., 2001) pode ter potencializado esse efeito e originado maior incidência de apoptose neste tratamento. Outra hipótese levantada pelo autor é a possibilidade de estar relacionada a elevada redução do conteúdo lipídico, induzida pelo PES, comprometendo a síntese das membranas celulares e desencadeando o processo de apoptose (SUDANO et al., 2010).

A capacidade de regulação do PES já foi demonstrada em relação à abundância transcricional do gene lipídico transmembrana (SGPP1) sendo maior nos embriões tratados e aumentando a capacidade de eclosão após a criopreservação. Ao avaliarem zigotos cultivados desde o D2,5 com 0,3 μ M PES, 1,5 mM L-carnitina (LC), 0,3 μ M PES + 1,5 mM LC verificou-se que o número de células foi maior nos embriões tratados com PES e PES + LC. Não houve diferenças significativas na taxa de apoptose entre os grupos. Os blastocistos tratados com o PES apresentaram maiores taxas de eclosão 45,6%, do que aqueles expostos à LC + PES (29,4%) ou ao grupo Controle (30,4%) (GHANEM et al., 2014).

Verificou-se, ainda, o efeito do PES em grupos tratados com 0,2 μ M, 0,3 μ M, 0,5 μ M PES no D2,5. A taxa de prenhez utilizando embriões criopreservados não foi alterada pelo uso do PES. Houve a redução do conteúdo lipídico no desenvolvimento embrionário

inicial e melhora na reexpansão *in vitro*. As diferentes concentrações de PES não apresentaram diferença na taxa de clivagem, produção de blastocisto ou eclosão, mas houve tendência de melhor resposta com dose de 0,3 μ M, numericamente superior no D8. A expressão dos genes estudados no experimento relacionados com a via de biossíntese dos triglicérides, não foi alterada com a suplementação do PES, indicando que os mecanismos moleculares pelos quais o PES atua reduzindo a quantidade lipídica são independentes das vias reguladas por esses genes (VAQUERO et al., 2015).

Assim, os resultados experimentais do uso do PES na PIV de embriões (Tabela 1) tem mostrado boas perspectivas de melhora na qualidade embrionária, mesmo havendo algumas controvérsias quanto ao momento da adição, mais especificamente no D2,5 (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr., 2007a; SUDANO et al., 2010; VAQUERO et al., 2015). Porém, há um consenso relativo à redução do excessivo acúmulo lipídico de embriões PIV, com conseqüente melhora na criotolerância, quando o PES foi usado durante o cultivo *in vitro*. E, em sua única experiência de uso durante a MIV também apresentou resultados promissores (DOWNS et al., 1998). Porém são necessárias mais pesquisas para compreender melhor o seu efeito na maturação e no desenvolvimento embrionário.

O presente trabalho buscou compreender se o PES, um regulador metabólico, pode atuar na diminuição do acúmulo lipídico oocitário, uma vez que ele é eficiente em atuar na redução do acúmulo lipídico durante a CIV (DE LA TORRE -SANCHEZ et al., 2006a; SUDANO et al., 2011; SUDANO et al., 2013).

TABELA 1 - Histórico do uso de etossulfato de fenazina (PES) na produção *in vitro* de embriões mamíferos.

AUTOR	ANO	DOSE	ADIÇÃO PES	CATEGORIA ANIMAL	RESULTADO DO USO DO PES
O'FALLON e WRIGHT	1986	25 µM PES	D4	Camundongo	Aumentou a atividade da via PPP de 12% para 71%.
RIEGER e GUAY	1988	25 µM PES, 50 µM DNP	D7	Holandesas	Deterioração dos blastocistos na presença de PES. Redução de 33% no metabolismo da glutamina.
DUFRESNES <i>et al.</i>	1993	10 µM PES, 50 DNP, 600 insulina	D6	Camundongo	Deterioração dos blastocistos. Aumentou a taxa de utilização de glicose pela via PPP dependente da dose em pelo menos dez vezes.
DOWNS <i>et al.</i>	1998	4 mM Hx + 0,1, 0,25, 0,5, 1 µM PES	MIV	Camundongo	Aumento de 3,6 vezes no consumo de glicose por CCOs tratados com PES. Mais de 96% dos oócitos tiveram o rompimento da vesícula germinativa nas concentrações de 1 µM.
DOWNS <i>et al.</i>	1998	4 mM Hx + 2,5 ou 10 µM PES	MIV	Camundongo	Dose de 2,5 µM teve diferença na produção de piruvato + lactato em relação à observada na ausência do fármaco e aumentou o consumo de glicose em 67%, para a dose 10 µM aumentou 91% o consumo da glicose.
DE LA TORRE-SANCHEZ <i>et al.</i>	2006a	0,9 µM PES, 0,3 µM PES, 0,1 µM PES	D4	Frigorífico Bovino	Dose 0,9 µM teve um efeito tóxico. Doses de 0,1 e 0,3 µM não teve efeito sobre a taxa de blastocistos, MCI, qualidade embrionária, ou número de células em comparação com o Controle.
DE LA TORRE-SANCHEZ <i>et al.</i>	2006b	0,3 µM PES, 27 µM NaN ₃ , 30 µM DNP	D2,5	Bovinos angus 2-9 anos	Menor acúmulo lipídico que o grupo DNP, NaN ₃ e o Controle <i>in vitro</i> , e maior que o Controle <i>in vivo</i> . Menor captação de glicose e maior glicólise. Menos grânulos lipídicos médios e grandes no citoplasma do que outros grupos. Gotículas lipídicas pequenas foram maiores em embriões produzidos <i>in vivo</i> que embriões produzidos <i>in vitro</i> .
BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr.	2007a	0,3 µM PES x 10% SFB, frutose x glicose	D2,5	Bovino	Reduziu o conteúdo lipídico citoplasmático. Melhorou a criotolerância de embriões bovinos. Não houve diferença entre vitrificação e congelamento lento. Sobrevivência pós-criopreservação de blastocistos foi de 91,9%, 84,9% e 60,2% para os grupos PES, Controle e SFB, respectivamente.

AUTOR	ANO	DOSE	ADIÇÃO PES	CATEGORIA ANIMAL	RESULTADO DO USO DO PES
BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr.	2007b	0,3 µM PES, 30 µM DNP, DNP + PES 10% SFB	D2,5	Frigorífico Bovino	O acúmulo de gotas lipídicas médias foi menor para PES, DNP e DNP+PES, que o Controle e SFB. Grupo com PES acumulou mais lipídios do que os embriões produzidos <i>in vivo</i> e menos do que o Controle <i>in vitro</i> ou o tratamento com DNP. Gotas lipídicas grandes diminuíram para PES e DNP, e foram maiores para SFB que todos os outros tratamentos.
BARCELÓ-FIMBRES <i>et al.</i>	2009	0,3 µM PES	D2,5	Frigorífico Bovino	Não afetou as taxas de prenhez. Não teve efeito no desenvolvimento fetal pós-natal. Não houve diferença na perda fetal entre o tratamento com PES e Controle.
GAJDA <i>et al.</i>	2008	0,025 µM PES, 0,05 µM PES, 0,075 µM PES	D2,5	Suíno	Redução da incidência de apoptose. Maior porcentagem de embriões clivados na dose de 0,025 µM PES (99%). Doses de 0,05 ou 0,075 µM PES diferiram do Controle quanto a produção de blastocistos (75,5, 60 e 65,7%, respectivamente).
SUDANO <i>et al.</i>	2010	0,3 µM PES	D2,5 D4	Frigorífico Nelore	No D2,5 prejudicou o desenvolvimento embrionário, não favoreceu a criotolerância e reduziu a média do número de gotas lipídicas pequenas, médias e grandes. No D4 aumentou a taxa de sobrevivência pós-vitrificação, reduziu a ocorrência de apoptose e o acúmulo lipídico citoplasmático das gotas médias e grandes.
GAJDA <i>et al.</i>	2011	0,05 µM PES	D2	Suíno	Aumentou a produção de mórula, de blastocisto, o número total de células de blastocistos e diminuiu o número de núcleos apoptóticos e o conteúdo lipídico citoplasmático para cerca de 70% do Controle, mas sem efeito significativo após a criopreservação.
GHANEM <i>et al.</i>	2014	0,3 µM PES, 1,5 mM LC, 0,3 µM PES + 1,5 mM LC	D2,5	Vacas Coreanas nativas	Grupo PES teve maior taxa de eclosão pré e pós-criopreservação (45,6%) do que aqueles expostos à LC + PES (29,4%) ou ao grupo Controle (30,4%). Os genes reguladores de enzimas formadoras de gotículas lipídicas foram regulados negativamente no grupo LC + PES em comparação com o grupo Controle.
VAQUERO <i>et al.</i>	2015	0,2 µM, 0,3 µM, 0,5 µM PES	D2,5	Frigorífico Holandesas	A taxa de gestação de embriões criopreservados não foi alterada. Houve redução do conteúdo lipídico e melhora na reexpansão <i>in vitro</i> .

* Todos os trabalhos relacionados possuíam grupo Controle, sem adição de qualquer modulador do metabolismo. CCOs: Complexo cumulus-oócitos. D: dia. DNP: Dinitrofenol. Hx: Hipoxantina. LC: L-Carnitina. PES: Etossulfato de fenazina. MCI: Massa Celular Interna. MIV: Maturação *in vitro*. SFB: Soro Fetal Bovino.

3. HIPÓTESE

O PES utilizado durante a maturação oocitária diminui o acúmulo excessivo de gotículas lipídicas nos oócitos e conseqüentemente nos embriões *in vitro*, melhorando a qualidade e sobrevivência embrionária após a vitrificação.

OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Aferir o efeito de diferentes doses do fármaco etossulfato de fenazina (PES) durante a MIV de oócitos bovinos, avaliando suas conseqüências nas estruturas cultivadas *in vitro* até o descongelamento dos embriões vitrificados.

3.2. Objetivo específico

Avaliar a concentração de PES mais indicada para ser utilizada no meio de maturação de oócitos bovinos com base no índice apoptótico, na maturação nuclear e no acúmulo lipídico oocitário.

Averiguar nos embriões gerados a taxa de clivagem no dia 3, o estágio de desenvolvimento no dia 7, o número total de células, a taxa de apoptose, a MCI, a concentração de gotas lipídicas e a taxa de eclosão dos embriões vitrificados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-reitora de Pesquisa da Universidade Federal de Lavras pelo protocolo n° 075/18.

4.1. Local do experimento

Os ovários foram obtidos em um frigorífico comercial da região de Belo Horizonte – MG de novembro de 2018 a fevereiro de 2019. As demais etapas de produção dos embriões ocorreram no laboratório de pesquisa do Cenatte Embriões, R. Dr. Rocha, 1429 - Centro, em Pedro Leopoldo – MG, e parte das análises foram realizadas em parceria com o Laboratório Numpex-Bio da UFRJ, estrada de Xerém, 27 – Duque de Caxias-RJ.

4.2. Delineamento experimental

Foram avaliados os efeitos da suplementação do meio MIV com PES nas concentrações 0; 0,16; 0,4; 1 e 2,5 μM , diluídos em água miliQ até atingir as concentrações desejadas. Para cada grupo de tratamento previsto foram utilizados uma média de 550 CCOs. Em cada dia de coleta os oócitos foram distribuídos equitativamente de acordo com a qualidade (Graus I e II) aos diferentes tratamentos.

4.3. Procedimentos

Os ovários bovinos foram coletados no frigorífico e transportados para o laboratório. Os ovários foram mantidos em solução salina fisiológica (0,9% NaCl) a 37

°C durante todo o período de espera. As punções foliculares foram realizadas com seringa de 10 mL acoplada a uma agulha 18-G. Os CCOs foram aspirados de folículos antrais com 3 a 8 mm de diâmetro. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL, deixado em decantação por 15 minutos para posterior lavagem e seleção dos oócitos. O pellet formado foi transferido para placas de cultivo celular de 100 x 20 mm contendo soro fisiológico tamponado com fosfato (DMPBS) adicionado de 10% de SFB para busca, avaliação e seleção dos CCOs sob estereomicroscópio (Nikon, SMZ645, Japão). Aqueles CCOs aptos, avaliados como grau I ou grau II, de acordo com a classificação proposta pelo Manual da IETS – *International embryo transfer Society* (WRIGHT, 2009), foram lavados em três gotas de meio de lavagem contendo *Tissue Culture Medium* (TCM) 199 Hepes suplementado com 0,2 mM piruvato, 5 mg/mL albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos, e 75 µg/mL amicacina, em seguida foram armazenados à temperatura variando de 37 a 38 °C até serem submetidos à maturação *in vitro*.

4.3.1. Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados foram colocados em meio TCM 199 com sais de Earl's, suplementado com 0,075 mg/mL de amicacina, 5 mg/mL BSA, 0,01 UI/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) e 10% de SFB acrescido de PES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) nas concentrações 0; 0,16; 0,4 e 1 µM. Os oócitos foram maturados de forma convencional, durante 24 h a 38,5 °C e 20% CO₂. A maturação ocorreu em tubos de cultivo celular na proporção de 10 µL de meio de maturação por CCOs adicionado no meio, cobertos por óleo mineral.

4.3.2. Análise da maturação oocitária e gotas lipídicas

A análise das gotas lipídicas e da maturação oocitária foram realizadas em todos os grupos, 10 oócitos por grupo tratado em 5 réplicas foram selecionados aleatoriamente durante as repetições do experimento e fixados em paraformaldeído 4%. Após a maturação, os CCOs foram desnudados em meio tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*, Sigma-Aldrich®), contendo 0,1% de álcool polivinílico (PVA - Sigma-Aldrich®) em vórtex por 10 minutos e lavados três vezes em microgotas de meio PBS/PVA aquecido a 37 °C. Os oócitos desnudos foram, então, imersos em paraformaldeído 4% por 1 hora. Posteriormente, os oócitos foram lavados em três microgotas de PBS/PVA e armazenados a 4 °C em tubos tipo eppendorf com 500 µL de PBS/PVA.

Essas amostras foram coradas com 9-dietilamino-5H-benzo [α] fenoxazina-5-ona, Nile Red (NR, Sigma Aldrich, N3013-100MG), um corante à base de fenoxazina, para avaliação em microscópio óptico de fluorescência (Leica DMI 6000; Leica Microsystems) de gotas lipídicas. A solução de NR a 1 mg/mL em acetona foi preparada como uma solução estoque, diluída à 20 µg/mL em PBS para preparar uma solução de trabalho NR. Para a coloração de NR, os oócitos foram lavados em PBS contendo 0,001% de TritonX-100 (Sigma Aldrich). Os oócitos fixos foram transferidos para solução de trabalho NR por 1 hora à temperatura ambiente em atmosfera úmida.

Após o período de incubação, os oócitos foram lavados uma vez em PBS contendo 0,001% de TritonX-100, corados por 5 minutos em 4'6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), lavados três vezes em PBS contendo 0,001% de TritonX-100, repassados para uma lâmina, imersos em meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, EUA) e recobertos com lamínula para observação em microscópio de fluorescência. Em cada oócito foi observado a presença de gotas lipídicas, visualizados em filtro verde com fluorescência na faixa de excitação/emissão 460-500/512-542 nm e em filtro vermelho com faixa de excitação/emissão 515-560/590. Para obtenção de toda a estrutura tridimensional do oócito, as imagens de microscopia foram adquiridas considerando pelo menos três planos focais de aproximadamente 3 micrômetros de distância entre as microfotografias. A taxa de maturação foi realizada por meio de observação dos núcleos dos oócitos corados com DAPI e visualizados em filtro azul com fluorescência na faixa de excitação/emissão 340/488 nm. Os oócitos foram classificados quanto à presença da vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase I (M1), anáfase-telófase (A) e metáfase II (M2).

O software Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) foi utilizado para calcular a média de intensidade de fluorescência para todos os pixels da região de interesse (ROI). Portanto, em cada amostra, um ROI contendo todo o oócito foi selecionado e as intensidades de NR do ROI foram obtidas tanto para o filtro verde, quanto para o vermelho. Ainda se avaliou o tamanho e localização das gotas lipídicas presentes nos oócitos e o diâmetro dos oócitos maturados com o PES.

Foram corados com NR de 35 - 50 oócitos por grupo tratado. As médias de intensidade de fluorescência dos oócitos fixados após a maturação com PES foram avaliadas em dois filtros com intensidades de excitação e emissão distintos, filtro verde captava prioritariamente triglicerídeos; filtro vermelho, fosfolipídios e colesterol, de acordo com suas diferentes faixas de emissão (ROMEK et al., 2011).

O NR é um corante à base de fenoxazona que fluoresce em lipídeos hidrofóbicos (GREENSPAN e FOWLER, 1985; MELO et al., 2011). O corante é muito solúvel nos lipídios, e não interage com nenhum constituinte de tecido (GREENSPAN et al., 1985). As gotículas são lipídios neutros, geralmente triacilgliceróis ou ésteres de colesterol. Os primeiros servem como reservas de energia de ácidos graxos e os últimos funcionam como depósitos de armazenamento para excesso de colesterol celular (GREENSPAN et al., 1985). Os fosfolipídios influenciam as propriedades físicas das membranas biológicas, diferentes tipos de fosfolipídios regulam a maturação do oócito, a relação entre a fosfatidilcolina e AMPc, bem como a atividade da adenilato ciclase (HOMA et al., 1986; ROMEK et al., 2011). Por suas importâncias fisiológicas essas classes de lipídios foram avaliadas separadamente.

Na técnica de coloração com o NR, a quantidade de luz fluorescente emitida é correlacionada com o conteúdo lipídico. Ela é altamente sensível e tem repetibilidade (FERGUSON e LEESE, 1999; KIM et al., 2001) onde um único oócito ou embrião pode ser analisado (GENICOT et al., 2005). Existem outras técnicas para medir o conteúdo lipídico, como a cromatografia gasosa, o corante Sudan Black, porém cada uma analisa apenas parte do embrião, ou há a necessidade de utilização de vários embriões para um

único resultado (ACCORSI, 2008), neste caso conseguimos fazer a avaliação individual dos blastocistos para cada item analisado.

O espectro de emissão do NR muda para comprimentos de onda mais curtos diminuindo a polaridade do solvente (DUTTA et al., 1996; GHONEIM et al., 2000; MUKHERJEE et al., 2007; ROMEK et al., 2011). Portanto, NR é adequado para distinguir e quantificar os tipos lipídicos com vários graus de polaridade, como os triglicerídeos, colesterol e fosfolipídios presentes em gotículas lipídicas de oócitos e embriões (MCEVOY et al., 2000; ROMEK et al., 2011). Além disso, a fluorescência provou ser muito específica para gotículas lipídicas e nenhuma fluorescência foi observada no citosol ou no compartimento nuclear neste trabalho e em outros avaliados (GENICOT et al., 2005). Portanto, utilizou-se diferentes filtros com faixas de excitação e emissão distintas para detecção de triglicerídeos (filtro verde) e outra para detecção de fosfolipídios e colesterol (filtro vermelho).

4.3.3. Fertilização *in vitro*

Após 24 horas da retirada dos oócitos do folículo, os oócitos foram fecundados *in vitro* (FIV, D0) com sêmen de uma única partida de um único touro *bos indicus* previamente testado no laboratório. O sêmen foi avaliado quanto à sua concentração, motilidade e vigor antes de ser utilizado. Somente doses com motilidade igual ou superior a 50% e vigor igual ou superior a 3,0 foram trabalhadas.

O descongelamento da palheta de sêmen foi realizado em banho-maria a 37 °C por 45 segundos e a motilidade espermática avaliada em seguida pela técnica da câmara de Neubauer. Para lavagem e seleção espermática, a dose de sêmen foi depositada sobre a superfície do gradiente Select Sperm[®], gradiente de separação espermática com sílica, previamente estabilizado em estufa para ambientação. O gradiente select sperm foi preparado com 500 µL de select sperm 90% e 500 µL de select sperm 45% (diluído com meio CAP, composto por meio tamponado com HEPES Tyrode, suplementado com 0,2 mM piruvato e 75 µg/mL amicacina) colocados em ordem crescente em eppendorf.

O microtubo foi levado à microcentrífuga por 5 minutos a 5000g. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionado 1000 µL de meio de fertilização (meio FIV, composto por TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL BSA, 0,2 mM piruvato, 30 µg/mL heparina, 20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina, 1 µM epinefrina, 75 µg/ml amicacina) previamente estabilizado em estufa com 5% de CO₂ a 38,5 °C. O microtubo foi novamente centrifugado por 3 minutos a 1500g e o sobrenadante descartado, restando aproximadamente 30 µL de sêmen no microtubo. Uma amostra deste sêmen foi diluída e homogeneizada numa concentração de 2% em água destilada para avaliação espermática na câmara de Neubauer. Os critérios empregados na avaliação da viabilidade espermática foram a motilidade, o vigor e a concentração. Foi então adicionado meio FIV sobre o pellet de sêmen até a diluição necessária a partir da concentração avaliada pela câmara de Neubauer para atingir a concentração de 25 x 10⁶ espermatozoides/mL (OLIVEIRA et al., 2014), considerando que a dose inseminante era de 5 µL.

Durante a centrifugação do sêmen, os oócitos já maturados foram lavados duas vezes no meio CAP e uma vez em meio FIV e posteriormente transferidos para as gotas do meio FIV (70 µL) cobertas com óleo mineral em placas de Petri de 35 x 10 mm. O processo de fertilização dos oócitos foi realizado por um período de 18 a 23 horas a 38,5 °C em 5% de CO₂ e umidade saturada em meio FIV. Em cada gota de fecundação foram colocados aproximadamente 20 oócitos.

4.3.4. Cultivo *in vitro*

Após a fecundação, os presumíveis zigotos foram desnudados com o uso de micropipeta para remover as células do cumulus circundante e os espermatozoides associados. Após o desnudamento as estruturas foram lavadas duas vezes em meio CAP e por último em meio de cultivo (meio CIV) contendo Meio Fluido de Oviduto Sintético – SOFaa, suplementado com 2,7 mM mio-inositol, 0,2 mM piruvato, 5 mg/mL BSA, 75 µg/mL amicacina. Em seguida, foram transferidas para placas com microgotas contendo 5 µL de meio CIV por oócito, coberto com óleo mineral.

Durante todo o cultivo, as placas contendo os embriões foram colocadas em estufa de cultivo contendo mistura gasosa de 5% de O₂, 5,5% de CO₂ e 90% de N₂, com temperatura de 38,5 °C e umidade saturada. No dia 3 (D3) foi retirado 50 µL de meio de cada microgota e adicionado 50 uL de meio CIV acrescido de 6% de SFB, avaliado a taxa de clivagem em relação ao número de oócitos maturados e retirado aqueles oócitos que não clivaram. No dia 5 (D5) foi retirado 50 µL de meio de cada microgota e adicionado 50 uL de meio CIV acrescido de 3% de SFB. A produção de blastocistos foi avaliada no dia 7 (D7) e no dia 8 (D8) em relação ao número de embriões maturados. Após a classificação dos embriões no D7 de acordo com o proposto pelo Manual da IETS (WRIGHT, 2009), os blastocistos grau I foram vitrificados para posterior descongelamento e análise de sobrevivência.

4.3.5. Vitrificação e descongelamento dos embriões

Foi utilizada a técnica two-step para a vitrificação dos blastocistos. Os blastocistos foram selecionados morfológicamente em D7, lavados três vezes em meio CAP à 38,5 °C. Os embriões foram subsequentemente transferidos para o meio de vitrificação 1 [Vit 1, meio TCM 199 suplementado com 10% etilenoglicol, 10% dimetil-sulfóxido (DMSO), 0,005 g/mL BSA e 10 µg/mL gentamicina] à 38,5 °C, durante 1 minuto. Em seguida foram transferidos para o meio de vitrificação 2 (Vit 2, meio TCM 199 suplementado com 20% Etilenoglicol, 10% DMSO, 0,005 g/mL BSA, 1M sacarose e 10 µg/mL gentamicina) à 37 °C, durante 20 segundos. Logo depois os blastocistos foram pipetados, totalizando o volume máximo de 1 µL (embriões e meio de vitrificação), e depositados na extremidade da haste de polipropileno de 0,7 mm de espessura (totalizando no máximo 5 embriões de cada tratamento por haste), 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 proceder com o descongelamento as hastes, contendo os embriões de todos os tratamentos, foram retiradas do botijão de estocagem e colocadas em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido. A extremidade das hastes contendo os embriões foram imersas na primeira solução de descongelamento, composta por 60% de Vit SM (meio TCM 199 suplementado com 0,005 g/mL BSA e 10 µg/mL gentamicina à temperatura ambiente) e 30% de Vit W (meio TCM 199 suplementado com 0,005 g/mL BSA, 1M sacarose e 10 µg/mL à temperatura ambiente) durante 5 minutos para iniciar o processo de remoção dos crioprotetores. Em seguida, estes embriões eram transferidos para a segunda solução de descongelamento, 100% Vit SM quando permaneceram por 5 minutos e para finalizar, na solução final de descongelamento Vit SM por 3 minutos (LIMA et al., 2015). Posteriormente, eles foram cultivados em meio CIV por 48 horas à 38,5 °C sob 5,5% de CO₂ para avaliação de reexpansão e eclosão, dessa forma foi avaliada a taxa de sobrevivência *in vitro* às 24 e 48 horas após descongelamento.

4.3.6. Quantificação do conteúdo lipídico intracelular

Amostras de blastocistos antes e após o descongelamento de todos os grupos foram selecionadas aleatoriamente durante as repetições do experimento, fixados em paraformaldeído à 4% durante 30 minutos. Em seguida as amostras foram coradas com NR para avaliação em microscópio óptico de fluorescência. A solução de NR, marcação e visualização foi realizada da mesma forma já descrita no item 4.3.2. “Maturação oocitária e gotas lipídicas”.

A quantificação das gotas lipídicas foi avaliada por intensidade de fluorescência com o auxílio do software Image J[®]. Calculou-se a intensidade média de fluorescência para todos os pixels da ROI. Portanto, em cada amostra, uma ROI contendo todo o embrião foi selecionado e os espectros de NR da ROI foram obtidos tanto para o filtro verde, quanto para o vermelho. A contagem de células considerada era apenas daquelas que estavam dentro da ROI, garantindo que essa área estaria 100% no embrião, e desconsiderado o background do oócito.

4.3.7. Imunocitoquímica e índice apoptótico embrionário

Amostras de blastocistos expandidos antes (BX D7) da vitrificação e após o descongelamento (BX D9) foram submetidos à análise de imunocitoquímica para avaliar a quantidade de células totais, índice de células da MCI, apoptose de células totais e da MCI nos embriões. Foram realizadas as análises de imunocitoquímica, para quantificar a MCI (utilizando o anticorpo anti-SOX2), e de marcação nickend com dUTP mediada pela desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL) para quantificar a fragmentação do DNA nas células embrionárias (TUNEL positivas), utilizando o kit comercial DeadEnd Fluorometric TUNEL System[®] (Promega, Madison, WI, EUA). Os mesmos embriões foram utilizados para a realização de ambas as análises.

Para a avaliação de toda a estrutura tridimensional do embrião, as imagens de microscopia de fluorescência foram adquiridas considerando pelo menos três focos de aproximadamente 3 micrômetros de distância entre as microfotografias. O ensaio de TUNEL detecta a fragmentação de DNA das células apoptóticas por incorporação

catalítica de fluoresceína-12-dUTP em 3'-OH do DNA. É projetado para a detecção específica e quantificação de células apoptóticas numa população de células.

Os blastocistos foram lavados três vezes em PBS-PVA e fixados em paraformaldeído 4% à temperatura ambiente por meia hora e armazenados a 4 °C em microtubos com 250 µL de PBS-PVA. No momento das análises, os embriões foram lavados três vezes por 5 min em PBS com 0,3% de Triton X-100. Após as lavagens foi realizado o bloqueio com 5% de soro normal de cabra (NGS, Sigma-Aldrich) durante 30 minutos e incubadas com o anticorpo primário anti-SOX2, IgG de coelho (1:200, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) durante a noite em geladeira à 6 °C. No dia seguinte os embriões foram lavados três vezes em 0,3% PBS -TritonX-100 durante 5 minutos e incubados com o anticorpo secundário cy3 anti-IgG de coelho (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluído 1:600 em PBS-TritonX-100 0,3%, por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida. Posteriormente, os embriões foram lavados com PBS-TritonX-100 0,3%, e então submetidos ao ensaio de TUNEL.

Para este ensaio os embriões foram lavados e incubados em tampão de equilíbrio por 5 a 10 minutos. No Controle positivo, eles foram pré-incubados com enzima DNase, mimetizando o processo de morte celular. Em seguida, foram incubados em uma solução contendo tampão de equilíbrio, mix de nucleotídeo e enzima recombinante terminal deoxynucleotidyl transferase (rTdT) e corante de fluoresceína-12-desoxiuridina-5'-trifosfato por 1 hora à temperatura ambiente em câmara úmida. No Controle negativo, os oócitos foram incubados na ausência da enzima rTdT.

Seguidamente foram realizadas três novas lavagens com PBS-Triton 0,01% antes da adição de 0,1% de DAPI por 5 minutos e montados em lâminas contendo Vectashield (Vector Laboratories). Foi utilizado o microscópio óptico de fluorescência, utilizando objetiva de 20x para a captura das imagens. A quantificação do número total de células, células da MCI e células apoptóticas foram realizadas usando software LAS AF[®] (2.6.3, Leica, Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). O número de células positivas para SOX-2 (células da MCI) e para TUNEL (células em apoptose) foram calculados em relação ao número total de células coradas pelo DAPI.

4.4. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas, utilizando-se o software SAS[®] (Statistical Analysis System, versão 9.3, SAS Inst., Inc., Cary, NC, USA). Os efeitos da suplementação do meio MIV com o PES nas concentrações 0; 0,16; 0,4 e 1,0 µM e das réplicas foram avaliados sobre a taxa de clivagem, a proporção de embriões bovinos produzidos e a taxa de sobrevivência após a vitrificação através das taxas de eclosão e de expansão. Os dados foram submetidos à análise de variância (PROCGLM) e ao procedimento de modelo linear generalizado (GENMOD), após testes de normalidade sob o procedimento UNIVARIATE do SAS[®].

Os dados de média de intensidade de fluorescência dos oócitos e embriões foram submetidos a análise de distribuição e constatada sua distribuição como de Poisson. Para os oócitos o efeito de tratamento foi analisado por meio do procedimento de modelos lineares generalizados e as médias comparadas pelo método de Student com significância

de 5%. Para os embriões foi aplicada a análise de modelos lineares generalizados sendo considerados os efeitos de tratamento, dia, interação e suas médias foram comparadas por contraste a 5% de probabilidade.

As análises dos dados de TUNEL e SOX também foram analisados como modelos lineares generalizados. Os efeitos de tratamento, dia, sua interação sobre SOX e sua interação sobre TUNEL foram analisados como modelo linear generalizado com distribuição de Poisson e função logit. Para a avaliação do DAPI foi utilizado a análise de variância, após normalização dos dados com a remoção de um outlier e submetido a análise de variância pelo procedimento GLM e as médias comparadas pelo teste T de student. As relações entre esses parâmetros tiveram distribuição de Poisson e foram avaliadas como modelos lineares generalizados, exceto para a relação TUNEL/DAPI em que a distribuição foi normal, sendo assim esses dados foram avaliados por análise de variância PROC GLM.

As análises de fase da maturação, tamanho (pequenos, médios e grandes) e distribuição das gotas lipídicas foram feitas utilizando o teste de qui quadrado após avaliação da distribuição dos dados que foram caracterizados como de Poisson. Em todas as avaliações $P < 0,05$ foi considerado significativo e $0,05 < P < 0,10$ tendência.

5. RESULTADOS

5.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos maturados com etossulfato de fenazina

Inicialmente os efeitos da suplementação do meio MIV com o PES seriam avaliados nas concentrações 0; 0,16; 0,4; 1 e 2,5 μM . Contudo a maior dose não produziu nenhum embrião no dia 7 (D7) de cultivo, e 1 embrião grau I no dia 8 (D8), ao fim de 2 réplicas realizadas com 70 oócitos maturados em meio MIV adicionado de 2,5 μM de PES. Com isso optou-se pela não continuidade dessa dose e o experimento foi realizado avaliando-se as concentrações 0; 0,16; 0,4 e 1 μM .

Cada grupo testado teve em média 550 CCOs maturados, num total de 13 réplicas realizadas de novembro de 2018 a fevereiro de 2019. A partir de 2232 oócitos, produziu-se 815 embriões, vitrificou-se 400, destes 181 estavam vivos após 48 horas de cultivo (D9), 62 blastocistos expandidos e 119 blastocistos eclodidos. As proporções de embriões produzidos entre as réplicas ($P < 0,01$) variaram de 23,5% a 51,0%, sendo a produção média de todas as réplicas $35,6\% \pm 1,4$. Duas réplicas foram excluídas das análises devido à produção do Controle não atingir 25% e não obter amostras de todos os grupos tratados para serem fixadas (Tabela 2).

TABELA 2 – Histórico da produção *in vitro* de embriões bovinos ($P < 0,0001$) durante o período de novembro de 2018 a fevereiro de 2019 por réplica.

Réplica	Oócitos	Embriões	Embriões (%)	Vitrificado	Vivo D9	Sobrevivência (%)
06/11/2018	160	40	25,2 ^{bc}	20	2	10
22/11/2018	156	64	41 ^{ab}	20	12	60
26/11/2018	159	40	25,5 ^{bc}	12	5	41,6
29/11/2018	130	50	35,8 ^{abc}	23	4	17,4
05/12/2018	126	40	33,6 ^{abc}	23	18	78,2
10/01/2019	231	88	38,2 ^{abc}	45	9	20
30/01/2019	111	26	23,5 ^c	17	9	52,9
04/02/2019	228	88	38,5 ^{abc}	41	24	58,5
06/02/2019	149	40	26,5 ^{bc}	16	9	56,2
08/02/2019	170	64	41 ^{ab}	42	15	35,7
11/02/2019	187	78	41 ^{ab}	44	17	38,6
14/02/2019	227	115	51 ^a	58	33	56,8
18/02/2019	198	82	41 ^{ab}	39	24	61,5
TOTAL	2232	815		400	181	45,2

^{abc}Médias dos quadrados mínimos com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem $P < 0,01$. *Duas réplicas foram excluídas das análises pois o Controle não atingiu 25% de embriões produzidos.

Os blastocistos em D7 com qualidade para serem vitrificados foram 400. Destes, 373 foram aquecidos, 61,4% estavam vivos após 24 horas e 49,9% sobreviveram ao fim de 48 horas de descongelamento. Os 181 embriões vivos no D9 do desenvolvimento foram fixados para as demais análises tanto na fase de blastocisto expandido (34%) quanto na fase de blastocisto eclodido (66%).

A proporção de oócitos que clivaram no D3 ($P < 0,04$) foi maior para o grupo Controle e menor para os grupos tratados com PES. A proporção de embriões bovinos produzidos após adição de PES na maturação ($P < 0,01$) foi maior para o grupo Controle ($C = 41,5 \pm 1,8$, $n = 237$) em relação ao PES 0,16 ($32,5 \pm 1,7$, $n = 182$) e PES 1 ($32,6 \pm 1,7$, $n = 186$), mas não diferiu do PES 0,4 ($35,6 \pm 1,7$, $n = 210$). Os grupos tratados não diferiram entre si (Tabela 3).

Os embriões grau I tiveram efeito de réplica (referente às baterias de produção de cada semana, $P < 0,01$) mas sem efeito de tratamento ($P = 0,23$) variando de 23 a 27% entre grupos, do total de oócitos maturados. Quanto aos embriões grau II e III o mesmo padrão se seguiu, houve efeito da réplica ($P < 0,01$), mas não de tratamento ($P = 0,48$) (Tabela 3).

TABELA 3 - Produção *in vitro* de embriões bovinos (média dos quadrados mínimos \pm erro padrão) e diferentes concentrações de etossulfato de fenazina (PES).

Parâmetro	Controle	PES 0,16	PES 0,4	PES 1	P	
					TTT	réplica
Oócitos	566	548	565	553		
Clivagem (%)	68,5 \pm 2,5 ^a	58,7 \pm 2,4 ^b	60,7 \pm 2,4 ^b	60,6 \pm 2,4 ^b	0,04	0,36
Embriões (%)	41,5 \pm 1,8 ^a	32,5 \pm 1,7 ^b	35,6 \pm 1,7 ^{ab}	32,6 \pm 1,7 ^b	<0,01	<0,01
Embriões grau I (%)	27,6 \pm 1,7	23,7 \pm 1,6	25 \pm 1,6	23 \pm 1,6	0,23	<0,01
Embriões grau II/III (%)	12,6 \pm 1,8	8,6 \pm 1,8	10,8 \pm 1,8	11 \pm 1,8	0,48	0,01
Taxa sobrevivência (%)	52,3 \pm 7,4	49,2 \pm 7,6	48,8 \pm 7,3	52 \pm 7,3	0,12	
Taxa de expansão (%)	24,3 \pm 5,6 ^a	27,1 \pm 5,2 ^a	10,3 \pm 2,0 ^b	17,7 \pm 3,5 ^{ab}	0,02	
Taxa eclosão (%)	27,2 \pm 5,7	22,4 \pm 5,8	32,4 \pm 5,6	34,3 \pm 5,6	0,10	

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma linha, diferem ($P < 0,05$). Grau de qualidade embrionária - Escore: Grau I (excelente); Grau II (regular); Grau III (pobre). TTT: efeito de tratamento. Taxa sobrevivência avaliada até 48h após o descongelamento. Valores representam a média dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

A taxa de sobrevivência após 48 horas de descongelamento ($P = 0,12$) não diferiu ($C = 52,3 \pm 7,4$, $n = 52$; $PES 0,16 = 49,2 \pm 7,6$, $n = 36$; $PES 0,4 = 48,8 \pm 7,3$, $n = 49$; $PES 1 = 52 \pm 7,3$, $n = 44$). A taxa de expansão foi diferente para o grupo PES 0,4 ($10,3 \pm 2$, $n = 10$) em relação ao Controle ($24,3 \pm 5,6$, $n = 20$) e o PES 0,16 ($27,1 \pm 5,2$, $n = 20$), mas não diferiu do PES 1 ($17,7 \pm 3,5$, $n = 12$). A taxa de eclosão ($P = 0,10$) nesse período tendeu a ser maior para os tratamentos PES 0,4 ($32,4 \pm 5,6$, $n = 38$) e PES 1 ($34,3 \pm 5,6$, $n = 32$), menor para PES 0,16 ($22,4 \pm 5,8$, $n = 17$) e para o grupo Controle ($27,2 \pm 5,7$, $n = 13$) (Tabela 3).

5.2. Efeitos do etossulfato de fenazina nos oócitos

5.2.1. Efeito etossulfato de fenazina nas gotas lipídicas

A concentração de triglicerídeos foi três vezes maior no Controle (1.014.896,6; $n = 50$) comparado aos tratados com PES ($P < 0,0001$). A quantidade de triglicerídeos nos oócitos do PES 1 (229.836,2; $n = 35$) foram os menores, juntamente com PES 0,16 (246.202,4; $n = 45$). Os triglicerídeos do PES 0,4 (317.056,7; $n = 41$) não diminuiu comparado ao grupo PES 0,16, mas o PES 1 teve maior capacidade de reduzir a concentração de triglicerídeos comparado ao PES 0,4 (Figura 2).

Os fosfolipídios e colesterol estavam em maior quantidade no Controle (1.402.506,1; $n = 50$) comparado aos demais grupos tratados com PES ($P < 0,0001$). Entre os oócitos maturados com PES não houve diferença na redução de fosfolipídios e colesterol das amostras analisadas (Figura 2).

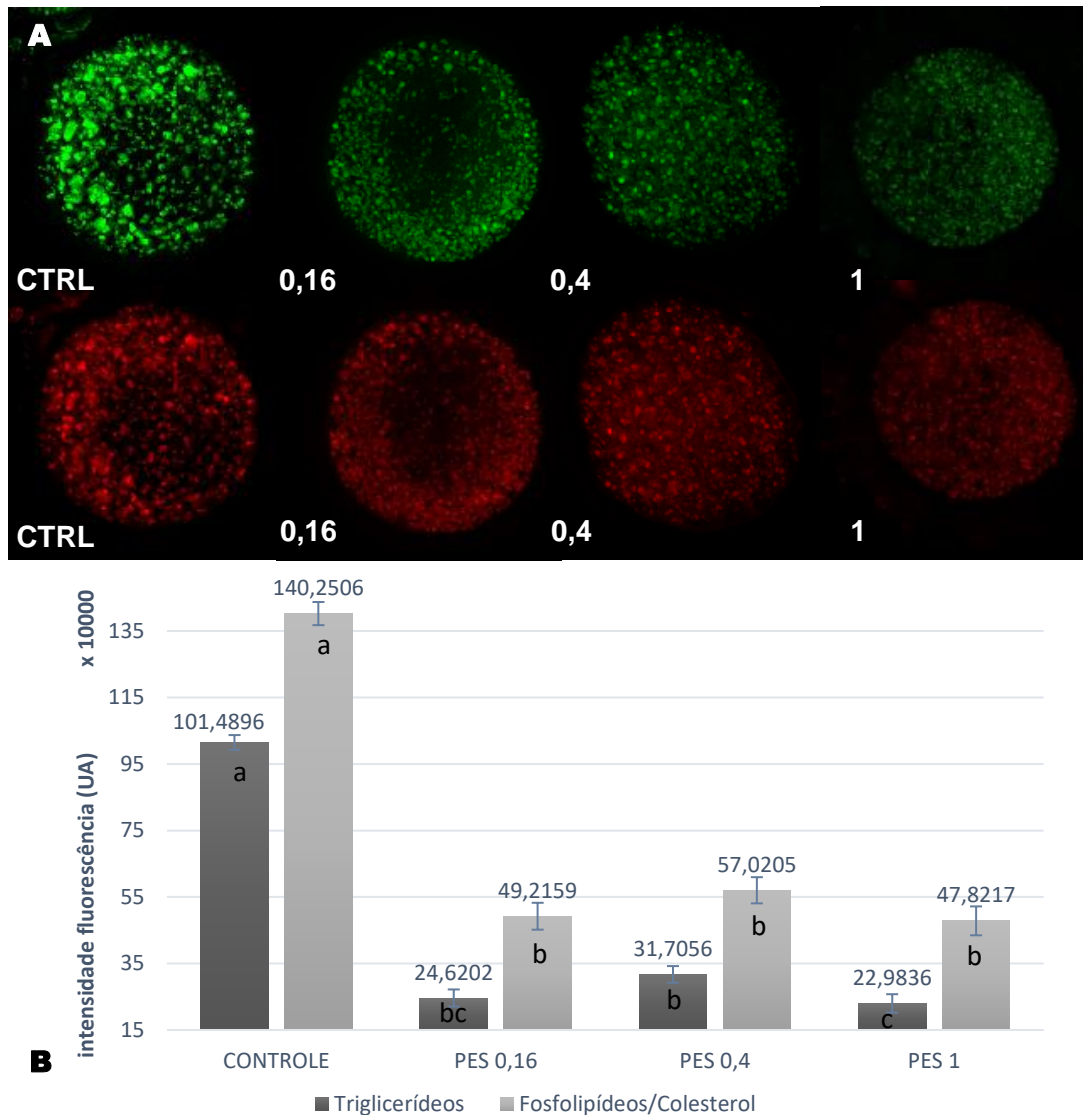


FIGURA 2 - Gotas lipídicas nos oócitos bovinos maturados com doses de 0,16; 0,4 e 1 μM de PES, e Controle (CTRL). (A) - Oócitos bovinos corados com Nile Red para avaliação da concentração de triglicerídeos (filtro verde, acima), fosfolípidios e colesterol (filtro vermelho, abaixo). (B) - Média de intensidade de fluorescência para os lipídeos presentes nos oócitos maturados com PES. Valores são expressos em unidades arbitrárias (UA).
^{abc}Médias com sobrescritos incomuns diferem entre grupos para cada tipo de lipídeo. $P < 0,0001$.

Os padrões detectados de disposição citoplasmática das gotas lipídicas ($P < 0,0295$) foram: disperso pelo citoplasma (geral), intermediário ou periférico (Figura 3). Nos grupos com maiores doses do PES mais de 90% das gotas presente nos oócitos estavam dispersas pelo citoplasma. No grupo com a menor dose e no grupo Controle houve uma maior proporção de gotas lipídicas distribuídas periféricamente ou intermediária, migrando para uma posição mais periférica (Figura 2A e 3).

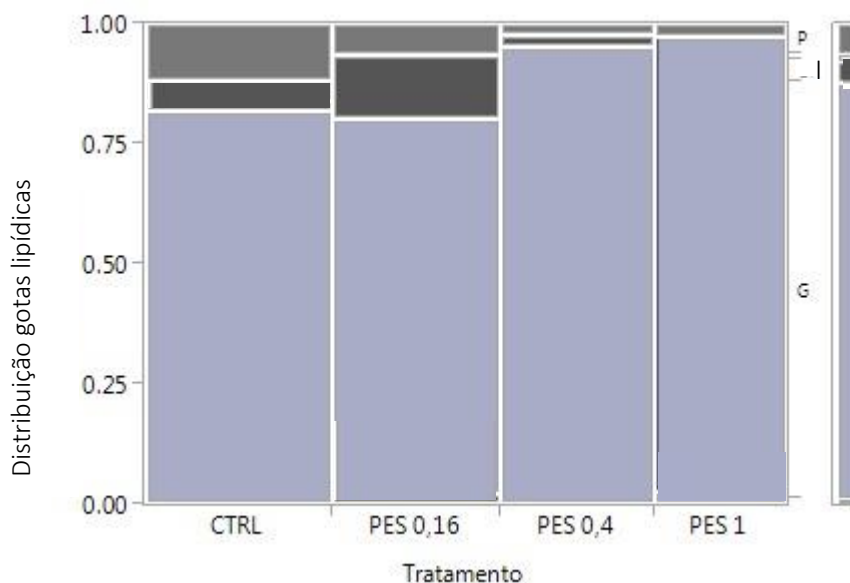


FIGURA 3 - Distribuição citoplasmática das gotas lipídicas nos oócitos maturados com PES. (G) Geral (I) Intermediário (P) Periférico. $P < 0,0295$.

Os trabalhos que avaliaram as gotas lipídicas após o uso do PES o fizeram para embriões e detectaram que o PES atuava na redução lipídica majoritariamente das gotas grandes e médias (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006^b; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr., 2007^b; SUDANO et al., 2010), buscamos verificar se havia efeito similar com relação ao tamanho das gotas lipídicas nos oócitos, mas não houve diferença entre tratamentos ($P = 0,2569$).

5.2.2. Efeitos etossulfato de fenazina no diâmetro oocitário

Os oócitos maturados com e sem PES ainda apresentaram diferentes diâmetros ($P = 0,0078$) ao fim das 24 horas de maturação (Tabela 4), o grupo PES 0,4 apresentou maior diâmetro ($162,2 \pm 1,2 \mu\text{m}$) comparado ao Controle ($156,3 \pm 1,1 \mu\text{m}$), PES 0,16 ($158,3 \pm 1,2 \mu\text{m}$) e PES 1 ($157,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$).

TABELA 4 - Diâmetro dos oócitos maturados com etossulfato de fenazina.

	N	Diâmetro (μm)
CONTROLE	50	$156,3 \pm 1,1^b$
PES 0,16	45	$158,3 \pm 1,2^b$
PES 0,4	41	$162 \pm 1,2^a$
PES 1	35	$157,6 \pm 1,3^b$

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem ($P < 0,05$). Valores representam a média dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média.

5.2.3. Efeitos etossulfato de fenazina nas fases da maturação

Uma maior maturação nos oócitos foi induzida pelo PES 1 em relação aos demais grupos com mais de 70% dos oócitos atingindo a fase de anáfase-telófase, enquanto nos

demais grupos aproximadamente 50% dos oócitos chegaram à essa fase, e para o grupo Controle ao fim de 24 horas de maturação aproximadamente 30% dos oócitos estavam nessa fase (Figura 4). Os oócitos que ainda estavam na fase inicial da maturação, vesícula germinativa (VG) ou rompimento da vesícula germinativa (RVG), eram 20%. Eles representavam menos de 10% dos oócitos do PES 1, aproximadamente 15% para o Controle e PES 0,16 e 25% dos oócitos maturados com 0,4 μ M de PES (Figura 4).

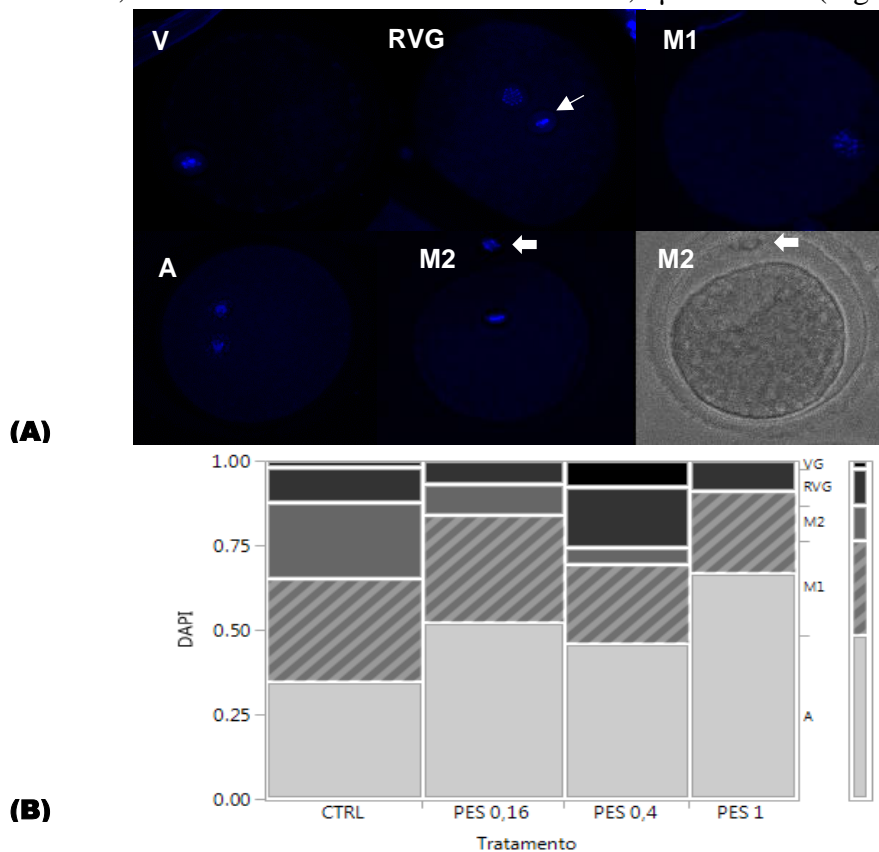


FIGURA 4 - Fase de desenvolvimento dos oócitos bovinos maturados com PES e corados com DAPI. Os oócitos foram classificados de acordo com a fase da meiose em vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase 1 (M1), anáfase-telófase (A) e metáfase 2 (M2). (A) – Visualização das fases de maturação por microscopia de fluorescência. Seta fina indica célula do cumulus. Seta grossa mostra o corpúsculo polar. (B) – Percentual de oócitos pertencentes a cada fase da maturação de acordo com o grupo tratado com diferentes doses do PES (0,16; 0,4 e 1 μ M) ou Controle (CTRL). $P < 0,0065$.

5.3. Efeitos do etossulfato de fenazina nos embriões

Não houve diferença entre tratamentos para a contagem de células da MCI e apoptóticas. Mas ao se comparar blastocistos em D7 e D9 a contagem de células apoptóticas foi maior ($P = 0,0378$) no D9 em comparação com o D7. A quantidade de células da MCI ($P = 0,0003$) foi menor nos embriões aquecidos em relação aos frescos, assim como o número total de células ($P = 0,01$) (Figura 5; Tabela 5).

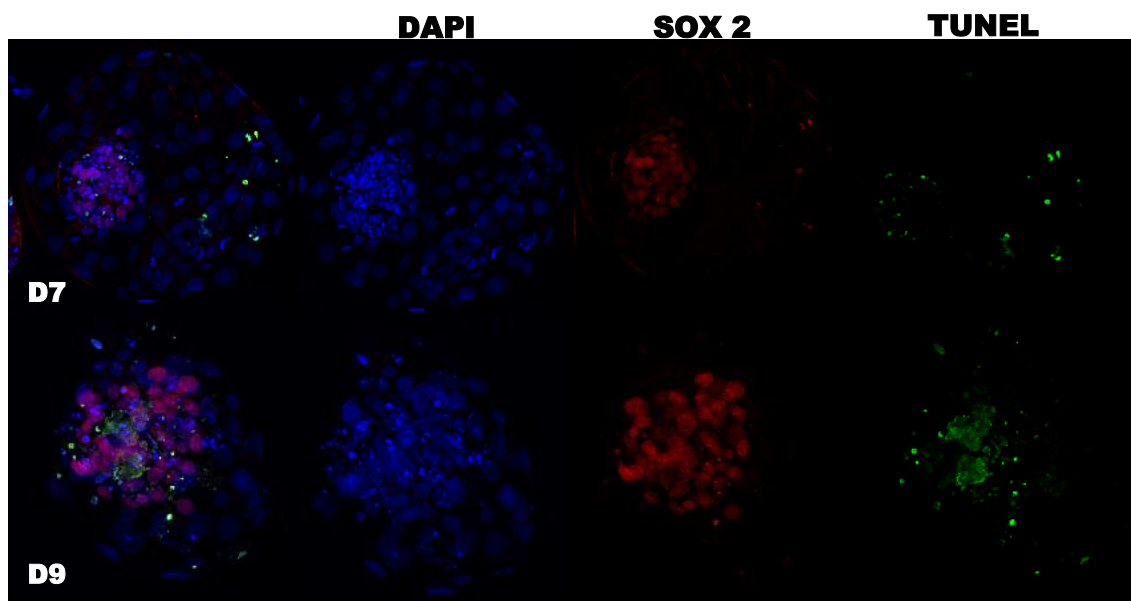


FIGURA 5 - Representação de blastocistos bovinos no D7 e D9 do desenvolvimento embrionário, após maturação com PES, corados para avaliação do número total de células presente nos embriões (DAPI), contagem de células da MCI (SOX 2) e células apoptóticas (TUNEL).

TABELA 5 - Embriões maturados com etossulfato de fenazina, fixados à fresco e após 48 horas do descongelamento para avaliação celular do número total de células, quantidade de células na massa celular interna (MCI) e células apoptóticas.

Parâmetros	À FRESCO		P		
	D7	D9	TTT	Dia	TTT*Dia
Células da MCI	24,5 ± 2	13,5 ± 2,5	0,2152	0,0003	0,3643
Células apoptóticas	15,9 ± 1,2	20,3 ± 1,4	0,1274	0,0378	0,0085
Nº total de células	95,3 ± 4,4	77,8 ± 5,3		0,01	
Células da MCI/Total células	25,1 ± 2,3	20,1 ± 2,9	0,4573	0,1702	0,0635
Células apoptóticas/Total células	17,2 ± 2,2	27,4 ± 2,7		0,08	
Células apoptóticas/Células da MCI	93,9 ± 28,5	308 ± 35,8	0,8924	< 0,0001	0,5893

O número total de células presente nos embriões foi avaliado com DAPI, para contagem de células da MCI utilizou-se SOX 2 e células apoptóticas, TUNEL. Diferem quando $P < 0,05$. Valores representam a média do número de células ± erro padrão da média.

A contagem de células apoptóticas do D9 foi maior ($P = 0,0018$) no PES 1 em comparação com o mesmo grupo no D7, nos demais grupos não houve interação entre tratamento e dia, portanto sem aumento da quantidade de células apoptóticas do D9 em relação ao D7 do desenvolvimento. A relação entre a quantidade de células da MCI e o número total de células para os tratamentos no D7 não diferiu, mas houve uma tendência ($P = 0,06$) de interação entre tratamento e dia sendo que a proporção de células da MCI em relação ao número total de células foi maior no D9 para o Controle e menor para os demais. O número total de células presente nos embriões tendeu a ser maior para o PES 1 em comparação com o PES 0,16 ($P = 0,0720$). Os demais tratamentos não diferiram destes (Figura 6; Tabela 6).

TABELA 6 - Número total de células nos embriões provenientes de oócitos maturados com etossulfato de fenazina.

DAPI	Médias \pm EPM
CONTROLE	90,2 \pm 6,5 ^{ab}
PES 0,16	77,1 \pm 6,9 ^b
PES 0,4	80,1 \pm 6,9 ^{ab}
PES 1	98,9 \pm 6,8 ^a

^{ab}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma coluna, diferem (P =0,0720).

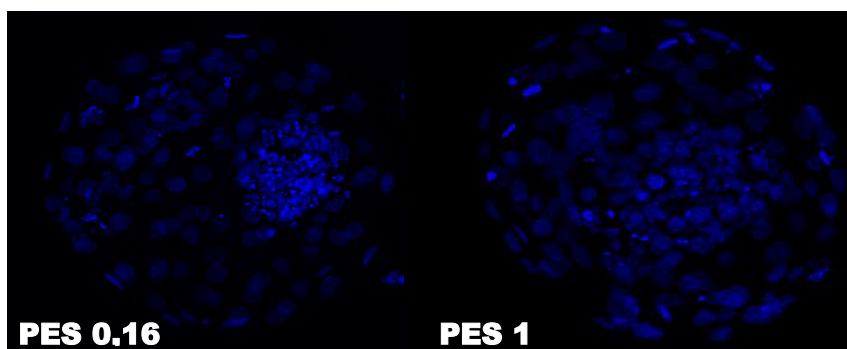


FIGURA 6 - Embriões bovinos no D7 corados com DAPI para avaliação do número total de células após serem maturados com 1 e 0,16 μ M de PES. P <0,05.

5.4. Efeitos do etossulfato de fenazina nos lipídios embrionários

As concentrações de lipídeos nos embriões para os triglicerídeos tiveram efeito principal de tratamento (P = 0,0180) e efeito de dia (P = 0,0001), quando comparamos D7 com D9. Os fosfolipídios e colesterol tiveram efeito de tratamento (P =0,0001) e dia (P <0,0001). Ao se avaliar por contraste os efeitos entre tratamentos observou-se que os triglicerídeos dos grupos tratados eram mais abundantes do que no Controle (P = 0,03). Para o PES 0,16 e 0,4 os triglicerídeos estavam 1,4 e 1,1 vezes, respectivamente, mais presentes do que para o PES 1 (P=0,05). Os fosfolipídios e colesterol diferiram entre o Controle e os tratados (P=0,01), mas entre tratamentos houve diferença só do PES 0,4 e PES 0,16 (P=0,0002) (Figura 7).

A relação entre triglicerídeos e células presentes nos embriões não teve efeito de tratamento (P =0,1679), nem interação de efeito de tratamento com efeito de dia (P =0,4247). Os fosfolipídios e colesterol avaliados em relação ao número total de células dos embriões aumentou nos grupos tratados em relação ao Controle (P =0,0075), a maior quantidade foi no PES 0,16 (n =46), que tendeu a diferir do PES 1 (n =53; P=0,0525), sendo os demais semelhantes (Figura 7).

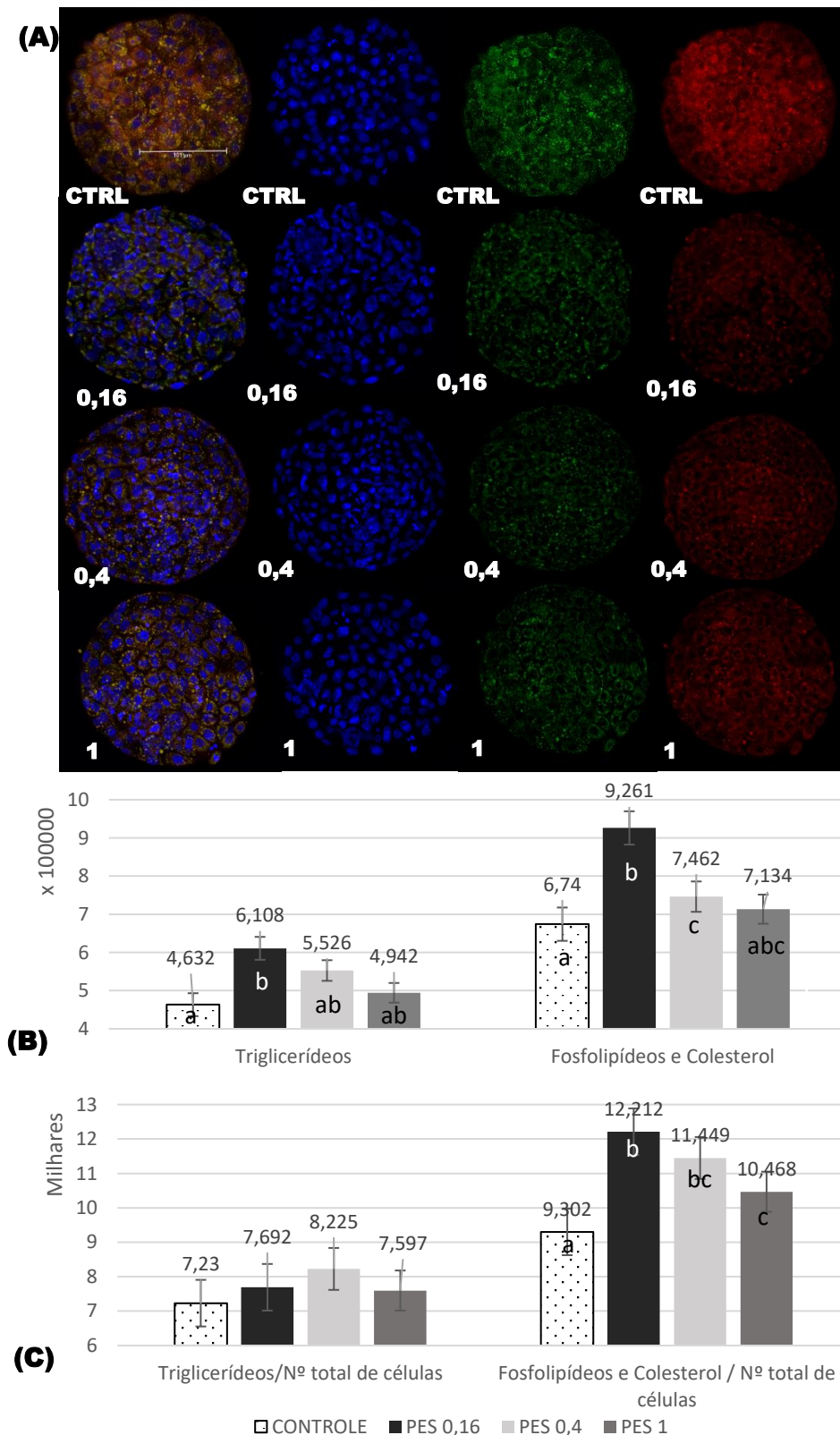


FIGURA 7 - Avaliação dos lipídios embrionários. (A) - Embriões bovinos em D9 (48h após descongelamento) corados com DAPI (azul) e Nile Red (filtro verde – triglicerídeos; filtro vermelho – fosfolípidos e colesterol) para avaliação da qualidade embrionária. (B) - Avaliação da concentração de lipídios nos embriões. (C) - Avaliação da concentração de lipídios e sua relação com a quantidade de células embrionárias. ^{abc}Médias com sobrescritos incomuns, na mesma classe de lipídios, diferem $P < 0,05$.

A proporção de gotas lipídicas em relação à quantidade de célula nos embriões teve efeito de dia ($P = 0,0001$), para os triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol. Ao se comparar grupos entre D7 e D9 o efeito interativo dos triglicerídeos não foi significativo, ou seja, independente de tratamento a variação entre D7 e D9 foi semelhante entre os grupos. Sempre no D7 a concentração de triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol foi menor comparado ao D9 independente de tratamento. Após a vitrificação verificou-se que a concentração de triglicerídeos aumentou 46% e os fosfolipídios e colesterol aumentaram aproximadamente 50% (Figura 8B).

A quantidade de células presente nos embriões avaliados aumentou 22% do D7 ($62,4 \pm 1,8$) para o D9 ($80,5 \pm 2,4$), já o aumento de lipídeos foi mais intenso. A relação entre triglicerídeos e a quantidade de células presente no embrião cresceu 28%, e para fosfolipídios e colesterol o aumento foi de 32% (Figura 8C).

Houve interação entre o efeito de tratamento e dia ($P = 0,0508$) para a relação de fosfolipídios e colesterol em relação ao número total de células embrionárias (Figura 8D). No D7 todos os tratamentos foram iguais entre si, mas no D9 o grupo Controle apresentou menor concentração de fosfolipídios e colesterol em relação ao PES 0,16. Os tratamentos PES 1 e Controle no D9 não alteraram a concentração de lipídeos em relação ao número de células quando comparados aos grupos no D7.

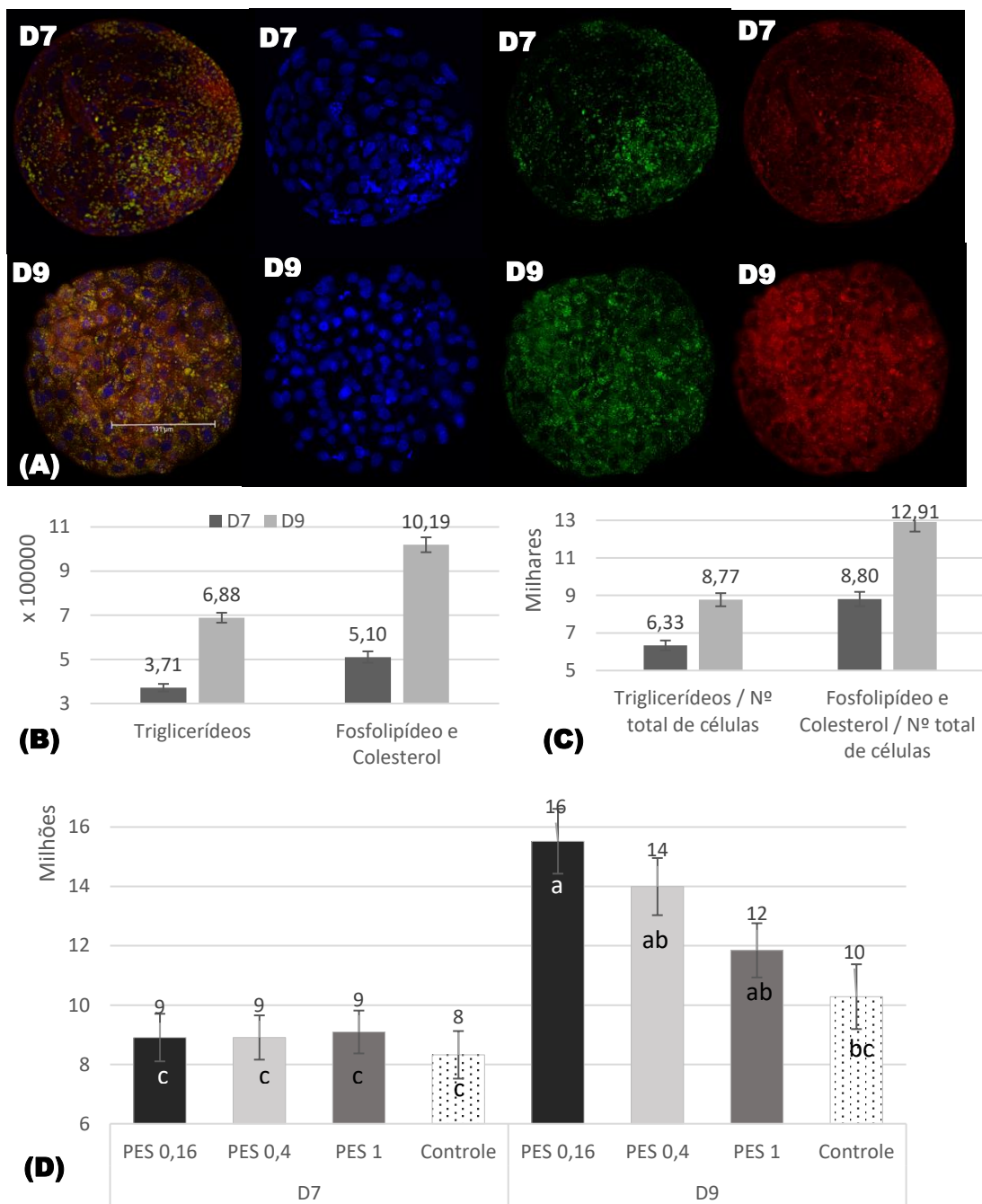


FIGURA 8 - Embriões bovinos no D7 e D9. (A) - Embriões bovinos corados com DAPI (azul) e Nile Red (filtro verde – triglicerídeos; filtro vermelho – fosfolípídios e colesterol) para avaliação da qualidade embrionária. (B) - Concentração dos diferentes lipídeos detectados pelo Nile Red no D7 e D9. $P < 0,0001$. (C) - Avaliação da relação da concentração de lipídeos com a quantidade de células presentes nesses embriões. $P < 0,0001$. (D) - Avaliação da relação da concentração de fosfolípídios e colesterol com a quantidade de células presentes nos embriões de D7 e D9. Interação dia com tratamento: $P = 0,05$.

Os diferentes tamanhos das gotas lipídicas presentes nos embriões não apresentaram resposta estatisticamente considerável ($P = 0,1764$). Mas as gotas lipídicas exibiram um padrão de disposição no embrião que poderia ser concentrada na região da MCI, distribuída em volta das células no blastocisto (pericelular) ou dispersa por todo o citoplasma (geral). Esse padrão mudou após a vitrificação. No dia 7 do desenvolvimento as gotas lipídicas se concentravam na região da MCI, após 48 horas de descongelamento elas estavam em menor concentração na MCI e distribuídas pelo citoplasma ou pericelularmente (Figura 9 e Figura 8A).

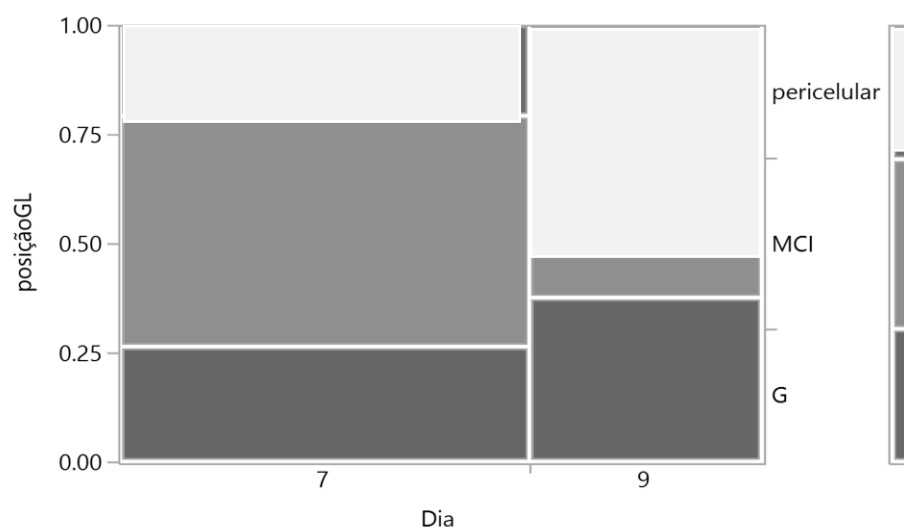


FIGURA 9 - Distribuição citoplasmática das gotas lipídicas entre os embriões bovinos no D7 e D9 corados com Nile Red. Elas se concentravam na região da MCI (MCI), distribuída em volta das células dos blastocisto (pericelular) ou dispersa por todo o citoplasma (G). Efeito de dia: $P < 0,0001$.

6. DISCUSSÃO

6.1. Produção *in vitro* de embriões bovinos maturados com etossulfato de fenazina

Mesmo com o cuidado de selecionar apenas oócitos grau I e II para serem submetidos à maturação com o PES, por estes serem oriundos de abatedouros, possíveis diferenças entre lotes de animais (subespécie, estado nutricional, paridade, status reprodutivo) podem ter levado à interferência da réplica no resultado de produção. O período de produções de baixo desempenho, em que duas réplicas foram descartadas, coincidiu com o auge do verão, em que os animais abatidos estavam expostos ao estresse térmico por mais de 60 dias. O que pode ter efeitos na qualidade oocitária e capacidade de desenvolvimento destes, já que oócitos e embriões até o estágio de blastocisto são muito sensíveis ao calor, e o estresse térmico afeta severamente o desenvolvimento embrionário inicial (MACEDO et al., 2014) levando a menor taxa de blastocisto no verão (FERREIRA et al., 2011).

Devido aos relatos de toxicidade do PES (O'FALLON e WRIGHT, 1986; RIEGER e GUAY, 1988; DUFRASNES et al., 1993; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006^a), testar diferentes doses nos oócitos auxiliaria a entender sua ação durante a MIV. As doses de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 10 μM foram testadas durante a MIV (DOWNS et al., 1998) de

camundongos e proporcionou que mais de 80% dos oócitos tivessem o RVG nas concentrações de 2,5 μM de PES. Esses resultados mostravam uma possível melhora na MIV oocitária *in vitro*, o que seria muito interessante para as produções de embriões bovinos. Mas, no presente estudo, a dose de 2,5 μM de PES em oócitos bovinos foi prejudicial, mesmo com uma exposição de menos de 24 horas ao fármaco. A clivagem não chegou a 45%, com muitos oócitos apresentando sinais de degeneração já nessa fase. Embriões no D7 não foram visualizados, no D8 a produção foi de 6% e apenas 1 embrião grau I foi produzido (1,4% do total de oócitos colocados para maturar).

Nos demais tratamentos com PES neste trabalho ficou demonstrado que a melhora na MIV [aumento no RVG, detectado por Downs et al. (1998)] não se seguiu nas demais etapas da PIV quando o PES foi usado somente na MIV de oócitos bovinos. Na etapa de clivagem foi observado que o Controle clivou ao menos 8 pontos percentuais a mais do que os tratados com PES. Porém, quanto aos embriões produzidos, o PES 0,4 atingiu índices de produção similares ao do Controle enquanto os demais grupos produziram uma menor quantidade de embriões.

Em outro estudo, os autores observaram que utilizando 0,9 μM de PES na CIV houve efeitos tóxicos (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006^a), no presente estudo a dose de 1 μM de PES introduzida na MIV não alterou a produção de embriões quando comparado aos outros grupos maturados com doses menores de PES. Este tratamento ainda mostrou taxas de sobrevivência, expansão e eclosão após vitrificação similares ao Controle.

No presente estudo somente a dose de 0,4 não diferiu do Controle com relação à taxa de produção de blastocisto. A dose mais comumente usada para testes com o PES na CIV é de 0,3 μM (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006a; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006b; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr., 2007a; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr., 2007b; BARCELÓ-FIMBRES et al., 2009; SUDANO et al., 2010; GHANEM et al., 2014; VAQUERO et al., 2015), corroborando com isso. Doses menores de PES (0,1 e 0,3 μM) no trabalho de De La Torre-Sanchez et al. (2006^a) teve esse mesmo comportamento, mas 0,16 μM de PES avaliado neste estudo não apresentou esse comportamento.

Dentre os embriões vitrificados, no presente estudo, mais de 70% daqueles originados dos tratamentos PES 0,4 e PES 1 que sobreviveram após 48 horas de descongelamento eclodiram no D9, como é o esperado no desenvolvimento fisiológico do embrião bovino para que ele tenha a capacidade de nidação no endométrio uterino (CHANG, 1952). Corroborando com os nossos achados, Ghanem et al. (2014) verificaram que a abundância transcricional do gene lipídico é maior nos embriões tratados com PES, e eles aumentaram a capacidade de eclosão pós-criopreservação (indicativo de criotolerância de embriões).

A criopreservação endurece a zona pelúcida e retarda a eclosão dos blastocistos (KIM et al., 2017). Os principais fatores envolvidos na eclosão são o incremento do número de células nos embriões o que causa uma diminuição da espessura da zona pelúcida, além da digestão da zona pelúcida, por parte das enzimas proteolíticas (SAWADA et al., 1990; MONTAG et al., 2000). Assim, a avaliação da criotolerância é considerada como um marcador relevante da qualidade embrionária, a qual pode ser

avaliada pela taxa de eclosão (IMAI et al., 2002; LONERGAN et al., 2003; RIZOS et al., 2003). Os nossos resultados sugerem que os embriões tratados com PES 0,4 e PES 1 teriam uma maior chance de implantação embrionária, se esses embriões chegassem a ser transferidos à receptoras, considerando que a eclosão é um evento prévio crucial para posterior alongamento do blastocisto ao longo do lúmen uterino para uma área de aposição com o endométrio (CARROLL et al., 1990; MATSON et al., 1997).

Rahme (2012) e Lim et al. (2007) testando ácido linoleico conjugado trans-10 cis-12 e SFB e SFB vs BSA no cultivo, respectivamente, verificaram redução na taxa de sobrevivência embrionária às 48h de cultivo após descongelamento. Para as maiores doses de PES testadas aqui a taxa de sobrevivência não se alterou (52%) e a taxa de eclosão tendeu a aumentar (34,3%) em relação ao Controle (27,2%). Assim como os embriões bovinos tratados com PES por Ghanem et al. (2014), que tiveram maiores taxas de eclosão (45,5%) do que o Controle (38,1%). No nosso estudo, o tratamento com 0,4 μ M de PES não teve efeito deletério sobre a produção de embriões, 77,5% dos blastocistos que sobreviveram após 48 horas de descongelamento eclodiram, enquanto para o Controle 25% dos que sobreviveram que eclodiram, sinalizando um possível efeito benéfico.

6.2. Efeitos do etossulfato de fenazina no acúmulo lipídico oocitário

Quando usado na maturação *in vitro*, o PES reduziu a concentração de triglicerídeos, fosfolipídios e colesteróis em todos os oócitos tratados. A maior redução em relação ao Controle foi dos triglicerídeos, mas a inibição do metabolismo dos triglicerídeos pode levar à diminuição da viabilidade oocitária, devido a importância do metabolismo destes durante a maturação do oócito (FERGUSON e LEESE, 1999; ROMEK et al., 2011). O principal lipídio em oócitos bovinos imaturos e maduros são os triglicerídeos (MCEVOY et al., 2000), eles são fonte de energia chave durante a maturação de oócitos bovinos e, potencialmente, durante o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (FERGUSON e LEESE, 2006).

Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avalia a concentração de lipídios pela técnica de NR para oócitos tratados com o PES. As concentrações de fosfolipídios e colesterol não diferiram entre os grupos tratados, todos levaram à redução de gotas lipídicas em relação ao Controle. A redução de mais de 2 vezes na concentração de fosfolipídios e colesterol dos grupos tratados com o PES em relação ao Controle pode ser um dos fatores que afetaram a evolução após vitrificação dos embriões produzidos, juntamente com as alterações na concentração de triglicerídeos. Por exemplo, a redução do fosfolipídio tem um risco deletério, ele é necessário para a fixação de proteínas de membranas celulares no oócito mamífero (KANE e FAHY, 1993). Os grupos tratados com PES ainda levaram a uma redução exacerbada de triglicerídeos durante o desenvolvimento inicial do oócito que pode ter sido prejudicial para o desenvolvimento embrionário subsequente. Tais restrições ainda no início do desenvolvimento do oócito pode ter afetado sua dinâmica de desenvolvimento, o que refletiu nos percentuais de clivagem e embriões produzidos nos grupos tratados.

É importante ressaltar que o conteúdo lipídico dos oócitos pode ser alterado pelo ambiente em que o oócito amadurece, particularmente pelos suplementos séricos e

lipídicos usados para a MIV. Oócitos bovinos maturados com SFB a 10% têm mais triglicerídeos e mais colesterol do que aqueles que amadureceram em condições livres de soro (KIM et al., 2001; DUNNING et al., 2014). No nosso estudo, os oócitos foram maturados com 10% de SFB, mas aqueles tratados com PES não tiveram esse aumento de triglicerídeos e colesterol já relatado em outras situações.

Durante o curso da maturação do oócito, os depósitos lipídicos intracelulares sofrem mudanças. Em oócitos de porco, as gotículas lipídicas exibem um pronunciado padrão de distribuição periférica após a MIV (STURMEY et al. 2006; DUNNING et al., 2014), o que, no presente estudo, foi detectado em maior quantidade nos oócitos maturados com 0,16 μM de PES e no Controle. Aardema et al. (2008) também relataram grande variação no número de gotículas lipídicas entre oócitos do mesmo ovário. Eles sugerem que os lipídios passam por mudanças e fazem parte da migração de diversas organelas que ocorre durante a maturação citoplasmática.

A biossíntese e o armazenamento de lipídios, presente em níveis mais elevados em oócitos maturados *in vitro* do que em oócitos imaturos, ocorrem na aquisição da competência oocitária durante a foliculogênese (WRENZYCKI et al., 2007; GONZALES-SERRANO et al., 2013). Oócitos bovinos maturados *in vitro* exibem pequeno, mas significativo aumento no número de gotículas lipídicas em comparação com oócitos no estágio de VG (AARDEMA et al., 2011). Nessa fase fisiologicamente ocorre a biossíntese e o armazenamento de espécies lipídicas neutras (GONZALES-SERRANO et al., 2013), como observado no nosso estudo no Controle, mas nos grupos tratados com PES houve a redução em mais de 75% da concentração de triglicerídeos e 80% da concentração de fosfolipídios e colesterol nos oócitos maturados, efeitos que podem ter levado às diferenças encontradas durante as fases posteriores de cultivo.

6.2.1. Efeitos de etossulfato de fenazina no diâmetro oocitário e organelas

Em bovinos, oócitos de 115 μm podem alcançar a fase de RVG, mas, a capacidade de desenvolvimento embrionário só acontecerá se o diâmetro for superior a 120 μm (PAVLOK et al., 1992; CHAVES et al., 2010). Fair et al. (1995) relataram que oócitos bovinos se tornam mais competentes com o aumento do diâmetro, e Hyttel et al. (1997) relataram que oócitos bovinos carecem de plena capacidade de desenvolvimento até atingirem um diâmetro de 110 μm , excluindo a zona pelúcida, que é aproximadamente igual ao limiar de 140 μm (MCEVOY et al., 2000). Segundo Arlotto et al. (1996), em bovinos, oócitos de maior diâmetro apresentam maior potencial de desenvolvimento em blastocistos devido ao acúmulo de RNA mensageiro e de proteínas (LAZZARI et al., 1994; CROCOMO et al., 2012). Todos os oócitos maturados avaliados nesse trabalho apresentavam diâmetros acima de 140 μm , portanto, neste aspecto, demonstraram capacidade de desenvolvimento embrionário. Além disso, o grupo PES 0,4 apresentou maior diâmetro, sugerindo com base nesta avaliação, que teve maiores chances de fertilizar e produzir embriões, o que não foi comprovado pelas nossas avaliações de clivagem e produção de embriões.

Fair et al. (1995) e Hyttel et al. (1997) indicam que o teor de lipídios de oócitos bovinos aumenta com o aumento do tamanho (MCEVOY et al., 2000). As mitocôndrias são homoganeamente distribuídas no oócito imaturo, com exceção no córtex do oócito imaturo, enquanto elas tendiam a ser distribuídas mais periféricamente no oócito amadurecido *in vitro* (STURMEY et al. 2006). A distribuição de gotículas lipídicas dentro do citoplasma de oócitos porcinos segue um padrão similar; uma distribuição homogênea em todo o citoplasma, com exceção do córtex interno do oócito imaturo. Isso muda ligeiramente durante a MIV, quando uma distribuição periférica mais pronunciada é aparente (STURMEY et al. 2006; STURMEY et al., 2009). No caso dos oócitos maturados com as maiores doses de PES (0,4 e 1) a distribuição dos lipídios citoplasmáticos foi em sua maioria homoganeamente distribuídas, já os grupos Controle e PES 0,16 tiveram aumento na quantidade de oócitos com lipídios distribuídos periféricamente.

Uma possível explicação para a distribuição de gotículas lipídicas e mitocôndrias está relacionada à disponibilidade de oxigênio intracelular. A fim de gerar energia a partir da oxidação de lipídios (ou substratos exógenos), o oxigênio deve obviamente estar disponível para as mitocôndrias para atuar como um receptor de elétrons terminal. Parece plausível que as unidades metabólicas mitocondriais lipídicas se localizem na periferia do oócito, onde o oxigênio está mais prontamente disponível (HYTTEL et al., 1997; STURMEY et al., 2009), mas isso não chegou a ser detectado nos oócitos maturados com PES neste trabalho.

Fleming e Saacke (1972) relataram uma estreita associação espacial entre o retículo endoplasmático e mitocôndrias em oócitos bovinos, bem como sua proximidade com gotículas lipídicas, formando assim efetivamente "unidades metabólicas" (KRUIP et al., 1983). Teoria confirmada usando métodos de imagem avançados, que mostraram que gotículas lipídicas e mitocôndrias co localizam-se a uma distância aproximadamente equivalente à espessura de uma membrana celular, em oócitos porcinos *in vitro* (STURMEY et al., 2006). Viaris De Lesegno et al. (2008) observou a presença de gotículas lipídicas circundadas por retículo endoplasmático liso, o que poderia refletir o metabolismo de reservas lipídicas ou a síntese de lipoproteínas. Em contraste com a situação do oócito, há uma escassez de dados sobre a organização da gotícula lipídica e unidades metabólicas mitocondriais no embrião inicial (STURMEY et al., 2009), tais aspectos valem a pena ser mais bem explorados para entendermos melhor como o PES poderia atuar na maturação citoplasmática dos oócitos.

6.2.2. Efeitos do etossulfato de fenazina nas fases da maturação

Na maioria dos mamíferos, durante a vida intrauterina os oócitos iniciam a meiose após intensas mitoses. Diversos fatores inibitórios sintetizados pelas células da granulosa e presentes no fluido folicular interrompem as divisões meióticas na fase diplóteno da prófase I, morfologicamente designado como VG (MOTLIK et al., 1998; HURK et al., 2005; CROCOMO et al; 2011). A regulação gonadotrófica do RVG é atribuída à interrupção da transferência de fatores inibidores da maturação ao oócito, decorrente da expansão das células do cumulus com consequente perda da comunicação intercelular

entre os CCOs e as células foliculares (DEKEL et al., 1981), já o estágio de MII é caracterizado pela presença dos cromossomos arranjados no centro do fuso e um corpúsculo polar no espaço perivitelínico (CROCOMO et al., 2011). A maturação oocitária é definida como o reinício e término da primeira divisão meiótica, do estágio de VG até a fase de metáfase II, acompanhada da maturação citoplasmática necessária para a fertilização e desenvolvimento embrionário (CHARPIGNY et al., 1997; GULART et al., 2015). Os oócitos maturados com PES 1 tiveram uma evolução mais acentuada das fases da meiose, com 75% dos oócitos maturados atingindo a fase de anáfase-telófase, e mais de 90% passaram da fase de RVG.

O único trabalho que avaliou esse efeito do PES durante a MIV encontrou resultados similares, em que 96% dos oócitos de camundongos atingiram a fase de RVG ao serem maturados com 1 μ M de PES (DOWNS et al., 1998), mas, pela nossa revisão, nunca foi avaliada a produção de embriões e resposta à vitrificação de oócitos maturados nessa condição, parâmetros mais confiáveis para verificar a real qualidade de oócitos maturados com o PES.

O lipídio intracelular também desempenha um papel na maturação oocitária *in vitro* (STURMEY et al., 2009), neste caso o uso do PES demonstrou que a redução do acúmulo lipídico, possivelmente devido ao desvio da rota de acúmulo lipídico e estimulação das rotas das pentoses com maior formação de purinas, auxiliou na indução do desenvolvimento do oócito em fases mais avançadas da maturação a medida que aumentou a dose do PES.

A maior porcentagem de oócitos maturados com a alta dose do PES não levou a maior produção de embriões deste grupo. Oócitos de animais pré-púberes também atingem a metáfase II a taxas semelhantes às dos animais adultos, mas a clivagem e desenvolvimento ocorre a taxas significativamente menores (DAMIANI et al., 1996). Possivelmente devido à maturação citoplasmática não ocorrer simultaneamente como a microscopia eletrônica de transmissão revelou, em que a maioria dos oócitos exibe algum atraso na migração e redistribuição de organelas após a maturação, o que não corrobora com a fertilização adequada e consequente baixa competência de desenvolvimento dos oócitos (DAMIANI et al., 1996), semelhante ao que ocorreu no presente trabalho.

6.3. Efeitos do etossulfato de fenazina nos embriões

A qualidade de um embrião pode ser definida por diversos fatores, alto número total de células, equilíbrio na quantia de células apoptóticas (BYRNE et al., 1999), boa quantidade de células na MCI e baixa concentração de gotas lipídicas, sendo itens desejáveis no embrião (OLIVEIRA et al., 2014). Tais características podem aumentar as chances de gerar uma prenhez, que é o maior objetivo do estudo embrionário. O número total de células presente no embrião é o primeiro fator que vale a pena ser avaliado. Do número de células totais do embrião depende o desenvolvimento fetal normal (GARDNER e LANE, 1997). Nos oócitos maturados com PES, os embriões produzidos com o tratamento PES 0,16 tiveram a menor média de células totais ($77,1 \pm 6,9$), em relação ao PES 1 ($98,9 \pm 6,8$).

No nosso trabalho quando usamos 1 μ M de PES houve tendência de aumento no número total de células nos embriões em relação ao tratamento com 0,16 μ M de PES.

Sudano et al. (2010) não observou relação para o número total de células entre os grupos de blastocistos frescos ou aquecidos, a dose do PES máxima usada por Sudano et al. (2010) foi 0,3 μM , a dose mais próxima à essa que usamos foi de 0,4 μM e também não detectamos diferenças no número total de células com esse tratamento. A redução no número total de células e o aumento na porcentagem de apoptose dos embriões aquecidos sobressaiu à dos frescos em nosso estudo, corroborando com os resultados dos autores acima citados.

O estresse gerado pela criopreservação e recultivo correspondeu a um aumento de 20,3 a 40,8% na taxa de apoptose quando blastocistos frescos e vitrificados foram comparados (SUDANO et al., 2010), no presente trabalho este aumento foi de aproximadamente 25%. Portanto pode-se constatar que ocorre um estresse nos embriões criopreservados e recultivados. Observou-se um aumento da porcentagem de ocorrência de apoptose após a vitrificação e recultivo nos grupos experimentais comparado aos embriões dos respectivos grupos frescos.

Apesar da apoptose ser considerada um mecanismo endógeno, benéfico para melhora da qualidade embrionária (SUDANO et al., 2010), uma alta incidência deste processo é associada com a redução da viabilidade embrionária (BYRNE et al., 1999). Vários parâmetros já foram correlacionados com a capacidade dos embriões sobreviverem à criopreservação, no qual foi observado que o grau de células apoptóticas apresentou maior correlação com a sobrevivência do que o conteúdo de lipídeos (SUDANO et al., 2012), reforçando sua utilização como critério para avaliação da qualidade embrionária (SENA-NETTO et al., 2016), assim como observado no nosso estudo.

No trabalho de De La Torre-Sanchez et al. (2006^a), apesar da adição de PES na concentração de 0,9 μM no meio de cultivo, a partir do D2,5, apresentar um efeito tóxico, doses menores de PES (0,1 e 0,3 μM) não apresentaram diferença com relação à MCI e número de células quando comparadas com o Controle, corroborando com os resultados do presente trabalho para as doses de 1; 0,4 e 0,16 μM , contrastando apenas quanto ao efeito de 0,9 μM na CIV, que para De La Torre-Sanchez et al. (2006^a) foi tóxico, enquanto que 1 μM na MIV, no nosso trabalho, não apresentou este efeito.

Gajda et al. (2008) estudando a qualidade embrionária de embriões suínos, observaram que o uso de 0,025-0,075 μM de PES no meio de cultivo de embriões no estágio de duas células além de melhorar o desenvolvimento embrionário, resultou no aumento da qualidade, levando a redução de 25% da incidência de apoptose nos embriões tratados com PES. Tanto o número de células quanto a porcentagem de núcleos positivos para TUNEL foram menores nos grupos tratados com PES do que o Controle (GAJDA et al., 2008; GAJDA et al., 2011). Sabe-se que o desafio com embriões suínos em relação a conteúdo lipídico é grande, devido à grande quantidade de lipídio presente no citoplasma destes embriões (DINNYES et al., 2006). No nosso caso houve uma diferença de células TUNEL positivas maior no D9 do PES 1 em relação ao D7 deste tratamento, nos demais tratamentos não houve aumento do D7 para o D9.

No presente trabalho a quantidade de células da MCI em relação ao número total de células não diferiu entre os embriões frescos, mas após o processo de vitrificação e recultivo o Controle apresentou maior proporção de células na MCI do que os grupos

tratados com o fármaco, sinalizando uma melhor qualidade do Controle, nesse quesito. Há maior índice de apoptose na MCI quando comparada com o trofoblasto em embriões bovinos (SUDANO et al., 2011; BYRNE et al., 1999). Como a linhagem celular, a partir da qual o feto se origina, é a MCI na qual a apoptose exerce um controle qualitativo rigoroso (BYRNE et al., 1999), sua maior concentração nessa área do embrião pode estar relacionada com efeitos vistos em embriões PIV resultando no crescimento anormal do feto (FARIN et al., 2004; DIAS et al., 2016).

Ao se avaliar o número de células apoptóticas em relação ao número total de células é possível verificar o quanto aumentou a sua proporção após a vitrificação quando comparado aos embriões à fresco. Outro aspecto relevante é a redução do número total de células apresentada pelos embriões aquecidos após a vitrificação quando comparado ao número de células dos embriões frescos, fato este associado com o processo de degeneração celular, fazendo com que estas células não sejam coradas pelos corantes nucleares fluorescentes em função dos danos associados ao estresse sofrido pelos embriões durante a criopreservação (SUDANO et al., 2010).

6.3.1. Efeitos do etossulfato de fenazina nos lipídios embrionários

Uma importante função biológica dos triglicerídeos é servir como forma de armazenamento de energia metabólica na preparação para eventos específicos de desenvolvimento, como a eclosão do blastocisto (FLYNN et al., 1978; DIEZ et al., 2001). Nas membranas celulares eucarióticas, entretanto, os fosfolipídios são os lipídios mais abundantes (VAN MEER et al., 2008; SUDANO et al., 2016), e de fato os fosfolipídios estavam em maior concentração do que os triglicerídeos nos blastocistos aqui avaliados.

A concentração de triglicerídeos no Controle foi menor quando comparada com os tratados com PES, o que foi surpreendente. As concentrações de PES 0,16 e PES 0,4 resultaram em embriões com maior concentração de lipídios do que o PES 1. Os embriões do grupo PES 0,16 chegaram a ter uma concentração 24% maior de triglicerídeos do que o Controle. Os embriões tratados com PES 0,16 quando atingiram D7 tiveram aumento de triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol exacerbado mesmo com a redução lipídica durante a maturação se assemelhando aos demais grupos.

Ao se avaliar a concentração de lipídios em relação à quantidade de células presentes nos embriões todos os grupos ficaram equivalentes entre si. A concentração de triglicerídeos aumentou mais de 46% do D7 para o D9 do desenvolvimento, após descongelamento. Como esse período é uma fase de rápido crescimento celular, comparou-se a concentração de lipídeos em relação à quantidade de células presentes nesses embriões, mesmo assim houve aumento de mais de 27% na concentração de triglicerídeos em relação ao número de células embrionárias.

As gotículas lipídicas são os locais onde os lipídios são armazenados. Conforme exigido pelo corpo, esses lipídios armazenados são usados para produzir energia, como componentes de membrana e na sinalização lipídica (SOUZA et al., 2015), elementos essenciais após o descongelamento dos embriões. Moléculas anfipáticas, abundantes em ácidos graxos, podem comprometer a integridade da membrana e, uma vez transformadas em triglicerídeos são incorporados às gotículas,

que podem se tornar inócuas. Este fato pode explicar o grande acúmulo de gotículas lipídicas em embriões bovinos de PIV. Assim, as gotículas lipídicas atuam como moduladores da disponibilidade proteica e da sinalização lipídica no núcleo (SOUZA et al., 2015; DIAS et al., 2017), como observado a presença delas não foi o mais determinante para a sobrevivência ou morte após a vitrificação, e se elas tem um papel benéfico nesse momento pode ser alvo de futuras investigações.

Fosfolipídios são componentes essenciais nas membranas biológicas e devem ser sintetizados de acordo com a divisão celular e o estado metabólico (FERREIRA et al., 2014). Como a fase de expansão e eclosão é uma fase de intenso desenvolvimento celular o aumento desse tipo de lipídio nessa fase é esperado, nesse caso o PES 1 que possuía maior quantidade de células embrionárias em relação ao PES 0,16 também mostrou ter maior concentração desses lipídios. O impacto positivo do acúmulo de lipídios pode ser visto como um passo necessário na preparação de substratos lipídicos da membrana plasmática, devido à intensa atividade proliferativa do embrião em crescimento nesse período (ANNES et al., 2018).

Do D7 para o D9 a concentração de fosfolipídios e colesterol dobrou, mesmo em relação ao crescimento celular a concentração desses lipídios cresceu mais de 32%. Sendo que no D7 todos os grupos testados apresentavam a mesma concentração desses lipídios em relação a quantidade de células presente nos embriões. Além dos requisitos de membrana da superfície celular, estudos em embriões de camundongos mostraram que o fosfolipídio é cada vez mais utilizado para organelas intracelulares ligadas a membranas à medida que a divisão celular prossegue (PRATT, 1980; MCEVOY et al., 2000).

No D9 a quantidade de fosfolipídios e triglicerídeos em relação ao número total de células não mudou para os grupos PES 1 e Controle em relação ao que existia no D7, mas para o PES 0,16 e o PES 0,4 o aumento foi de até 41%. No D7 os lipídeos de forma geral estavam concentrados na região da MCI, enquanto no D9 eles estavam dispersos pelo citoplasma ou concentrados pericelular. De acordo com Annes et al., (2018) os blastocistos expandidos no D8 aumentaram os depósitos lipídicos quando comparados com os expandidos no D7, assim como em todas as situações neste trabalho, quando comparado os blastocistos do D7 e D9 houve aumento significativo dos lipídios analisados. Para Menezes et al. (1982) a quantidade de ácidos graxos em embriões de bovinos permaneceu estável do D7 ao D10, mas sua avaliação foi feita em embriões coletados *in vivo*, e sabe-se que embriões cultivados *in vitro* apresentam mais triglicerídeos e menor teor de fosfolipídios e ésteres de colesterol na sua composição quando comparados com embriões que se desenvolveram *in vivo* (SATA et al., 1999; REIS, et al., 2003; CHARPIGNY et al., 2003; PITANGUI et al., 2012). No caso dos embriões tratados com PES houve aumento de todos os tipos de lipídios avaliados do D7 para o D9.

As gotículas lipídicas intracelulares podem afetar as propriedades físicas das membranas celulares quando submetidas ao processo de criopreservação e descongelamento (DIEZ et al., 2001), mas a diminuição na concentração lipídica embrionária não foi o principal fator para determinar a sobrevivência à vitrificação nos demais grupos testados. A redução de fosfolipídios e colesterol nos oócitos foram semelhantes para todos os grupo tratados, enquanto o PES 1 foi o que mais reduziu a

concentração de triglicerídeos nos oócitos em relação ao Controle. Mesmo com esse efeito, na fase de blastocisto a concentração dos lipídios foi semelhante para o PES 1 e o Controle, diferindo só para o PES 0,16. Com relação aos fosfolipídios o PES 0,4 também diferiu do Controle. Mas as taxas de eclosão do PES 0,4 e o PES 1 tiveram uma tendência a ser melhor do que o Controle ou PES 0,16, e este ainda obteve menor concentração de células embrionárias.

Embora a abordagem de encorajar embriões a esgotar metabolicamente os seus lipídios intracelulares de modo a aumentar a criotolerância possa ser de interesse para o congelamento de embriões, os efeitos fisiológicos do metabolismo de regulação ascendente são largamente desconhecidos. Isso é particularmente relevante dado o conceito do Embrião Tranquilo, pelo qual os embriões mais viáveis são metabolicamente "quietos" (LEESE, 2002; BAUMANN et al., 2007; LEESE et al., 2008). Portanto, sugerimos que é provavelmente imprudente regular exacerbadamente a atividade metabólica, já que isso pode estar relacionado à viabilidade subótima. Barceló-Fimbres et al. (2009) ainda demonstrou que a redução lipídica de embriões bovinos tem impacto negativo sobre a viabilidade de bezerras (revisado por STURMEY et al., 2009), fatores que ilustram como essa área requer mais pesquisas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O percentual de PES na MIV afetou o resultado de produção de embriões, mas a resposta não chegou a ser dose dependente pois 0,16 μM foi prejudicial, enquanto 0,4 μM não levou a esse efeito.
- O PES foi capaz de reduzir todos os lipídios analisados nos oócitos quando usado na MIV, mas essa redução na concentração lipídica não levou a um aumento na produção de embriões.
- O PES 0,4 não reduziu tanto quanto o PES 1 a concentração de triglicerídeos nos oócitos e não diferiu do Controle quanto à produção de embriões, portanto uma redução exacerbada de triglicerídeos (como ocorreu com 0,16 e 1 μM de PES) durante o desenvolvimento inicial do oócito pode afetar o desenvolvimento embrionário subsequente.
- Os embriões em D7 não diferiram entre grupos para a qualidade celular. Após a vitrificação e recultivo aumentou o número de células apoptóticas no PES 1 comparado aos embriões em D7, mas este grupo também apresentou a maior quantidade de células embrionárias. Ao se avaliar proporcionalmente a relação de células apoptóticas e células totais não houve efeito significativo de nenhum tratamento, não podendo afirmar que o PES 1 foi prejudicial.
- O Controle tendeu a ter uma maior proporção de células da MCI em relação às células totais quando comparado aos tratados, mas isso não resultou em maior taxa de

eclosão ou outras consequências que levassem a crer que o Controle apresentou melhor qualidade embrionária.

- O uso do PES nas doses deste experimento induziu a maturação nuclear e reduziu a concentração de lipídeos nos oócitos, mas isso não se manteve nas demais fases do desenvolvimento embrionário, mostrando que o efeito não é permanente, e perdido o contato com o fármaco, a mudança metabólica por ele induzida não se mantém. Houve na verdade um efeito compensatório, aumentando a quantidade de lipídeos após o cultivo *in vitro*. Portanto seria interessante avaliações futuras que utilizassem o fármaco tanto na MIV quanto na CIV.
- O PES 1 reduziu triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol de forma significativa em relação ao Controle na MIV, mas se assemelhou ao Controle quanto ao acúmulo de lipídios já na fase embrionária. Mesmo com mais oócitos atingindo fases mais adiantadas de maturação, o uso de 1 μ M de PES na MIV não produziu mais embriões do que o Controle.
- O fato de diminuir o acúmulo lipídico nos oócitos não foi o mais determinante para a criotolerância embrionária. Mas mais estudos são necessários visando a avaliação dos efeitos desta droga sobre o metabolismo ou a expressão genômica e proteômica do oócito e embrião.

8. CONCLUSÃO

O PES utilizado durante a maturação oocitária diminuiu a concentração de lipídios, triglicerídeos e colesterol nos oócitos, mas este efeito não se manteve nas demais etapas de cultivo *in vitro* dos embriões bovinos. Mesmo assim houve algum efeito benéfico com o uso do fármaco que tendeu a melhorar a eclosão embrionária após a vitrificação com as doses de 0,4 e 1 μ M de PES.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARDEMA, H., KNIJN, H.M., OEI, C.H.Y., VOS, P.L.A.M., GADELLA, B.M. Lipid droplet dynamics during in vitro maturation of bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 76, 2008.
- AARDEMA, H., VOZ, P.L., LOLICATO, F., ROELEN, B.A., KNIJN, H.M., VAANDRAGER, A.B., HELMS, J.B., GADELLA, B.M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 62-69, 2011.
- 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., SHIKU, H., AOYAGI, S., HOSHI, H. In vitro culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine Embryos. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 21, p. 22-30, 2004.
- ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T., HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, V. 61, p. 57–66, 2002.
- ACCORSI, M.F. Avaliação de embriões bovinos cultivados in vitro na presença de ácidos graxos e sua sobrevivência pós-criopreservação. **Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal)** – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.
- AGARWAL, A., GUPTA, S., SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1-21, 2005.
- AGARWAL, A., SALEH, R.A. & BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79(4), p. 829-843 2003.
- AL DARWICH, A., PERREAU, C., PETIT, M.H., PAPILLIER, P., DUPONT, J., GUILLAUME, D., MERMILLOD, P., GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostriglicerídeoslandins and other lipid mediators**, v. 93, p. 30-36, 2010.
- ANNES, K., MÜLLER, D.B., VILELA, J.A.P., VALENTE, R.S., CAETANO, D.P., CIBIN, F.W.S., SUDANO, M.J. Influence of follicle size on bovine oocyte lipid composition, follicular metabolic and stress markers, embryo development and blastocyst lipid content. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 31, p. 462-472, 2018.
- ARLOTTO, T., SCHWARTZ, J.L., FIRST, N.L., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Aspects of follicle and oocyte striglicerídeoase that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 943-956, 1996.
- AUCLAIR, S. UZBEKOV, R., ELIS, S. Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 6, p. E599-E613, 2013.

BARCELÓ-FIMBRES, M., BRINK, Z., SEIDEL JUNIOR, G.E. Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. **Theriogenology**, v. 71, p. 355-368, 2009.

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

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

BAUMANN, C.G., MORRIS, D.G., SREENAN, J.M., LEESE, H.J. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 10, p. 1345–1353, 2007.

BEITZ, D.C. Metabolismo dos Lipídios. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 398-429, 1996.

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

BRAND, M.D.; NICHOLLS, D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **The Biochemical journal**, v. 435, n. 2, p. 297–312, 2011.

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

CAGNONE, G., SIRARD, M. A. The impact of exposure to sérum lipids during in vitro culture on the transcriptome of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 81, p. 712–722, 2014.

CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, p. 1655-1657, 2002.

CARROLL, J., DEPYPERE, H., MATTHEWS, C.D. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 547–553, 1990.

CHANG, M.C. Development of bovine blastocyst with a note on implantation. **The Anatomic Record**, v. 113, p. 143-161, 1952.

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

CHARPIGNY, G., REINAUD, P., TAMBY, J. P., CREMINON, C., GUILLOMOTS, M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the preimplantation period. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1032-1040, 1997.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 1, p. 37-49, 2010.

CROCOMO L.F., MARQUES FILHO W.C., LANDIM ALVARENGA F.C., BICUDO S.D. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2012.

CROCOMO, L.F., MARQUES-FILHO, W.C., LANDIM-ALVARENGA, F.C., BICUDO, S.D. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, v.18 (4), p. 542-552, 2011.

CROCOMO, L.F., MARQUES-FILHO, W.C.M., LANDIM-ALVARENGA, F.C., BICUDO, S.D. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 19(4): p. 470-479, 2012.

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

DAMIANI, P., FISSORE, R.A., CIBELLI, J.B., LONG, C.R., BALISE, J.J., ROBL, J.M., DUBY, R.T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 521–534, 1996.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F., GARDNER, D.K., PRIEIS, K., GIBBONS, J., SEIDEL Jr, G.E. Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during postcompaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. **Reproduction, fertility, and development**, v. 18, n. 5, p. 597-607, 2006b.

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

DEAN. W., SANTOS, F., REIK, W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 14, p. 93-100, 2003.

DEKEL, N., LAWRENCE, T.S., GILULA, N.B., BEERS, W.H. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus–oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. **Developmental Biology**, v. 86, p. 356-62, 1981.

DEL COLLADO, M. SARAIVA, N.Z., LOPES, F.L., GASPAR, R.C., PADILHA L.C., COSTA, R.R., ROSSI, G.F., VANTINI, R., GARCIA, J.M. 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(11), p. 1721-1732, 2015.

DEL COLLADO, M., DA SILVEIRA, J. C., SANGALLI, J. R., ANDRADE, G. M., SOUSA, L. R. D. S., SILVA, L. A., MEIRELLES, F. V., AND PERECIN, F. Fatty acid

binding protein 3 and transzonal projections are involved in lipid accumulation during IVM of bovine oocytes. **Scientific Reports**, v. 7, p. 2645-2648, 2017b.

DEL COLLADO, M.B. Influência de diferentes suplementos na maturação oocitária sobre o acúmulo de lipídeos citoplasmáticos em oócitos e embriões bovinos cultivados in vitro. 90 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

DEL COLLADO, M.B. Metabolismo lipídico e estresse celular durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário in vivo e in vitro em bovinos. 222 f., **Dissertação (Doutorado em Biociência Animal)** - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

DI PAOLO, G., DE CAMILLI, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. **Nature**, v. 443, p. 651-657, 2006.

DIAS, L.R.O. Efeito de agentes delipidantes durante o cultivo no desenvolvimento embrionário e conteúdo lipídico de embriões bovinos produzidos in vitro. 51 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Animais)** – Universidade de Brasília, 2016.

DIAS, L.R.O., PIVATO, I., DODE, M.A.N. Change in energy metabolism of in vitro produced embryos: an alternative to make them more cryoresistant? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 2237-2254. 2017

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.

DINNYES, A., MENG, Q., POLGAR, Z., BOONKUSO, D., SOMFAI, T. Criopreservação de embriões de mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 171-190, 2006.

DOMINGUES, M.C.N., RIGOLON, L.P., CAVALIERI, F.L.B., SEKO, M.B., ALBUQUERQUE, K., ZANCHETA, C.G. Viabilidade de embriões vitrificados oriundos da fertilização in vitro de oócitos de vacas suplementadas com canola. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 145-151, 2014.

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

DORLAND, M., GARDNER, D.K., TROUNSON, A.O. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, p. 70, 1994.

DOWNS, S.M., HUMPHERSON, P.G., LEESE, H.J. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1084-1094, 1998.

DUFRESNES, E., VANDERHEYDEN, I., ROBIN, D., DELCOURT, J., PAMPFER, S., DE HERTOIGH, R. Glucose and pyruvate metabolism in preimplantation blastocysts from normal and diabetic rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 169-177, 1993.

- DUNNING, K.R., RUSSELL, D.L., ROBKER, R.L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v. 148, p. 15–27, 2014.
- DURANTHON, V., RENARD, J. The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. **Theriogenology**, v. 55(6), p. 1277–1289, 2001.
- DUTTA, A.K., KAMADA, K., OHTA, K. Spectroscopic studies of Nile red in organic solvent and polymers. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 93, p. 57–64, 1996.
- EBERT, K.M., LIEM, H.E., HECHT, N.B. Mitochondrial DNA in the mouse preimplantation embryo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 145–149, 1988.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203–216, 2003.
- FAIR, T., HYTTEL, P., GREV, T., BOLAND, M. Cytoplasmic ultrastructure of growing and fully grown bovine embryos. **Anatomy and Embryology**, v. 195, p. 327–336, 1997.
- FAIR, T., HYTTEL, P., GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 437–442, 1995.
- FARIN, C.E., FARIN, P.W., PIEDRAHITA, J.A. Development of fetuses from in vitro produced and cloned bovine embryos. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 53–62, 2004.
- 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.
- FERGUSON, E.M., LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, n. 2, p. 373–378, 1999.
- FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61–68, 1997.
- FERREIRA, C. R., SARAIVA, S.A., CATHARINO, R.R., GARCIA, J.S., GOZZO, F.C., SANVIDO, G.B., SANTOS, L.F.A., LO TURCO, E.G., PONTES, J.H.F., BASSO, A.C., BERTOLLA, R.P., SARTORI, R., GUARDIEIRO, M. M., PERECIN, F., MEIRELLES, F.V., SANGALLI, J.R., EBERLIN, M.N. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. **Anais do II Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal São Carlos, SP**, p.109–136, 2009b.
- FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, F.A., NAVARRO, P.A.A.S. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 3, p. 172–181, 2008.
- FERREIRA, E.M., VIREQUE, A.A., ADONA, P.R., MEIRELLES, F.V., FERRIANI, R.A., NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and

biochemical modifications and acquisition of developmental competence Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848. 2009.

FERREIRA, M.S., DE OLIVEIRA, D.N., GONCALVES, R.F., CATHARINO, R.R. Lipid characterization of embryo zones by silica plate laser desorption ionization mass spectrometry imaging (SP-LDI-MSI). **Analytica Chimica Acta**, v. 807, p. 96–102, 2014.

FERREIRA, R.M., AYRES, H., CHIARATTI, M.R., FERRAZ, M.L., ARAÚJO, A.B., RODRIGUES, C.A., WATANABE, Y.F., VIREQUE, A.A., JOAQUIM, D.C., SMITH, L.C., MEIRELLES, F.V., BARUSELLI, P.S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal Dairy Science**, v. 94, p. 2383-2392, 2011.

FLYNN, T., HIUMAN, N. Lipid synthesis from (U-14C) glucose in preimplantation mouse embryos in culture. **Biology of Reproduction**, v. 19, p. 922-926, 1978.

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

GAD, A., HOELKER, M., BESENFELDER, U., HAVLICEK, V., CINAR, M., RINGS, F., HELD-HÖLKER, E., DUFORT, I., SIRARD, M., SCHELLANDER, K., TESFAYE, D. Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and Their Regulation by Alternative In Vivo and In Vitro Culture Conditions. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 1–13, 2012.

GAJDA, B., ROMEK, M., GRAD, I., KRZYSZTOFOWICZ, E., BRYŁA, M., SMORG, Z. Lipid content and cryotolerance of porcine embryos cultured with phenazine ethosulfate. **CryoLetters**, vol. 32, n. 4, p. 349–357, 2011.

GAJDA, B.; BRYLA, M.; SMORAG, Z. Effects of protein source, vitamin E and phenazine ethosulfate on development competence and quality of porcine embryos cultured in vitro. **Folia Biologica (Kraków)**, v. 56, p. 57-63, 2008.

GARDNER, D.K.; LANE, M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? **Human Reproduction Update**, v. 3, p. 367-382, 1997.

GEISZT, M.; LETO, T.L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 51715–51718, 2004.

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

GHANEM, N., HA, A.N., FAKRUZZAMAN, M., BANG, J.I., LEE, S.C., KONG, I.K., Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. **Theriogenology**, v. 15, p. 238-250, 2014.

GHONEIM, N. Photophysics of Nile red in solution Steady state spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 56, p. 1003–1010, 2000.

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

GONÇALVES, M.C., CESARO, M.P., RODRIGUES, M.F., LOPES, R.F., MEZZALIRA, J.C., MOZZAQUATRO, F.D., MEZZALIRA, A. Criotolerância de oócitos e embriões bovinos maturados com líquido folicular e/ou β -mercaptopetanol. **Ciência animal brasileira**, v. 16, n. 2, p. 205-216, 2015.

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

GONZÁLEZ-SERRANO, A.F., PIRRO, V., FERREIRA, C.R., OLIVERI, P., EBERLIN, L.S., HEINZMANN, J., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H., COOKS, R.G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. **PLoS ONE**, v. 8, p. 74981, 2013.

GORDON, I.R. Laboratory production of cattle embryos. Walling-Ford: **CAB International**, 2 ed., 548 p., 2003.

GREENSPAN, P., MAYER, E.P., FOWLER, D. Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **Journal of Cell Biology**, v. 100, p. 965–973, 1985.

GREENSPAN, P., FOWLER, S.D. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. **The Journal of Lipid Research**, v.26, p. 781–789, 1985.

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

GULART, L.V.M. Meios de cultivo para maturação de oócitos e produção de embriões avaliados por marcadores moleculares. 108 f. **Dissertação (Doutorado em Ciências de Saúde)** – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

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

HERRICK, J.R., BRAD, A.M., KRISHER, R.L. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. **Reproduction**, v. 131, p. 289–298, 2006.

HOMA, S.T., RACOWSKY, C., MCGAUGHEY, R.W. Lipid analysis of immature pig oocytes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 77, p. 425–434, 1986.

HORVATH, G., SEIDEL Jr., G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl-b-cyclodextrin. **Theriogenology**, v. 66, p. 1026-1033, 2006.

HOSSEINI, S.M., FOROUZANFAR, M., HAJIAN, M., ASGARI, V., ABEDI, P., HOSSEINI, L., OSTADHOSSEINI, S., MOULAVI, F., LANGRROODI, M.S., SADEGHI, H., BAHRAMIAN, H., EGHBALSAIED, S.H. & NASR-ESFAHANI, M.H. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after

vitrification-warming; which is the most important? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, p. 355-364, 2009.

HURK, V.D.R., ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-51, 2005.

HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

IMAI, K., MATOBA, S., DOCHI, O., SHIMOHIRA, I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. **Journal Veterinary Medicine Science (Jap)**, v, 64, p. 887–891, 2002.

ISPADA, J., RODRIGUES, T.A., RISOLIA, P. H. B., LIMA, R.S., GONÇALVES, D.R., RETTORI, D., NICHI, M., FEITOSA, W.B., PAULA-LOPES, F.F. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, p. 1169-1179, 2018.

JIANG, Z., SUN, J., DONG, H., LUO, O., ZHENG, X., OBERGFELL, C. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genomics**, v. 15, p. 756, 2014.

KANE, M.T., FAHY, M.M. Blastocyst development and growth: role of inositol and citrate. **Preimplantation Embryo Development**, p. 169-183, 1993.

KATSO, R., OKKENHAUG, K., AHMADI, K., WHITE, S., TIMMS, J., WATERFIELD, M.D. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 615-657, 2001.

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

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

KIM, H.J., PARK, S.B., YANG, J.B., CHOI, Y.B., LEE, K.H. Effects of laser-assisted hatching and exposure time to vitrification solution on mouse embryo development. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 44, p. 193–200, 2017.

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

KRISHER, R.L., BAVISTER, B.D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, p. 103-114, 1998.

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

LANE, M., GARDNER, D.K. EDTA stimulates development of cleavage striglicerídeose mouse embryos by inhibitingthe glycolytic enzyme 3-phosphoglycerate kinase. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 193, 1997.

LAZZARI, G., GALLI, C., MOOR, R.M. Functional changes in the somatic and germinal compartments during follicle growth in pigs. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p. 119-130, 1994.

LEÃO, B.C.S. Efeitos da suplementação lipídica sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro. 64 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2012.

LEÃO, B.C.S., ROCHA-FRIGONI, N.A.S., CABRAL, E.C., COELHO, M.B., FERREIRA, C.R., EBERLIN, M.N., ACCORSI, M.F., NOGUEIRA, É., MINGOTI, G.Z. Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. **Theriogenology**, v. 84, n. 1, p. 127–136, 2015.

LEESE, H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. **Reproduction**, v. 143, n. 4, p. 417-427, 2012.

LEESE, H.J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. **Bioessays**, v. 24, p. 845–849, 2002.

LEESE, H.J., BAUMANN, C.G., BRISON, D.R., MCEVOY, T.G., STURMEY, R.G. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, p. 667–672, 2008.

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

LEPPENS-LUISIER, G., URNER, F., SAKKAS, D. Facilitated glucose transporters play a crucial role throughout mouse preimplantation embryo development. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1229–1236, 2001.

LEROY, J.L., OPSOMER, G., DE VliegHER, S., VANHOLDER, T., GOOSSENS, L., GELDHOF, A., BOLS, P.E., DE KRUIF, A., VAN SOOM, A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. **Theriogenology**, v. 64, p. 2022-2036, 2005.

LIM, K.T., JANG, G., KO, K.H., LEE, W.W., PARK, H.J., KIM, J.J., KANG, S.K., LEE, B.C. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 239-248, 2007.

LIMA, M.R. Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento in vitro de embriões bovinos e na sobrevivência à vitrificação. 74 f. **Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária)** – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2015.

LISCUM, L., UNDERWOOD, K.W. Intracellular cholesterol transport and compartmentation, **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 15443–15446, 1995.

LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 259–267, 2003.

LUZ, H.K.M., SCHELL, L.W., FAUSTINO, L.R., MANOEL, C., SILVA, G., FIGUEIREDO, J.R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 956, 2011.

MACEDO, G.G., COSTA e SILVA, E.V., PINHO, R.O., ASSUMPCÃO, T.I., JACOMINI, J.O., SANTOS, R.M., MARTINS, L.F. O estresse por calor diminui a fertilidade de fêmeas bovinas por afetar o desenvolvimento oocitário e embrionário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 80-85, abr/jun 2014.

MALDONADO, E.N., LEMASTERS, J.J. ATP/ADP ratio, the missed connection between mitochondria and the Warburg effect. **Mitochondrion**, v. 19, p. 78-84, 2014.

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.

MARINHO, L.S.R. Conjugated linoleic acid in cryotolerance of bovine in vitro - produced embryos. 2010. 76 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2010.

MARTINS, N.M. Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar: efeito protetor da dimetiltiouréia. 119f. **Dissertação (Doutorado em Toxicologia)** - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MATSON, P.L., GRAEFLING, J., JUNK, S.M., YOVICH, J.L., EDIRISINGHE, W.R. Cryopreservation of oocytes and embryos: Use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1550-1553, 1997.

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

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

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

MELLO-FILHO, A.C., HOFFMAN, M.E. & MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemistry Journal**, v. 218, p. 273-275, 1983.

MELO, R.C.N., D'AVILA, H., WAN, H.C., BOZZA, P.T., DVORAK, A.M., WELLER, P.F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 59, p. 540-556, 2011.

MENEGHEL, M. Redução do conteúdo lipídico intracitoplasmático de embriões bovinos produzidos in vitro como estratégia para melhorar a crioresistência ao processo de

vitrificação. 68f. **Dissertação (Doutorado em Reprodução Animal)** – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2016.

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

MENEZO, Y., RENARD, J., DELOBEL, B., PAGEAUX, J. Kinetic study of fatty acid composition of day 7 to day 14 cow embryos. *Biology of Reproduction*, v. 26, p. 787-790, 1982.

MILAZZOTTO, M.P., VISINTIN, J.A., ASSUMPCÃO, M.E.O. Biotecnologias da reprodução: Biologia molecular aplicada à biotecnologia. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 11, suplemento 1, p. 145-148, 2008.

MONTAG, M., KOLL, B., HOLMES, P., VEN, H.V.D. Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. *Biology of reproduction*, v. 62, n. 6, p. 1738–1744, 2000.

MORATÓ, R., IZQUIERDO, D., PARAMIO, M.T., MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental striglicerídeoses. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 22, p. 1141–1147, 2010.

MOTLIK, J., PAVLOK, A., KUBELKA, M., KALOUS, J., KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*, v. 49, p. 461-469, 1998.

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.

MUKHERJEE, S., RAGHURAMAN, H., CHATTOPADHYAY, A. Membrane localization and dynamics of Nile Red: effect of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1768, p. 59–66, 2007.

NAGANO, M., KATRIGLICERÍDEOSIRI, S., TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental potential. *Zygote*, v. 14, p. 53–61, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: **Artmed**, 1304 p., 2011.

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

OLIVEIRA, C.S., SERAPIÃO, R.V., QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “**Biotécnicas da Reprodução em Bovinos**” – Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 54 p., 2014.

PANTALEON, M., KAYE, P.L. Glucose transporters in preimplantation development. *Reviews of Reproduction*, v. 3, p. 77–81, 1998.

PAVLOK, A., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 63-67, 1992.

PELLEGRINO, C.A.G. Avaliação econômica da produção in vitro de embriões bovinos de diferentes grupos genéticos em sistema comercial. 127 f. **Dissertação (Doutorado em Ciência Animal)** – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PENITENTE-FILHO, J., OLIVEIRA, F., TORRES, C. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro (In vivo and in vitro bovine embryo production). **Revista CFMV**, v. 61, p. 73-82, 2014.

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

PEREIRA, R.M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J., BAPTISTA, M.C., VASQUES, M.I., HORTA, A.E.M., SANTOS, I.C., MARQUES, M.R., REIS, A., SILVA PEREIRA, M., MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 322-332, 2008.

PINGUS, G., ENZMANN, E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. the activation of ovarian eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 655-675, 1935.

PITANGUI, C.P. Determinação do perfil lipídico por espectrometria de massas de oócitos bovinos maturados em meio suplementados com fosfolipídio: uma nova estratégia para modular a criotolerância oocitária, 77 p. **Dissertação (Mestrado em Medicina)** – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

PRASTOWO S., AMIN A., RINGS F., HELD E., WONDIM D. SALILEW, GAD A., NEUHOFF C., THOLEN E., LOOFT C., SCHELLANDER K., TESFAYE D., HOELKER M. Fateful triad of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction and lipid accumulation is associated with expression outline of the AMP-activated protein kinase pathway in bovine blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 890-905, 2016.

PRATT, H.P.M. Phospholipid synthesis in the pre-implantation mouse embryo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, p. 237–248, 1980.

RAHME, L.S.T.R. Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. 44 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Animal)** – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

RANKIN, E.B., RHA, J., SELAK, M.A., UNGER, T.L., KEITH, B., LIU, Q., HAASE, V.H. Hypoxia-inducible factor 2 regulates hepatic lipid metabolism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, p. 4527–4538, 2009.

RAZEK, I.A.E., CHARPIGNY, G., KODJA, S., MARQUANT-LEGUIENNE, B., MERMILLOD, P., GUYADER-JOLY, C. Differences in lipid composition between in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 346, 2000.

REIS, A., ROOKE, J.A., MCCALLUM, G.J., EWEN, M.E., LOMAX, M.A., MCEVOY, T.G. Stress-associated developmental arrest following in vitro ovine embryo culture in the presence of docosahexaenoic acid (DHA). **Reproduction**, v. 30, p. 48, 2003.

RIEGER, D. Relationship between energy metabolism and development of the early embryo. **Theriogenology**, v. 37, p. 75–93, 1992.

RIEGER, D., GUAY, P. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 585–591, 1988.

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

RIZOS, D., WARD, F., DUFFY, P., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. 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, p. 234–238, 2002.

SANCHES, B.V. Evaluation of different cryoprotectant and Forskolin in the culture medium for improving the efficacy of vitrification of *Bos indicus* in vitro derived embryos. 2009. 49 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)** - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

SANTOS, R.R, CELESTINO, J.J.H, LOPES, C.A.P., MELO, M.A.P., RODRIGUES, A.P.R., FIGUEIREDO, JR. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n.1, p. 9-15, 2008.

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

SAWADA, H., YAMAZAKI, K., HOSHI, M. Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: Evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. **Journal of Experimental Zoology**, v. 254, p. 83–87, 1990.

SCOTT, L., WHITTINGHAM, D.G. Role of facilitative glucose uptake in the glucose-inorganic phosphate-mediated retardation and inhibition of development in different strains of mouse embryos. **Reproduction**, v. 123, p. 691–700, 2002.

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

SENA-NETTO, S.B. Efeito da fonte protéica na produção, qualidade e crioresistência de embriões bovinos produzidos in vitro. 89 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)** – Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2016.

SERAPIÃO R.V., SÁ W.F., FERREIRA A.M., CAMARGO L.S.A., GILARDI S.G.T., VIANA J.H.M., RAMOS A.A., NOGUEIRA L.A.G. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 58-61, 2005.

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.

SIMONS, K., IKONEN, E. How cells handle cholesterol, **Science**, v. 290, p. 1721–1725, 2000.

SINNER, D., CAVIGLIA, J.M., JAWERBAUM, A., IGAL, R.A., GONZALEZ, E. Lipid metabolism in the embryos of diabetic rats during early organogenesis: modulatory effect of prostriglicerídeoslandin E2. **Reproduction Fertility and Development**, v. 15, p. 75–80, 2003.

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

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

SOUZA, D.K., SALLES, L.P., ROSA E SILVA, A.A.M. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 48, n. 3, p. 191-197, 2015.

SPRÍCIGO, J.F.W., DIÓGENES, M.N., LEME, L.O., GUIMARÃES, A.L., MUTERLLE, C.V., SILVA, B.D.M., SOLÀ-ORIOLO, D., PIVATO, I., SILVA, L.P., DODE, M.A.N. Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-11, 2015.

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

STURMEY, R.G., O'TOOLE, P.J., LEESE, H.J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction**, v. 132, p. 829– 837, 2006.

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

SUDANO, M.J. Efeito do soro fetal bovino e do etossulfato de fenazina sobre o acúmulo lipídico, apoptose e resposta à vitrificação em embriões bovinos produzidos in vitro. 107 f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2010.

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, A.JR., MACHADO, R., LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 160-167, 2013.

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

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

SUDANO, M.J.; RASCADO, T.S.D.; TATA, A.; BELAZ, K.R.A.; SANTOS, V.G.; VALENTE, R.S.; MESQUITA, F.S.; FERREIRA, C.R.; ARAÚJO, J.P.; EBERLIN, M.N.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 472-484, 2016.

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

SUTTON-McDOWALL, M.L., GILCHRIST, R.B., THOMPSON, J.G. Effect of hexoses and gonadotrophin supplementation on bovine oocyte nuclear maturation during in vitro maturation in a synthetic follicle fluid medium. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 17, p. 407–415, 2005.

SUTTON-McDOWALL, M.L., GILCHRIST, R.B., THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, p. 685-695, 2010.

TAKAHASHI, T., INABA, Y., SOMFAI, T., KANEDA, M., GESHI, M., NAGAI, T., MANABE, N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 25, n. 4, p. 589-99, 2013.

TARAZONA, A.M., RODRIGUEZ, J.I., RESTREPO, L.F., OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 5–11, 2006.

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

VAJTA, G., NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomed Online**, v. 12, p. 779-796, 2006.

VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, v. 11, p. 797-813, 2011.

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

VAQUERO, C.G.P. Influência do Etossulfato de Fenazina na produção *in vitro* de embriões bovinos, gestação e na expressão gênica da via do metabolismo do

triacilglicerol. 63 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

VIARIS DE LESEGNO, C., REYNAUD, K., PECHOUX, C., THOUMIRE, S., CHASTANT-MAILLARD, S. Ultrastructure of canine oocytes during in vivo maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 115–125, 2008.

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

WALTHER, T.C., FARESE JR, R.V. The life of lipid droplets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, p. 459-466, 2009.

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

WANG, X., FALCONE, T., ATTARAN, M., GOLDBERG, J.M., AGARWAL, A., SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 1272-1277, 2002.

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

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

WILMUT, I., ROWSON, L.E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Veterinary Record**, v. 92, p. 686- 690, 1973.

WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. **Theriogenology**, v. 68, p. 77-83, 2007.

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.

WU, L.L., DUNNING, K.R., YANG, X., RUSSELL, D.L., LANE, M., NORMAN, R.J., ROBKER, R.L. High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus-oocyte complexes and decreased fertilization rates. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5438-5445, 2010.

YANG, X. WU, L.L., CHURA, L.R., LIANG, X., LANE, M., NORMAN, R.J., ROBKER, R.L. Exposure to lipid-rich follicular fluid is associated with endoplasmic reticulum stress and impaired oocyte maturation in cumulus-oocyte complexes. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1438-1443, 2012.

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.