

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**DELIPIDAÇÃO QUÍMICA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* E
CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Autor: Tiago Omar Diesel

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

GOIÂNIA

2018



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFMG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Tiago Omar Diesel

Título do trabalho: Delipidação química na produção *in vitro* e criopreservação de embriões bovinos

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do autor²

Ciente e de acordo:

Assinatura da orientadora²

Data: 08/10/2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

TIAGO OMAR DIESEL

**DELIPIDAÇÃO QUÍMICA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* E
CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Zootecnia junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Federal de Goiás

Área de Concentração

Produção Animal

Linha de Pesquisa

Interface entre desempenho produtivo,
reprodutivo, aspectos genéticos e
ambientais na produção animal

Orientadora

Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

Comitê de Orientação

Regiani Nascimento Gagno Porto – EVZ/UFG

Emmanuel Arnhold – EVZ/UFG

GOIÂNIA

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Diesel, Tiago Omar
DELIPIDAÇÃO QUÍMICA NA PRODUÇÃO IN VITRO E
CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS [manuscrito] / Tiago
Omar Diesel. - 2018.
xxi, 92 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini; co-orientadora
Dra. Regiani Nascimento Gagno Porto; co-orientador Dr. Emmanuel
Arnhold.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. L-carnitina. 2. Forskolin. 3. PIVE. 4. Congelamento lento. 5.
Embriões bovinos. I. Gambarini, Maria Lúcia, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO 29 DA SESSÃO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DOUTORADO DO
2 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA DA ESCOLA DE
3 VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS,
4 REALIZADA POR TIAGO OMAR DIESEL. Aos 13/09/2018 a partir das 08h30min, na
5 sala de Reuniões do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária e Zootecnia da
6 Universidade Federal de Goiás, nesta Capital, realizou-se a sessão pública de Defesa de
7 Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) TIAGO OMAR DIESEL, intitulada
8 "Delipidação química na produção in vitro e criopreservação de embriões bovinos", para
9 obtenção do Título de Doutor em Zootecnia, junto à Área de Concentração: Produção
10 Animal desta Universidade. Os trabalhos foram instalados pelo (a) Presidente da Comissão
11 Julgadora, Orientador (a) Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos, com a
12 participação dos demais membros da Banca Examinadora Prof. Dr. Manoel Francisco
13 Biancardi – ICB/UFV; Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho – EVZ/UFV; Profa.
14 Dra. Moema Pacheco Chediak Matos – EVZ/UFV (memória) e Prof. Dr. Arthur dos
15 Santos Mascioli - EVZ/UFV. Iniciando os trabalhos, o Presidente concedeu a palavra ao (a)
16 candidato (a) TIAGO OMAR DIESEL para exposição em cinquenta minutos do seu
17 trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem, aos demais membros
18 da banca, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de trinta
19 minutos, assegurando-se ao mesmo, igual prazo para responder aos Senhores Membros da
20 Banca Examinadora. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a
21 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a)
22 Dr. Tiago O. A. D. O. (Aprovado/Reprovado) pelos seus membros. Proclamados os
23 resultados da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar lavrou-se a
24 presente ata que, após lida e achada conforme vai assinada pelos membros da Banca
25 Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos (Orientador(a))
Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi – ICB/UFV
Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho – EVZ/UFV
Profa. Dra. Moema Pacheco Chediak Matos – EVZ/UFV
Prof. Dr. Arthur dos Santos Mascioli - EVZ/UFV

ASSINATURA

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~

RESUMO

A delipidação química tem sido utilizada como alternativa para a melhoria da criotolerância em embriões produzidos *in vitro* (PIV). Este estudo foi realizado objetivando avaliar o efeito da L-carnitina (LC) sobre o desenvolvimento e a sobrevivência de embriões bovinos PIV vitrificados pelo método Cryotop no primeiro ensaio, e no segundo ensaio o efeito comparado da LC e Forskolin em embriões criopreservados por Cryotop (Experimento 1), ou por congelamento lento modificado (Experimento 2). Para isto foram avaliadas a atividade mitocondrial, o conteúdo de lipídeos intracitoplasmático (LI), a apoptose celular e a eclosão após o aquecimento. No primeiro ensaio a LC foi utilizada na concentração de 0,6 mg/mL no meio para maturação (MIV), cultivo (CIV) e/ou recultivo embrionário (REC), em quatro tratamentos: sem LC (Controle), LC adicionado ao CIV (LCiv), LC ao CIV+LC ao REC (LCivR), e LC ao MIV/CIV+ LC ao REC (LMivCR). A adição de LC aumentou ($P < 0,05$) a produção de blastocistos em D7 em 28,6% (LCiv), a quantidade de embriões grau I em 36,9% (LCivR), a taxa de re-expansão em 22,7%, a eclosão em 20,1% (LCiv) e a atividade mitocondrial foi 1,9 vezes maior ($P < 0,001$) (LCivR) em relação ao Controle. A quantidade LI foi 29% menor em LCiv e LCivR e 50,2% em LMivCR comparado Controle ($P < 0,001$). No segundo ensaio os embriões foram cultivados sem adição de delipidadores (Controle), na presença de 10 μ M de Forskolin adicionado ao CIV no D5 (FORSK) ou L-carnitina (0,6 mg/mL) adicionada ao CIV e ao recultivo (LC). A suplementação com LC aumentou a produção de blastocistos em D7 em 22,0% e de embriões grau I em 30,1% ($P < 0,05$), em relação ao Controle e ao FORSK. No Experimento 1 a taxa de re-expansão no LC aumentou ($P < 0,05$) 28,9% em relação ao FORSK. No Experimento 2 foram utilizados dois tratamentos Controle para congelamento lento (Clássico e Modificado). A eclosão após 48 horas foi maior ($P < 0,05$) no LC em comparação ao FORSK e aos Controles Clássico e Modificado (77,5%, 41,9%, 40,5%, 40,8% respectivamente). No tratamento LC foi observada diminuição ($P < 0,05$) de 64,7% na taxa de embriões degenerados em relação ao Controle Clássico. O tratamento com delipidadores reduziu o conteúdo de LI ($P < 0,001$) em 2,2 vezes em FORSK e quatro vezes no LC comparados ao Controle. A adição de 0,6 mg/mL de L-carnitina aos meios de cultivo e recultivo aumentou a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos atuando positivamente sobre a atividade mitocondrial, reduzindo a quantidade de lipídeos intracelulares e a apoptose e aumentando a criotolerância dos embriões submetidos ao protocolo de congelamento lento modificado.

Palavras-chave: L-carnitina; Forskolin; PIVE; congelamento lento; embriões bovinos.

ABSTRACT

Chemical delipidation has been used as an alternative to improve the cryotolerance of *in vitro* produced embryos (IVP). The aim of this study was evaluate the effect of L-carnitine (LC) on the development and survival of vitrified IVP bovine embryos by the Cryotop method in the first assay, and in the second trial the effect of LC and Forskolin on Cryotop cryopreserved embryos Experiment 1), or by modified slow freezing (Experiment 2), so mitochondrial activity, intracytoplasmic lipid (LI) content, cellular apoptosis (NCA) and hatching after heating were evaluated. In the first essay LC was used at the concentration of 0,6 mg/mL in maturation culture medium (IVM), embryo culture (IVC) and / or post-thawing (REC), in four treatments: without LC (Control), LC added to CIV (LCiv), LC to CIV + LC to REC (LCivR), and LC to MIV / CIV + LC to REC (LMivCR). The addition of LC increased the production of blastocysts in D7 by 28.6% (LCiv) and the amount of embryos grade I by 36.9% (LCivR), the re-expansion rate in 22,7% and hatching in 20.1% (LCiv), and mitochondrial activity was 1.9 times higher ($P < 0.001$) (LCivR) than Control. The LI quantity was 29% lower in LCiv and LCivR and 50.2% in LMivCR compared Control ($P < 0.001$). In the second experiment the embryos were cultured without addition of delipidators (Control), in the presence of 10 μ M of Forskolin added to the IVC in D5 (FORSK) or L-carnitine (0.6 mg / mL) added to the IVC and in post-thawing (LC). LC supplementation increased the production of blastocysts in D7 by 22.0% and grade I embryos by 30.1% ($P < 0.05$), in relation to Control and FORSK. In Experiment 1, the re-expansion rate in LC increased ($P < 0.05$) 28.9% in relation to FORSK. In Experiment 2, two Control treatments were used for slow freezing (Classic and Modified). Hatching after 48 hours was greater ($P < 0.05$) in LC compared to FORSK and Classical and Modified Controls (77.5%, 41.9%, 40.5%, 40.8% respectively). In the LC treatment, there was a decrease ($P < 0.05$) of 64.7% in the degenerate embryo rate in relation to the Classical Control. Treatment with delipidators reduced LI content ($P < 0.001$) by 2.2 fold in FORSK and four times in the LC compared to Control. The addition of 0.6 mg / mL of L-carnitine to the culture medium and the post-thawing increased the rate of *in vitro* production of bovine embryos acting positively on mitochondrial potential, reducing the amount of intracellular lipids and cellular apoptosis and increasing cryotolerance of embryos submitted to the modified slow freezing protocol.

Keywords: L-carnitine; Forskolin; IVP; slow freezing; bovine embryos.

A minha família, pelo amor incondicional.
Aos meus verdadeiros amigos que sempre torceram por mim.
Dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que apesar de todas as pedras no caminho e aos momentos de dúvidas não me deixou desistir.

A minha família que mesmo na distância nunca faltaram, e sempre me apoiaram nessa caminhada.

À Universidade Federal de Goiás (UFG), ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PGZ), e a todos os professores e funcionários que participaram ao longo desta caminhada em especial a Dona Eneida.

À minha orientadora Dra. Maria Lúcia Gambarini pela oportunidade, ensinamentos, e pelo tempo dedicado ao meu projeto.

Ao professor Dr. Benedito Dias de Oliveira Dias que abriu as portas da UFG, inicialmente como meu orientador, fica meu agradecimento.

Ao Dr. Carlos Frederico Martins pelo seu vasto conhecimento e pelas trocas de experiências nos momentos de dificuldades.

Aos funcionários do Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (Embrapa-CTZL) e a Embrapa- Cenargen na pessoa da Dra. Margot Dode que não mediu esforços para colaborar.

Ao Dr. Marcos Fernando da Embrapa Arroz e Feijão, sempre apresentando ótimas idéias.

A Universidade Estadual de Goiás –(UEG) Campus São Luís de Montes Belos e ao Professor Dr. Klayto dos Santos, que abriu as portas do laboratório e possibilitou a realização dos experimentos.

Aos frigoríficos JBS de Goiânia, Frigonorte, União Alimentos e Frigoboi por permitirem coleta de ovários sempre que solicitados.

A Thaisa Campos Marques pela ajuda efetiva durante toda a realização do projeto e pela seriedade e qualidade dos trabalhos realizados, meu muito obrigado.

Aos alunos de graduação e estagiários do Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da UFG, em especial a Paola, Eduardo e Rafael.

Aos alunos de graduação e estagiários do Centro de Biotecnologia e Reprodução Animal – Biotec - UEG

Aos professores Dr. Manoel Biancardi e Dra. Fernanda Alcântara, por permitirem que utilizássemos o microscópio de fluorescência no Laboratório de Histofisiologia do

Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB3) da UFG, que foi essencial para a realização dos experimentos.

Ao co-orientador professor Dr. Emmanuel Arnhold e a co-orientadora professora Dra. Regiani Nascimento Gagno Porto pelo auxílio no desenvolvimento da tese.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo aporte financeiro o qual viabilizou a realização do doutorado.

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente desta conquista, meus agradecimentos!

*“A pedra preciosa não pode ser polida sem fricção,
nem o homem aperfeiçoado sem provação.”*

Confúcio

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões – (PIV)	2
2.2 Características dos embriões PIV	3
2.3 Espécies Reativas ao Oxigênio (EROS) e Acúmulo de Lipídeos Intracitoplasmáticos (LI)	5
2.4 Maturação ovocitária	6
2.4.1 Maturação Nuclear	7
2.4.2 Maturação citoplasmática e molecular	7
2.5 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	8
2.6 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	9
2.7 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	10
2.8 Criopreservação de embriões	11
2.8.1 Vitriificação	13
2.8.2 Congelamento lento	14
2.9 Produção de energia via beta oxidativa	15
2.10 Delipidação celular	17
2.11 L-carnitina	19
2.11.1 Efeito anti-oxidante da L-carnitina	21
2.11.2 Potencial mitocondrial	22
2.12 Forskolin	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Geral	25
3.2 Específico	25
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA ADIÇÃO DE L-CARNITINA AO MEIO DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> E NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS	39
RESUMO	39
1 INTRODUÇÃO	41

2	MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1	Composição dos meios	42
2.2	Seleção de ovócitos e maturação <i>in vitro</i>	43
2.3	Fecundação <i>in vitro</i>	44
2.4	Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	44
2.5	Vitrificação, aquecimento e recultivo dos embriões.....	44
2.6	Análise da Atividade Mitocondrial (AAM).....	45
2.7	Avaliação de células apoptóticas	46
2.8	Avaliação do teor lipídico intracelular.....	46
2.9	Delineamento experimental	47
2.10	Análises Estatísticas.....	48
3	RESULTADOS	48
4	DISCUSSÃO.....	54
5	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	56
	CAPÍTULO 3 - EFEITO DA ADIÇÃO DOS DELIPIDADORES QUÍMICOS L-CARNITINA E FORSKOLIN NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> , VITRIFICAÇÃO (CRYOTOP) E NO CONGELAMENTO LENTO DE EMBRIÕES BOVINOS.	63
	RESUMO	63
1	INTRODUÇÃO	65
2	MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1	Composição dos meios	67
2.2	Seleção de ovócitos e maturação <i>in vitro</i>	67
2.3	Fecundação <i>in vitro</i>	67
2.4	Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	67
2.5	Vitrificação, aquecimento e recultivo dos embriões.....	68
2.6	Congelamento Lento - Clássico, aquecimento e recultivo dos embriões	68
2.7	Congelamento Lento - Modificado, aquecimento e recultivo dos embriões	69
2.8	Número de células apoptóticas	69
2.9	Avaliação do teor lipídico intracelular.....	69
2.10	Delineamento experimental	70
2.11	Análises Estatísticas.....	71
3	RESULTADOS.....	71
4	DISCUSSÃO.....	78

5 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	82
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÃO FINAIS	88
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	89
ANEXO B – CLASSIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VIVO</i> DE ACORDO COM O ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO	92

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- FIGURA 1 - Via de β -oxidação de ácidos graxos (lipídeos) e seus reguladores.
Fonte: Adaptado de Dunning & Robker 2012.....20
- FIGURA 2 - Estrutura molecular do Forskolín (7_-acetoxo-8,13-epoxo-1_,6_,9_-trihidroxiabd-14-ene-11-one) extraído das raízes de *Coleus forskohlii*. Fonte: Seamon et al. 1981.....23

Capítulo 2

- FIGURA 1 – Cinética de desenvolvimento de embriões vitrificados pelo método Cryotop e reaquecidos, avaliando re-expansão às 2 horas, eclosão em 24 e 48 horas após reaquecimento.....50
- FIGURA 2 – Análise de apoptose celular em embriões realizada após 24 horas do reaquecimento pela técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling).....51
- FIGURA 3 – Quantificação de lipídeos intracelulares por fluorescência utilizando Vermelho do Nilo em embriões bovinos vitrificados, reaquecidos e cultivados por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata (n = 116). ($P < 0,001$ pelo teste de Kruskal-Wallis). Eixo Y: média de fluorescência do Controle foi definida como 1.00.....52
- FIGURA 4 – Quantificação de conteúdo lipídico intracelular dos embriões realizada após 24 horas do reaquecimento utilizando corante lipídico específico Vermelho do Nilo.....52
- FIGURA 5 – Atividade mitocondrial em embriões bovinos vitrificados, reaquecidos e cultivados por 24hs. As análises foram realizadas em triplicata (n = 120). ($P < 0,001$ pelo teste de Kruskal-Wallis). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00.....53
- FIGURA 6 – Análise de atividade mitocondrial de embriões realizada após 24 horas do reaquecimento utilizando MitoTracker Orange e Hoechst.....53

Capítulo 3

- FIGURA 1 – Quantificação de lipídeos intracelulares por fluorescência utilizando Vermelho do Nilo em embriões bovinos vitrificados, reaquecidos e cultivados por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata (n = 75). $P < 0,001$ (pelo teste de Kruskal-Wallis). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00.....72

- FIGURA 2 – Quantificação de conteúdo lipídico intracelular dos embriões realizada após 24 horas do reaquecimento utilizando corante lipídico específico vermelho do Nilo.....73
- FIGURA 3 – Cinética de desenvolvimento de embriões vitrificados pelo método Cryotop e reaquecidos, avaliando re-expansão às 2 horas, eclosão em 24 e 48 horas após reaquecimento.....75
- FIGURA 4 – Cinética de desenvolvimento de embriões criopreservados pelo método de congelamento lento e reaquecidos, avaliando re-expansão às 2 horas, eclosão em 24 e 48 horas após reaquecimento.....77

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- TABELA 1 – Taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos, sem L-carnitina (controle) e cultivados na presença de L-carnitina no CIV (LCiv e LCivR), no MIV + CIV (LMivCR).....49
- TABELA 2 – Taxa de re-expansão (2 horas) e eclosão (24 e 48 horas) de blastocistos expandidos produzidos *in vitro*, sem L-carnitina (Controle) e cultivados na presença de L-carnitina no CIV (LCiv), no CIV+ LC no reaquecimento (LCivR), e LC no MIV e CIV+ LC no reaquecimento (LMivCR), vitrificados, aquecidos e recultivados por 48 horas.....49
- TABELA 3 –Análise de apoptose celular pela técnica TUNEL em blastocistos expandidos produzidos *in vitro*, sem L-carnitina (Controle) e cultivados na presença de L-carnitina no CIV (LCiv), no CIV+ LC no reaquecimento (LCivR), e LC no MIV e CIV+ LC no reaquecimento (LMivCR), vitrificados, aquecidos e recultivados por 24 horas.....51

Capítulo 3

- TABELA 1 –Taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos, sem adição de delipidadores (Controle), cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7) ou 0,6mg/mL de L-carnitina.....72
- TABELA 2 – Taxa de re-expansão (2 horas) e eclosão (24 e 48 horas) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem adição de delipidadores (Controle), cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7), e cultivados na presença de L-carnitina + LC no reaquecimento, vitrificados pelo método do Cryotop, aquecidos e recultivados por 48 horas.....74
- TABELA 3 – Análise de apoptose celular (TUNEL) em embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem adição de delipidadores (Controle), cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7), e cultivados na presença de L-carnitina+ LC no reaquecimento, vitrificados pelo método do Cryotop, aquecidos e recultivados por 24 horas.....76
- TABELA 4 – Taxa de re-expansão (2 horas) e eclosão (24 e 48 horas) em embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem adição de delipidadores (Controle Clássico e Modificado) e cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7) e cultivados na presença de L-carnitina + LC no reaquecimento, criopreservados pelo método de congelamento lento, aquecidos e recultivados por 48 horas.....76
- TABELA 5 – Análise de apoptose celular (TUNEL) em embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem adição de delipidadores (Controle) e cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7) e cultivados na presença de L-carnitina + LC no reaquecimento, criopreservados pelo método de congelamento lento, aquecidos e recultivados por 24 horas.....78

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AAM	Análise da atividade mitocondrial
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
Be	Blastocistos eclodidos
BSA	Albumina sérica bovina
CCO	Complexo cumulus-ovócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CLA	Isômeros do ácido linoléico conjugado
CoA	Acetil coenzima A
CPT1B	Carnitina palmitoil transferase I
CPT2	Carnitina palmitoil transferase II
CTZL	Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira
D0	Dia zero
D3	Dia três
D5	Dia cinco
D7	Dia sete
DNA	Ácido desoxirribonucleico

DT	Transferência direta
DV1/2	Solução de desvitrificação 1 e 2
EGA	Ativação do genoma embrionário
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FORSK	Forskolin
G	Gauge
GSH	Glutationa na forma reduzida
GVBD	Quebra da vesícula germinativa
H2DCFDA	Diacetato de 6-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IA	Inseminação artificial
ICB3	Instituto de Ciências Biológicas 3
LC	L-carnitina
LCiv	L-carnitina adicionada ao meio de cultivo
LCivR	L-carnitina adicionada ao meio de cultivo e ao recultivo
LMivCR	L-carnitina adicionada ao meio de maturação, cultivo e ao recultivo
lncRNA	RNA longo não codificador
LH	Hormônio luteinizante
LI	Lipídeos intracelulares
LPO	Peroxidação lipídica
LRA	Laboratório de Reprodução Animal
M	Molar
MII	Metáfase II
MCI	Massa celular interna
Mg	Miligrama
MIV	Maturação <i>in vitro</i>

mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOET	Múltiplas ovulações e transferência de embriões
mRNA	Àcido ribonucleico mensageiro
N ₂	Nitrogênio líquido
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidado
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
NCA	Número de células apoptóticas
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NTC	Número total de células
O ₂	Molécula de oxigênio
OPS	<i>Open Pulled Straw</i>
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-PVA	0,1% de álcool polivinílico em tampão fosfato-salino
PBS-PVP	0,1% de polivinilpirrolidona em tampão fosfato-salino
PES	Etossulfato de fenazina
Pf	Pós-fertilização
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PPGZ	Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
REC	Recultivo embrionário
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SM	Solução de manutenção
SOB	Super Ovulação

SOPS	Superfine Open Pulled Straw
SSS	Soro sintético quimicamente definido
SV1/2	Solução de vitrificação 1 e 2
TAG	Triacilglicerol
TCA	Ácido tricarboxílico
TE	Transferência de Embriões
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling
U	Unidade
UEG	Universidade Estadual de Goiás
UFG	Universidade Federal de Goiás
v/v	Volume por volume
VG	Estágio de vesícula germinativa
ZP	Zona pelúcida

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é um método que permite a coleta de gametas imaturos de forma rápida e frequente, sendo a produção estimada em 3,5 vezes maior que a superovulação convencional (SOV) ^{1,2}.

A utilização da transferência de embriões afeta a produção pelo aumento do progresso genético em programas de melhoramento animal e pode ser uma ferramenta alternativa para produzir animais cruzados, possibilitando também a utilização de semen sexado com maior eficiência ³.

Hoje o Brasil é o maior produtor mundial de embriões PIV, sendo que o último levantamento realizado em 2015 e publicado em 2017 aponta uma produção total de 375.894 embriões, dos quais 353.539 embriões PIV. A produção *in vitro* representa 97,2% do total de embriões de bovinos leiteiros e 90,2% em bovinos de corte ⁴.

O uso de tecnologias de embriões no Brasil aumentou 726,5% nos últimos 20 anos, mas ainda representam apenas 0,33% do número de vacas e novilhas em idade reprodutiva, o que coloca o país na 11ª posição no ranking que avalia a intensidade de uso de tecnologias de embrião, ficando atrás do Canadá, EUA e vários países europeus ⁴.

Os dados demonstram que o Brasil possui um grande potencial para a expansão do mercado de embriões, tanto no âmbito interno como para a atividade internacional de importação e exportação de genética. Mas um grande obstáculo para a disseminação da tecnologia é a grande sensibilidade dos embriões bovinos PIV à criopreservação ⁵⁻⁷.

Os embriões cultivados *in vitro* apresentam maior quantidade de lipídeos intracelulares, quando comparados com os produzidos *in vivo* ^{8,9}. Esse acúmulo lipídico nos embriões e a localização destas gotas são fatores que comprometem o desenvolvimento e a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (vs. *in vivo*) ⁹⁻¹¹, sendo um dos fatores que causam as lesões durante a criopreservação ¹².

A utilização de delipidação parcial pode se mostrar eficiente melhorando as taxas de sobrevivência pós criopresevação, o que é observado na delipidação física ¹³⁻¹⁵ e química utilizando cofatores da via metabólica da β -oxidação, como L-carnitina (LC) ¹⁶⁻¹⁸ e moduladores do AMPc como Forskolín ¹⁹⁻²⁴. Além da função metabólica, a L-carnitina

possui ação antioxidante e habilidades de eliminação de radicais livres, reduzindo as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROS)^{18,25}.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões – (PIV)

A necessidade de acelerar o ganho genético nos bovinos leiteiros e de corte assim como difusão de material genético com qualidade superior, tem contribuído para o desenvolvimento de biotecnologias como programas de múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOET/TE), e a produção *in vitro* de embriões (PIV). A PIV é uma importante biotécnica reprodutiva que permite a interação entre o espermatozoide e o ovócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo²⁶.

O principal objetivo da PIV consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de animais de alto valor genético e também aqueles que não estão mais aptos a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais². Outro ponto importante é gerar conhecimento nas áreas relacionadas à ovogênese, foliculogênese, fecundação, desenvolvimento embrionário precoce e outras biotécnicas aplicadas à reprodução animal²⁶.

Além disso, a *Ovum Pick-Up* (OPU) / OPU-PIV apresenta maior flexibilidade em relação a TE, pois permite a obtenção de ovócitos de fêmeas a partir dos seis meses de idade (ainda com resultados inferiores nessa idade), de vacas prenhes até o terceiro mês de gestação ou mesmo após o parto²⁷. Outra vantagem está no fato de não ser necessário o uso de hormônios para a recuperação dos ovócitos, aumentando a vida reprodutiva das doadoras e diminuindo o intervalo de produção dos embriões. Se bem conduzida a OPU-PIV não compromete a vida reprodutiva da vaca¹.

As diversas vantagens e aplicações dessa biotécnica estão relacionadas à: determinação e controle do sexo dos produtos; aumento da eficiência dos programas núcleos de produção; rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento; estimação do efeito materno sobre a descendência; rápida multiplicação de raças; facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea; formação de bancos de gametas congelados; aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético e estudo e desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões²⁸.

A produção *in vitro* de embriões envolve três etapas: (a) maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos imaturos, (b) fertilização *in vitro* (FIV) de ovócitos maturados, e (c) cultivo *in vitro* (CIV) de presumíveis zigotos^{26,29}.

Apesar de blastocistos bovinos serem produzidos com algum sucesso sob uma ampla gama de condições de cultivo *in vitro*, a PIV em seu estado atual de desenvolvimento claramente fornece condições abaixo do ideal³⁰. Quando a maturação e a fertilização prosseguem normalmente, a proporção de embriões atingindo o estágio de blastocisto raramente é superior a 40%, e os que chegam a esse estágio podem estar com a qualidade e a competência comprometidas³¹.

No Brasil a média de produção de embriões PIV é de 35,4% e a taxa de prenhez 38,5%³², o que pode explicar esses valores abaixo do desejável são condições sub-ótimas de cultivo que geram embriões de baixa qualidade³¹.

Isso é expresso pela porcentagem de perda gestacional entre os dias 30 e 60 que é maior em embriões PIV quando comparados aos produzidos *in vivo*¹. Essas perdas embrionárias são devidas a anormalidades em vários processos celulares e morfológicos que afetam o a competência do embrião PIV³³.

Nas últimas décadas, tem se observado uma melhoria significativa da taxa de sucesso na PIV, atribuída ao desenvolvimento de meios de cultura com composição mais semelhante à dos fluidos do oviduto e do útero.

2.2 Características dos embriões PIV

O desenvolvimento embrionário inicial em mamíferos é um dos períodos mais críticos para a formação de um novo organismo. Esta fase inicial envolve uma série de alterações morfológicas, anteriores a implantação, como a compactação (mórula), a cavitação (formação da blastocèle), e a expansão do blastocisto (até a eclosão), revisado em Kidder 1992³⁴, e alterações bioquímicas relacionadas à atividade genômica materna, embrionária e a um conjunto complexo de processos fisiológicos, muitos ainda desconhecidos³⁵.

Durante o cultivo de ovócitos e embriões, as condições *in vitro* são inevitavelmente diferentes daquelas *in vivo*. Além disso, a qualidade do ovócito e do embrião são influenciadas por vários fatores incluindo: tempo, temperatura, composição dos meios de cultura e o oxigênio^{36,37}.

Modificações no ambiente de cultura podem modular a expressão gênica em células e embriões de mamíferos ³⁸ influenciando o transcriptoma dos blastocistos ^{35,39}. Particularmente o metabolismo lipídico ^{30,35} e a resposta ao estresse oxidativo ³⁵ são significativamente alterados, modificando assim as taxas de desenvolvimento e sensibilidade à criopreservação ⁴⁰, podendo isso ser a chave para aumentar a eficiência da PIV³⁷.

Os embriões PIV apresentam diferenças morfológicas e funcionais quando comparados aos embriões produzidos *in vivo*. Existindo diferenças na morfologia, cor, densidade, número de células e criotolerância ³⁹. Essas diferenças são atribuídas às condições de cultura que são determinantes críticos para o sucesso do desenvolvimento de embriões PIV em uma ampla variedade de espécies de mamíferos⁴¹.

Quando comparados os embriões PIV apresentam maior número de células apoptóticas que embriões produzidos *in vivo* ⁴², e a taxa de células apoptóticas é um importante marcador de qualidade embrionária ³⁷, pois um número excessivo durante o desenvolvimento embrionário pode levar à uma perda de viabilidade e falha de desenvolvimento ⁴³. Eles exibem o espaço perivitelino mais amplo e com mais vesículas vazias. Apresentam também mais vacúolos e população escassa de microvilosidades na superfície das células do trofoblasto (cuja função é aumentar a área total de absorção, aumentando assim a capacidades de transporte da célula) ²⁹.

O embrião PIV tem redução significativa na rede de conexões e comunicações intercelulares que incluem desmossomos, hemidesmossomos e junções comunicantes, sendo as junções comunicantes em blastômeros críticas para a compactação do embrião e formação da trofotoderme e da massa celular interna (MCI). ^{29,44}.

A expressão de genes também é diferenciada, Zhou et. al ³⁸ observaram que 238 genes estavam diferentemente expressos, duas vezes ou mais quando comparado com embriões *in vivo* de ovulação natural e inseminação artificial (IA). As condições de cultivo também impactam a expressão gênica mitocondrial, incluindo elementos codificadores de proteínas, não-codificantes (RNA longo não codificador (lncRNA)) e transcritos ³⁰. A ação desses lncRNA, juntamente com RNA pequenos não-codificadores (que inclui o micro-RNA) é de regulação epigenômica da expressão gênica. As condições do cultivo *in vitro* durante o tempo de ativação do genoma embrionário (EGA) também influenciam criticamente o transcriptoma dos blastocistos, alterando os padrões de expressão do metabolismo lipídico e resposta ao estresse oxidativo ³⁵.

2.3 Espécies Reativas ao Oxigênio (EROS) e Acúmulo de Lipídeos Intracitoplasmáticos (LI)

Durante o cultivo *in vitro* o estresse oxidativo e o metabolismo de lipídeos apresentam marcada influência no desenvolvimento, qualidade e na morte celular dos embriões. Estudos demonstram que a presença de oxigênio altera a expressão de genes, e existe diferença em blastocistos gerados *in vivo* quando comparados com os *in vitro* em relação e resposta ao estresse oxidativo³⁵. Ovócitos cultivados *in vitro* sob tensão de oxigênio atmosférico (20% O₂) podem produzir altas concentrações de espécies reativa ao oxigênio (EROS)⁴⁵.

As EROS podem se ligar a macromoléculas celulares e promover peroxidação lipídica, inativação enzimática, oxidação e modificação de proteínas, e fragmentação de DNA. Todos estes efeitos são prejudiciais, pois causam alterações em organelas como mitocôndrias que levam a apoptose e bloqueio de células embrionárias e ovócitos⁴⁶.

Durante a cultura, a baixa tensão de oxigênio melhora as taxas de implantação e gravidez em mulheres⁴⁷. Além disso, a suplementação com antioxidantes pode melhorar o desenvolvimento de blastocistos⁴⁸.

Outro fator de extrema relevância é relacionado ao metabolismo de lipídeos, pois o citoplasma dos ovócitos e dos embriões nos mamíferos é naturalmente rico em lipídeos⁴⁹, assim como o fluido folicular bovino que tem níveis abundantes de triglicérides e ácidos graxos livres⁵⁰. No entanto, ovócitos e embriões cultivados na presença de soro fetal bovino apresentam maior quantidade de lipídeos intracelulares, quando comparados com os produzidos *in vivo*^{8,9}, e aqueles oriundos de cultivos sem soro⁵¹. Este acúmulo de lipídeos intra-citoplasmáticos pode levar à síndrome do “bezerro grande”⁵².

O soro contém substâncias benéficas para o desenvolvimento embrionário como substratos energéticos, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados⁵³. Por essa razão, os embriões bovinos são freqüentemente cultivados em meio suplementado com soro, com ou sem co-culturas de células somáticas⁵.

Blastocistos bovinos obtidos *in vivo* apresentam concentração em torno de $33 \pm 0,70$ ng de triglicérides, valores que são semelhantes aos de embriões cultivados sem SFB. Embriões cultivados na presença de soro fetal (10%) no estágio de quatro até oito-células tem concentração aproximada de 34 ng. No entanto há um incremento do estágio de oito-células até blastocisto eclodido (Be) atingindo concentração de $62 \pm 1,14$ ng⁵⁴.

Nesse sentido, o aumento do conteúdo lipídico em embriões PIV poderia estimular a peroxidação de lipídios e aumentar a produção de radicais livres, o que pode comprometer a sobrevivência do embrião ⁶. De fato existe uma relação inversa entre a qualidade do embrião e o seu conteúdo lipídico. É demonstrado que o acúmulo de conteúdo lipídico dentro dos embriões e a localização destas gotas são fatores que comprometem o desenvolvimento e a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (vs. *in vivo*) ⁹⁻¹¹.

O ovócito e o embrião apresentam requerimentos de energia e preferência de utilização diferenciada durante seu desenvolvimento ⁵⁵. Mas é observado um incremento na atividade das lipases com a progressão da maturação ovocitária em bovinos ⁵⁶. Os lipídeos têm um papel significativo no armazenamento de energia, na estrutura, nas propriedades físicas e funções das membranas biológicas, apresentam efeitos sobre interações célula-célula, proliferação celular e transporte intra e inter-celulares ⁵⁷.

A utilização de lipídeos endógenos como fonte de energia pelos ovócitos bovinos é fator determinante durante a maturação ^{54,56} e também para a qualidade do embrião ³⁵, pois estes triglicerídeos têm a capacidade de gerar abundantes ATP mesmo com baixos níveis de substratos extracelulares ^{17,58}. Apesar da sua importância, o metabolismo lipídico é um parâmetro negligenciado no desenvolvimento embrionário inicial ⁵⁹. As formulações de meios comerciais definidos utilizadas para a maturação de ovócitos e cultivo de embriões não incluem um substrato de ácido graxo ⁶⁰. Essa diferença no potencial de desenvolvimento de ovócitos e embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* pode ser relativa à falta de cofatores para facilitar o metabolismo como a L-carnitina, forskolin entre outros.

A ausência de cofatores para facilitar o metabolismo lipídico no meio, como a L-carnitina, pode ser um importante fator contribuinte para o comprometimento do desenvolvimento embrionário durante a cultura *in vitro* quando comparado ao desenvolvimento *in vivo* ⁶¹.

2.4 Maturação ovocitária

A maturação ovocitária em mamíferos é o processo final pelo qual os ovócitos adquirem sua capacidade de gerar uma resposta de ativação e iniciar o desenvolvimento embrionário subsequente ⁶². A qualidade do ovócito ou competência de desenvolvimento, é adquirida progressivamente à medida que o ovócito cresce e amadurece (foliculogênese) ^{17,58}. Essa competência determina a sobrevivência embrionária precoce, o estabelecimento e a manutenção da prenhez, o desenvolvimento fetal e até doenças do adulto ³⁷.

A maturação envolve uma série de mudanças no gameta, os três estágios no processo de maturação do ovócito envolve a maturação nuclear, citoplasmática e molecular, as quais apresentam papel importante na competência dos ovócitos e na qualidade do embrião ⁶³.

2.4.1 Maturação Nuclear

Durante todo o seu desenvolvimento o ovócito se encontra no estágio diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa (VG) ⁶⁴. *In vivo*, o reinício da meiose ou maturação nuclear ocorre após o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) durante o estro, que é acompanhado da expansão das células do cumulus ao redor do ovócito ¹⁷, o que ocorreria naturalmente com a ovulação. *In vitro*, sabe-se que a retirada do ovócito do contato com as células foliculares é o fator primordial para dar início ao processo de maturação nuclear.

A maturação nuclear do ovócito compreende a progressão do estágio de diplóteno da prófase (meiose I) até a fase de metáfase (meiose II) (segunda parada meiótica) ⁶⁴, onde é observada a quebra da vesícula germinativa (GVBD), condensação cromossômica, segregação e extrusão do 1º corpúsculo polar ⁶⁵.

2.4.2 Maturação citoplasmática e molecular

A maturação citoplasmática envolve a reorganização de organelas, aumento nos níveis de antioxidantes ⁶⁵, o armazenamento de mRNAs e proteínas ⁶⁶, e a migração dos grânulos corticais. A ativação de vias envolvidas na síntese de proteínas e fosforilação são indispensáveis para a maturação citoplasmática e subsequente desenvolvimento embrionário ⁶⁶. Durante a maturação do ovócito ocorrem alterações nas vias metabólicas de produção de energia ³⁷. O metabolismo e níveis de ATP do ovócito e células cumulus adjacentes estão associados à qualidade e ao potencial de desenvolvimento ⁶⁷.

Ovócitos bovinos sofrem alterações no número e distribuição de organelas citoplasmáticas de maneira específica para cada fase do desenvolvimento folicular. No ovócito imaturo, as mitocôndrias estão agregadas ao redor da vesícula germinativa (GV) ⁶⁸ e na periferia do ovócito, sendo que as mitocôndrias tem pouco contato com as gotículas de lipídeos ⁶⁹. Com a progressão da maturação e quebra da vesícula germinativa as mitocôndrias são encontradas dispersas por todo o citoplasma do ovócito associadas a gotículas lipídicas ^{68,69}. O ovócito mamífero contém tipicamente cerca de 100.000 mitocôndrias que podem

ocupar até 30% do espaço citoplasmático⁶⁸. A β -oxidação desempenha papel essencial nos processos nucleares e citoplasmáticos que são necessários para a retomada da meiose e aquisição de competência de desenvolvimento do ovócito¹⁷.

2.5 Maturação *in vitro* (MIV)

Para a obtenção de ovócitos imaturos para a PIV podemos lançar mão da aspiração folicular transvaginal ou *Ovum Pick Up* (OPU) (*in vivo*), ou da coleta de ovários de abatedouro (principalmente para pesquisa). A técnica de aspiração folicular transvaginal tem sido a melhor opção para a recuperação de ovócitos na espécie bovina⁷⁰. A eficiência do procedimento de aspiração folicular está relacionada à metodologia utilizada, e esta, interfere na quantidade e morfologia dos complexos cumulus ovócitos (CCOs) e conseqüentemente na competência para o desenvolvimento embrionário²⁷. A origem folicular do ovócito³¹, e a sua qualidade ou competência,⁷¹ tem influência significativa sobre o seu potencial de desenvolvimento *in vitro* (do zigoto ao nascimento de um descendente saudável).

Em bovinos, o período de maturação *in vitro* varia de 18 a 24 horas, em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. A MIV ocorre na ausência do ambiente folicular normal resultando em numerosas deficiências, incluindo o metabolismo de energia⁷², exposição à luz, concentração de oxigênio e composição metabólica diferente do meio de cultura comparado ao fluido folicular⁷¹, controle incorreto da inativação do mRNA materno⁷³, entre muitos outros fatores.

A maturação de ovócitos é indiscutivelmente o passo mais importante nos sistemas de produção *in vitro* de embriões³⁷. A possibilidade de maturação *in vitro* é uma tecnologia promissora tanto para o tratamento de infertilidade em humanos quanto na produção animal como meio de aceleração do ganho genético. No entanto, ovócitos derivados de MIV apresentam qualidade inferior aos maturados *in vivo*, com redução no potencial de desenvolvimento⁷¹. A maturação *in vivo* de ovócitos resulta em maiores porcentagens de blastocistos do que MIV^{74,75}, e também maiores taxas de gestação⁷⁵. Estes efeitos negativos da MIV são atribuídos ao microambiente artificial³⁰.

Um dos fatores negativos associados à PIV é a adição de soro ao meio de cultivo. Ovócitos bovinos maturados em 10% de soro têm mais triacilglicerol e mais colesterol do que aqueles maturados sem soro⁵⁷. Da mesma forma os CCO's de camundongo, maturados em 5% soro contém mais lipídios intra-citoplasmáticos⁷⁶. Em camundongos, COCs maturados *in vitro* apresentaram uma expressão significativamente menor de 15 genes associados à via β -

oxidativa de ácidos graxos, (entre elas a expressão da sintetase de Acil-CoA). Eles apresentaram uma redução de 2,8 vezes o nível de oxidação de ácidos graxos quando comparados com maturados *in vivo*⁷⁷.

O alto conteúdo lipídico no ovócito pode ser devido à difusão simples em resposta à concentração de soro no meio^{57,76}, ou uma consequência do estresse ambiental⁴⁰. No entanto, o soro contém também vários fatores de crescimento, citocinas e metabólitos, o que poderia aumentar o nível intracelular lipídico via indução de ácidos graxos mediados por captação e / ou biossíntese de triglicerídeos⁶⁷. Essas alterações nos níveis de ácidos graxos celulares influenciam a fluidez nas membranas.⁶⁷

Como as taxas de maturação nuclear são geralmente grandes ($\geq 70\%$), o desenvolvimento deficiente de ovócitos de MIV é provavelmente devido à maturação citoplasmática inadequada³⁷.

2.6 Fertilização *in vitro* (FIV)

Terminada a etapa de maturação, os ovócitos precisam ser fecundados²⁶. A fecundação se refere ao processo em que o espermatozoide entra em contato com o ovócito, gerando o zigoto, que, posteriormente, se desenvolve até o estágio de blastocisto. Sabe-se que, no processo *in vivo*, os espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o ovócito, e que durante esse trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem a capacitação dos espermatozoides. O processo de capacitação torna possível a ligação da membrana do espermatozoide a receptores específicos na zona pelúcida do ovócito, onde ocorre a reação acrossômica⁷⁸.

In vitro, para que esse processo ocorra, os meios usados devem fornecer um ambiente adequado. O meio mais utilizado para fecundação *in vitro* é o FERT-TALP, que contém em sua constituição fatores capazes de promover a capacitação espermática como é o caso da heparina, revisado em Gonçalves (2007)²⁶.

Após a seleção espermática o co-cultivo (espermatozoide e ovócito) é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 38,8°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Como a fertilização é o primeiro passo do desenvolvimento, a qualidade dos gametas é fundamental para gerar um zigoto com maior potencial de desenvolvimento, e que este chegue ao nascimento saudável⁷³.

2.7 Cultivo *in vitro* (CIV)

A capacidade de um embrião bovino se desenvolver até o estágio de blastocisto, se implantar e gerar uma prole saudável não é um processo simples ⁶³. A embriogênese começa após a fertilização, quando a entrada do espermatozoide no ovócito desencadeia o início de desenvolvimento que foi programado durante a ovogênese ⁷⁹. Um momento crítico para o desenvolvimento embrionário tem início logo após a fecundação, quando o gameta feminino reinicia a meiose para formar o pró-núcleo feminino ²⁶.

O papel do ovócito é fundamental durante o intervalo entre a fertilização e a chamada transição materno-embrionária (MET), quando a atividade transcricional do genoma embrionário se torna totalmente funcional. Durante este período, o desenvolvimento embrionário é apoiado por RNAs maternos e proteínas sintetizadas durante a maturação ⁷³.

A duração deste período de tempo depende das espécies consideradas. Em mamíferos, pode ocorrer no estágio de duas células como no camundongo, ou mais tarde, no estágio de quatro células em suínos, entre o estágio de quatro e oito células em embriões humanos, oito células em coelhos, e entre oito e 16 células em embriões de ovinos e bovinos. Problemas na transição materno-embrionária são um dos fatores mais comuns de bloqueio de desenvolvimento embrionário *in vitro* ⁷⁹.

Em alguns laboratórios o co-cultivo de embriões com células somáticas foi utilizado por muitos anos com bons resultados. Entretanto, esse sistema tem sido substituído ao longo do tempo por sistemas mais simples que utilizam meios semi-definidos como CR-1, CR-2, KSOM e *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF) ²⁶, meio de cultivo celular 199 (TCM-199), meio Ham's F-10.

O meio mais utilizado atualmente é o SOF, suplementado com proteínas, substâncias energéticas, aminoácidos essenciais e não essenciais. Em geral, os meios utilizados para o cultivo embrionário são suplementados com uma fonte proteica tal como soro fetal bovino (SFB), soro sintético quimicamente definido (SSS), e albumina sérica bovina (BSA).⁸⁰

O tempo de cultivo *in vitro* varia de 7-9 dias, dependendo do objetivo, em temperatura de 38,8°C com atmosfera controlada em baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) ou alta tensão de oxigênio (5% de CO₂, em ar (20% de O₂)), e umidade saturada.⁸⁰ Os procedimentos de avaliação de taxa de blastocistos, transferência de embriões e criopreservação são realizados normalmente no D7. Para taxas de eclosão as avaliações podem ser feitas até o D9. A eclosão é um processo exigente em que o blastocisto escapa

através da zona pelúcida (ZP) antes da implantação. É um fator importante para avaliar a qualidade do embrião ⁸¹, assim como o número de células nos blastocistos pode ser um indicador importante da qualidade e implantação do embrião ⁸². Para se obter maior número de blastocistos com alto potencial de implantação a otimização dos meios de cultura é uma condição necessária ⁴³.

2.8 Criopreservação de embriões

A criopreservação bem sucedida de ovócitos e embriões mamíferos oferece oportunidades para a preservação de germoplasma ⁸³, e transporte de genética dentro do país e internacionalmente ⁸⁴, com baixos custos de manutenção ⁸³. Os embriões são as alternativas mais seguras e eficazes para transporte de genética, devido ao baixo risco de transmissão de doenças ⁸⁵. Isso tem grande valor funcional, pois dá também a oportunidade de escolher o melhor momento para a implantação ²¹, e esta é a chave para expandir ainda mais a indústria de embriões PIV^{4,29}.

Embora a criopreservação de embriões em mamíferos seja um procedimento de rotina, existem diferenças consideráveis de eficiência dependendo do estágio, espécie e origem (produzido *in vivo* ou *in vitro*) ¹². O sucesso da criopreservação depende muito da qualidade dos blastocistos ¹⁶. Embriões classificados como grau I ou II apresentam alterações ultraestruturais leves após criopreservação ⁸⁶.

Atualmente existem dificuldades de criopreservação devido à baixa criotolerância do embrião PIV. Os embriões PIV apresentam maior sensibilidade à criopreservação que embriões *in vivo* ^{5,6}. A média de concepção e nascimentos de ovócitos e embriões vitrificados é menor do que não vitrificados ⁷¹. A maior perda ocorre antes dos 45 dias de gestação ⁷ devido principalmente à crioinjúria sofrida pelos embriões durante o processo de congelamento e reaquecimento ¹⁹.

De fato a criopreservação causa danos às células como: fraturas do citoesqueleto (alterações ultraestruturais decorrentes de desorganização de filamentos de actina), alteração na distribuição de organelas (incluindo áreas sem organelas citoplasmáticas e complexo de Golgi localizado longe do núcleo), alteração do padrão de distribuição e atividade mitocondrial, presença de grandes vesículas, diminuição de junções intercelulares ⁸⁶, atraso na retomada de síntese de proteínas, mudanças nos níveis de expressão gênica ⁸⁷, danos no DNA ⁸⁸ e alteração no “imprinting” gênico ⁸⁹, estas crioinjúrias podem indicar estresse oxidativo adicional durante a criopreservação. Apesar das dificuldades encontradas a porcentagem de

embriões PIV criopreservados e transferidos atingiu 22,8% em 2015, o maior valor em uma década ⁴, em parte devido aos avanços obtidos nos últimos anos.

Os fatores que são suspeitos de causar a maior parte das lesões são as quantidades de gotículas lipídicas intracelulares e as alterações na estrutura microtubular, bem como a relação volume / superfície que influencia a penetração de crioprotetores. ¹².

Há vários anos embriões produzidos *in vivo* vem sendo criopreservados com sucesso. Embriões taurinos (*Bos taurus taurus*) produzidos *in vivo* e congelados resultam em maior taxa de prenhez do que embriões zebuínos (*Bos taurus indicus*), apesar de embriões taurinos apresentarem maior acúmulo de lipídeos citoplasmáticos quando comparado com embriões zebuínos ⁹⁰. Essas diferenças de criotolerância além do acúmulo de lipídeos intracelulares podem ser associadas ao perfil de lipídeos de membrana já que existe diferença entre embriões de taurinos e zebuínos produzidos *in vivo* ⁹, que podem determinar alterações na fluidez de membrana ⁹. A estabilidade da membrana é um fator importante para determinar a suscetibilidade do embrião ao congelamento ⁹¹.

Ovócitos e embriões produzidos *in vitro* e cultivados na presença de soro apresentam maior conteúdo lipídico intracelular (principalmente na forma de gotículas) em comparação com embriões produzidos *in vivo* ^{8,10} e sistemas de cultura livres de soro ⁵¹. A maioria das gotículas lipídicas em blastocistos *in vivo* ocorrem na MCI e não nas células trofoblásticas. Nos embriões PIV, além do aumento de gotículas de lipídios observadas, ocorre uma distribuição uniforme no trofoblasto e MCI ⁹. A alta quantidade de conteúdo lipídico no citoplasma está relacionada à crioinjúria em ovócitos ^{14,92} e em blastocistos bovinos e suínos ^{5,14}.

A distribuição e densidade das gotas de lipídeos nos ovócitos bovinos MIV é principalmente periférica. A presença de lipídeos nas membranas (periféricos) aumenta a temperatura na fase de transição ⁹³, e a co-localização das gotas de lipídeos no entorno das organelas ⁹⁴ pode contribuir para a maior sensibilidade devido a danos durante a criopreservação. O ambiente de cultura *in vitro* pode influenciar o potencial de desenvolvimento alterando diretamente as propriedades físico-químicas da membrana celular, incluindo fluidez, permeabilidade e comportamento da fase térmica ⁹⁵.

Embora a suplementação com SFB seja benéfica para o desenvolvimento de blastocistos, a retirada de soro do meio de cultura reduz o conteúdo lipídico e melhora a criotolerância de embriões bovinos ^{5,91} independente do método de criopreservação. Atualmente estão disponíveis protocolos de congelamento lento, técnicas de congelamento rápido e a vitrificação.

2.8.1 Vitrificação

A vitrificação é definida como "a solidificação de um líquido provocado não pela cristalização, mas por uma elevação extrema na viscosidade durante o resfriamento". Durante a vitrificação, diz-se que a solução se torna um vidro, os movimentos moleculares translacionais são significativamente interrompidos, marcando o fim efetivo do tempo biológico⁹⁶.

A fim de tornar a solução vitrificada em nitrogênio líquido e evitar a cristalização durante o aquecimento, a presença de altas concentrações de agentes crioprotetores permeáveis é essencial⁹⁷. Os procedimentos de vitrificação minimizam o tempo de exposição a crioprotetores e diminuem a formação de cristais de gelo⁸⁸. Na verdade o objetivo principal da vitrificação é a eliminação total de lesão celular por formação de cristal de gelo¹², tanto a formação de cristais de gelo intracelular⁹⁸ como a cristalização extracelular⁹⁷ que é a causa mais importante de lesão celular durante o congelamento do embrião⁹⁹.

A formação de cristais de gelo é evitada tanto pelo uso de altas concentrações de crioprotetores como também pelas altas taxas de resfriamento e aquecimento. A aceleração da velocidade das mudanças de temperatura pode oferecer duas vantagens: a redução na concentração de crioprotetores necessária, com conseqüentes efeitos osmóticos e tóxicos, e menos danos por frio, como resultado da passagem rápida pela zona de temperatura "perigosa" (+15 a -5°C)¹².

Métodos mínimos de volume na vitrificação também podem ser úteis para aumentar a velocidade de resfriamento/reaquecimento e evitar danos à zona pelúcida e à lise de células embrionárias¹⁰⁰. O método *Open Pulled Straw* (OPS), onde é utilizado o volume de vitrificação de 1-2 µL, proporciona taxas muito altas de resfriamento e aquecimento (acima de 20.000°C/min)¹². O método Cryotop, onde é utilizado o volume de vitrificação de 0,1 µL as taxas chegam a ser superiores a 40.000°C/min¹⁰⁰, muito superiores à velocidade de resfriamento/reaquecimento da palheta de 0,25mL selada que é em torno de 2.500°C / min¹².

Os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* possuem características diferentes. Quando comparado com o método tradicional de congelação lenta, o método de vitrificação parece ser mais eficiente para a criopreservação de embriões bovinos PIV^{91,101}, que são mais sensíveis a crio-lesões do que os produzidos *in vivo*¹². A vitrificação tem sido considerada uma alternativa para o congelamento lento¹⁹ e é usada rotineiramente nos laboratórios. É uma

técnica fácil de executar e menos onerosa ¹⁰² pois leva menos de 10 minutos para o resfriamento dos embriões ⁹⁷, embora a técnica também tenha suas limitações.

Após a vitrificação é observada uma diminuição no número de células principalmente devido às crioinjúrias e ao fato que os meios de vitrificação contêm altas concentrações de crioprotetores altamente tóxicos, causando fraturas no citoesqueleto ²⁴, altas taxas de aneuploidia causadas por ruptura do fuso meiótico ¹⁰³, e desalinhamento cromossômico equatorial no fuso da metáfase ¹⁰⁴. A toxicidade química dos crioprotetores é o principal fator negativo da vitrificação ¹⁰⁵.

Muitas técnicas de vitrificação são métodos abertos, ou seja, exigem o contato direto do embrião com o nitrogênio líquido, conseqüentemente seu uso invoca mais risco de contaminação cruzada por microorganismos mediada pelo nitrogênio líquido ¹⁰⁰. Outro fator é que, para evitar a expansão celular excessiva durante a remoção do crioprotetor e reidratação (choque osmótico), a redução gradual na concentração do crioprotetor é usada para reidratar os embriões. O método mais comum de remoção gradual do crioprotetor é realizado movendo o embrião em soluções de concentrações sucessivamente menores ¹⁰⁶, ou seja, o reaquecimento não é feito em “one-step” o que dificulta a sua aplicabilidade em nível de campo.

O aquecimento de embriões vitrificados normalmente requer condições laboratoriais tais como: um estereomicroscópio, placa aquecedora, meios de cultura ¹⁶ e um técnico treinado.

2.8.2 Congelamento lento

Um método de criopreservação que permita a transferência direta (DT) de embriões bovinos para receptoras após o descongelamento é um complemento valioso aos procedimentos comerciais de transferência de embriões, e apresentaria vantagens sobre os procedimentos de congelamento atuais, que exigem a remoção passo a passo do crioprotetor após o descongelamento ¹⁶. Eliminará também a necessidade de embriologistas treinados estarem presentes durante a transferência de embriões ¹⁰⁶.

O procedimento de transferência direta permite que cada embrião seja descongelado com um mínimo de equipamento e transferido à medida que as fêmeas receptoras são preparadas para o procedimento. Não são necessárias instalações laboratoriais, uma vez que embriões não são manipulados fora da palheta. ^{16,106}. Uma das vantagens do

congelamento lento é porque ele é realizado em palhetas de 0,25mL lacradas, ou seja, não existe contato direto do embrião com o nitrogênio, conseqüentemente seu uso não traz risco de contaminação mediada por nitrogênio líquido¹⁰⁰ ou ambiental.

No entanto embriões PIV apresentam maior sensibilidade ao congelamento lento em relação aos métodos de vitrificação. Os resultados obtidos com o sistema de vitrificação em OPS foram significativamente melhores do que os obtidos com congelamento lento (taxa de eclosão de 43% versus 12%, respectivamente)⁹¹. Em humanos comparando congelamento lento vs. vitrificação a sobrevivência embrionária foi de 73,1% vs. 88,8% ($p < 0,001$), e a taxa de gravidez foi de 20,0% vs. 36,9%¹⁰⁷. A vitrificação ainda é a melhor estratégia para a criopreservação de todos os estágios de desenvolvimento do ovócito e embriões em humanos¹⁰⁸.

Porém estudos em ovócitos bovinos indicam que as taxas de apoptose foram significativamente aumentadas e o padrão de distribuição mitocondrial alterado no grupo vitrificado, em comparação com o grupo de congelamento lento, demonstrando que altas concentrações de crioprotetores podem ser tóxicas para os CCOs⁸⁹. Não foram encontradas diferenças na taxa de sobrevivência e eclosão de embriões ovinos produzidos *in vivo* quando estes foram criopreservados por congelamento lento e vitrificação, demonstrando que em embriões de alta qualidade as duas técnicas podem ser utilizadas⁹⁸.

Novas metodologias devem ser desenvolvidas para que se produzam embriões PIV de melhor qualidade e que os mesmos suportem o congelamento lento como ocorre com embriões produzidos *in vivo*, onde embriões criopreservados por congelamento lento e transferidos de forma direta produzem gestações em torno de 50%¹⁰⁶.

2.9 Produção de energia via beta oxidativa

A organização mitocondrial e os níveis de adenosina trifosfato (ATP) apresentam um papel essencial na determinação da qualidade e competência do ovócito^{109,110}, e influenciam o metabolismo e a capacidade de desenvolvimento do embrião pré-implantação^{111,112}.

O ovócito e o embrião têm necessidades energéticas diferentes durante o desenvolvimento e a preferência pelo substrato energético muda^{55,113}. O complexo cumulus-ovócito (CCOs) preferencialmente utiliza glicose¹¹⁴, pois a expansão da matriz do cumulus apresentam uma alta demanda por glicose para produção de subunidades de ácido hialurônico

via biossíntese da hexosamina, desviando assim a glicose do destino glicolítico¹¹⁵. Em média, as células do cumulus bovinas exibem 102 vezes mais unidades de fosfofrutoquinase do que o ovócito, e a atividade específica permanece muito alta em comparação a do ovócito desnudado durante a maturação, indicando que esta enzima reguladora da via glicolítica desempenha um papel fundamental no metabolismo dessas células⁵⁶.

O embrião pré-compactação apresenta pouca capacidade de captar ou utilizar a glicose para a produção energia^{113,116}, eles utilizam preferencialmente piruvato e lactato¹¹⁷, e retornam a preferência por glicose na pós-compactação¹¹⁸. A oxidação completa de uma molécula de glicose produz aproximadamente 30 moléculas de ATP¹¹⁹, mas além da glicose, a oxidação de ácidos graxos pode ser importante para a geração do ATP necessário para satisfazer os requisitos de energia para o desenvolvimento dos embriões^{17,49,120}.

O citoplasma de ovócitos e embriões de alguns mamíferos (como bovinos e suínos)⁵² são ricos em lipídios, enquanto outros como o rato não¹²¹. Esta variação na densidade lipídica intracelular de ovócitos e embriões entre espécies é hipoteticamente relacionada ao intervalo entre a ovulação e a implantação. Os ácidos graxos são armazenados nas células principalmente como triacilglicerol (TAG) dentro de gotículas lipídicas rodeadas por proteínas especializadas⁵⁴. As enzimas lipases clivam os triglicerídeos em seu esqueleto de glicerol e três ácidos graxos. Esses ácidos graxos são posteriormente transportados para as mitocôndrias, onde são metabolizados por oxidação^{17,122}. Essa via metabólica lipolítica é chamada de beta-oxidação (β -oxidação).

As mitocôndrias e as gotas lipídicas são co-localizadas aleatoriamente, formando aglomerados de unidades metabólicas funcionais no citoplasma embrionário^{5,94}. Em ovócitos e embriões de mamíferos, os lipídeos intracelulares servem como importante fonte de energia para a produção de ATP nas mitocondriais via β -oxidação⁴⁹, estes lipídeos têm a capacidade de gerar quantidades abundantes ATP mesmo com baixos níveis de substratos extracelulares⁵⁸. Comparando com a glicose os ácidos graxos são várias vezes mais energéticos. A oxidação do ácido graxo palmitato é capaz de gerar 106 moléculas de ATP¹⁷, mas com uma maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROS).

A via metabólica de β -oxidação é expressa tanto em embriões *in vivo* como *in vitro* e durante a maturação ovocitária¹⁷. Ela é um fator determinante para o estabelecimento de competência de ovócitos e embriões⁴⁹. A inibição da via da β -oxidação durante a maturação compromete a quebra da vesícula germinativa¹²³, mesmo em ratos onde a quantidade do conteúdo lipídico do ovócito é menor⁵⁸ e reduz o desenvolvimento subsequente do blastocisto^{17,54}.

A utilização e a densidade de lipídeos muda durante o desenvolvimento pré-implantacional, havendo um incremento na atividade das lipases com a progressão da maturação ovocitária em bovinos ⁵⁶, reduzindo o conteúdo de triglicerídeos em ovócitos bovinos imaturos de $59 \pm 1,37\text{ng}$ para $46 \pm 0,85\text{ng}$ após 24h de maturação ⁵⁴. A β -oxidação também é observada entre a formação do zigoto e o estágio de duas células no camundongo ¹⁷, mas aumenta aproximadamente cinco vezes no estágio de blastocisto ¹²⁴.

A promoção do metabolismo de ácidos graxos é benéfica, acelera a maturação nuclear e aumenta o desenvolvimento embrionário partenogenético em suínos, possivelmente por incrementar o ATP gerado pelo metabolismo da glicose ¹²⁵. A capacidade aumentada do CCO em utilizar ácidos graxos como um substrato energético pode diminuir a necessidade metabolizar glicose, permitindo que a glicose seja armazenada ou dirigida a outras vias essenciais. ¹²⁶.

2.10 Delipidação celular

Em comparação com outras espécies de mamíferos, ovócitos e embriões de bovinos e suínos são caracterizados por grandes quantidades de conteúdo lipídico, armazenado principalmente sob a forma de gotículas no citoplasma ⁸. A distribuição e densidade das gotas de lipídeos em ovócitos bovinos maturados *in vitro* é principalmente periférica, diferente da distribuição *in vivo* ⁹³. A maioria das gotas lipídicas em blastocistos produzidos *in vivo* ocorre na massa celular interna (MCI) e não nas células trofoblásticas, ao contrário dos embriões PIV. Além do aumento de gotas de lipídios ocorre distribuição uniforme no trofoblasto e MCI, o que pode indicar desequilíbrio no metabolismo mitocondrial, com menor utilização das reservas de gordura ⁹.

Essas alterações na quantidade e na distribuição destas gotas lipídicas alteram a qualidade de ovócitos e embriões. Algumas técnicas de delipidação química e física se mostram eficientes na melhoria destes ovócitos e embriões. A princípio a centrifugação de embriões bovinos e suínos no estágio de quatro a oito células e a delipidação por micromanipulação ^{13,14}, bem como a centrifugação de ovócitos e embriões suínos sem micromanipulação ¹⁵ se mostraram eficientes na remoção de gotas lipídicas, melhorando as taxas de sobrevivência pós criopresevação.

Atualmente a delipidação mais utilizada é através de lipólise química utilizando cofatores que aumentam a utilização, reduzem a captação e síntese de ácidos graxos pelas

células. Substâncias como o etossulfato de fenazina (PES)¹²⁷, Forskolin²², L-carnitina¹⁶ e isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA)¹²⁸ têm sido estudadas.

O uso de isômeros de ácido linoleicos conjugados (CLA) na maturação não melhora a produção de embriões¹²⁹. Eles diminuem o conteúdo de lipídeo intracitoplasmático e melhoram a criotolerância em embriões bovinos PIV, mas não altera a qualidade ou desenvolvimento embrionário para o estágio de blastocisto¹²⁸. Em doses mais altas o CLA diminui a produção de embriões e aumenta a quantidade de lipídeos intracelulares¹²⁹. O isômero CLA trans-10, cis-12 foi citado pelo seu efeito inibitório na absorção e produção de lipídeos pelas células através das suas propriedades anti-adipogênicas¹³⁰.

A utilização de CLA não altera os níveis de mRNA para genes relacionados ao estresse celular e apoptose¹³¹. Embora o mecanismo exato pelo qual esse isômero do CLA atua na redução da gordura ainda não tenha sido completamente elucidado, pesquisas sugerem que ele é devido ao aumento do consumo de energia, inibição da síntese “*de novo*” e aumento da oxidação de ácidos graxos. Além disso, o CLA também diminui o tamanho, inibe a diferenciação e induz a apoptose nos pré-adipócitos^{132,133}.

O etossulfato de fenazina (PES) é um regulador metabólico que inibe a síntese de ácidos graxos e favorece o metabolismo da glicose através da via das pentoses para a produção de ATP, uma vez que oxida o NADPH a NADP⁺^{134,135}. O aumento da atividade mitocondrial e a redução do conteúdo lipídico citoplasmático também são relatados para embriões bovinos tratados com PES¹³⁶, assim como o aumento da capacidade de eclosão pré e pós-criopreservação (indicativo de criotolerância de embriões)¹²⁷. No entanto, não foi encontrado aumento significativo na taxa de blastocisto quando o PES foi adicionado no dia 4 de cultivo, e foram observados efeitos negativos quando o PES foi adicionado ao meio de cultura a partir do dia 2,5¹³⁶. Embriões cultivados com LC apresentam maior taxa de blastocistos (38,8%) em relação PES (27,1%), e uma maior abundância de transcriptos para o Interferon-tau¹²⁷.

Os estudos apontam que a lipólise quimicamente induzida por Forskolin (modulador do AMPc) melhora na sobrevivência de ovócitos^{19,20} e embrião suínos^{21,22}, e embriões bovinos^{23,24} criopreservados, além de apresentar maior taxa de gestação em embriões bovinos vitrificados¹³⁷.

A L-carnitina (LC) (modulador da via metabólica da β -oxidação) tem ação positiva sobre o metabolismo e a taxa de sobrevivência após criopreservação. Esse efeito foi confirmado em bovinos¹⁶, camundongos¹⁷ e ovócitos suínos¹⁸. Além de sua função metabólica, a L-carnitina tem propriedades antioxidantes¹³⁸, reduzindo o acúmulo de espécies

reativas de oxigênio (EROS) e aumentando os níveis de GSH ⁴¹. A LC e o Forskolin demonstram um grande potencial para melhorar a criotolerância de embriões PIV.

2.11 L-carnitina

A L-carnitina (LC) (3-hidroxi-4-N-trimetilamonibutirato) é uma pequena molécula hidrossolúvel que desempenha um papel muito importante no metabolismo da gordura ¹³⁹. A LC é um potencializador do metabolismo lipídico em células animais, sendo que sua principal função é facilitar o transporte de ácidos graxos livres no citosol para as mitocôndrias para abastecer a β -oxidação e gerar trifosfato de adenosina (ATP) ^{59,140}.

A limitação na taxa de oxidação é o transporte de ácidos graxos ativados para as mitocôndrias, pois os ésteres Acil-CoA não podem atravessar diretamente a membrana interna mitocondrial ¹⁴¹, processo que é catabolizado pela carnitina palmitoil-transferase I (CPTIB), sendo esta a responsável pela transferência da carnitina para CoA formando acil-carnitina ¹²², permitindo a entrada do ácido graxo na região da matriz mitocondrial.

Após a entrada, a carnitina é removida pela carnitina palmitoil-transferase II (CPT2) e o ácido graxo entra na espiral de β -oxidação, produzindo múltiplas moléculas de acetilcoenzimas A (CoA) das quais o ATP é gerado através do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) e do transporte de elétrons ¹⁷ (Figura 1).

A carnitina é liberada do ácido graxo e se liga ao excesso de acetil-CoA para formar acetilcarnitina que é então transportada de volta para o citoplasma ¹⁴². Como resultado, a relação acil-CoA / CoA nas mitocôndrias é mantido.

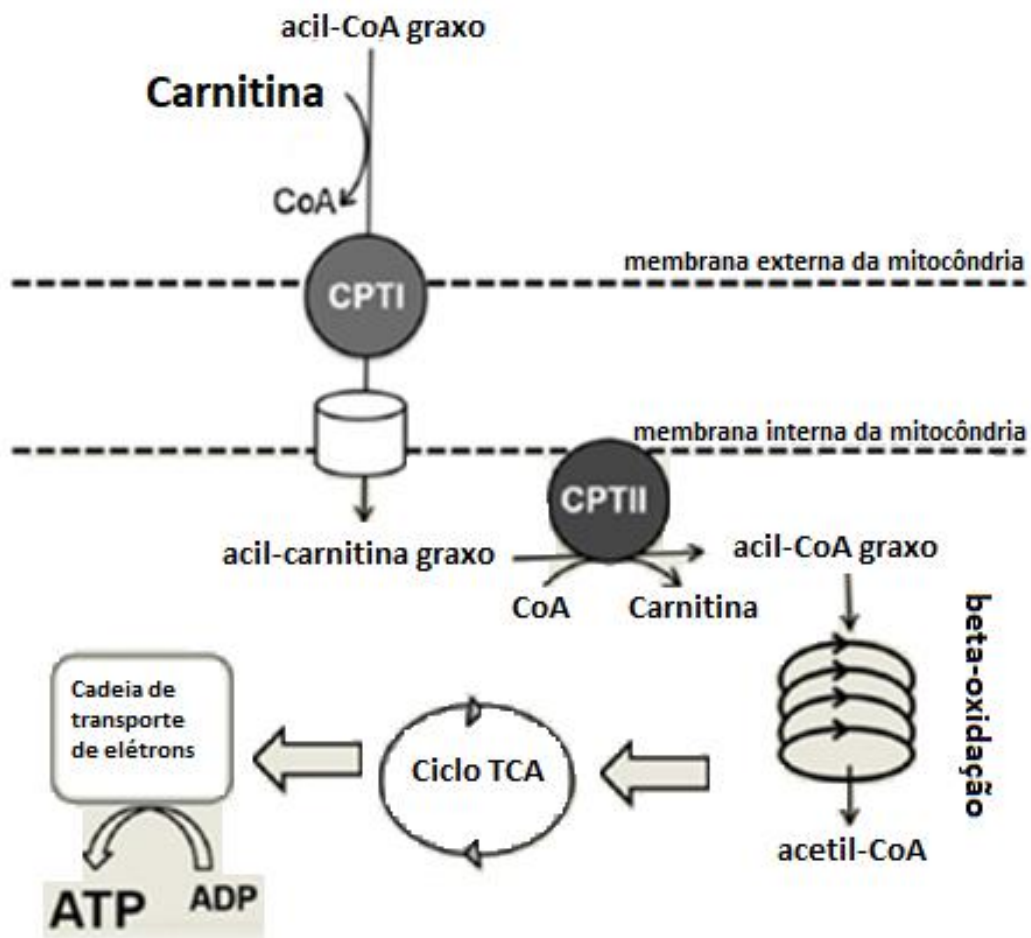


FIGURA1- Via de β -oxidação de ácidos graxos (lipídeos) e seus reguladores.

Fonte: Adaptado de Dunning & Robker 2012¹²².

Nos mamíferos a homeostase da carnitina é mantida pela síntese endógena, absorção a partir de fontes alimentares e reabsorção renal¹⁴³, mantendo os níveis circulantes de carnitina normalmente regulados dentro de uma faixa estreita¹⁴⁴. Tecidos animais e fluidos corporais contém quantidades relativamente elevadas de carnitina em forma livre e esterificadas¹⁴⁵, variando entre 0,2 e 6 $\mu\text{mol}/\text{g}^{-1}$, com as maiores concentrações no coração e músculo esquelético, revisado em Vaz e Wanders (2002)¹⁴³. Também foi encontrado no líquido folicular de mulheres⁵⁹. O principal sítio biossintético é o fígado, embora a butirobetaina hidroxilase (enzima chave para a biossíntese de carnitina) ser encontrada no fígado, rim e cérebro¹⁴³. A LC é uma molécula sintetizada a partir da lisina e metionina contendo uma função de amônio quaternário (carnitina de transporte)⁵⁹.

A LC pode estabilizar as membranas das mitocôndrias e aumentar o fornecimento de energia para as organelas^{138,141}, protegendo a célula da apoptose através da via

mitocondrial¹⁴⁶. Pesquisas demonstram que o tratamento com até 0,6mg/mL de L-carnitina não afeta o desenvolvimento de ovócitos MIV⁹³, não aumenta o nível de apoptose em embriões²⁵, nem a taxa de degeneração, o que indica que a LC nessa concentração não é embriotóxica¹²⁷.

A suplementação de carnitina dietética tem efeitos claros na composição muscular e conteúdo de carnitina tecidual em várias espécies de animais domésticos¹⁴⁴. A suplementação de L-carnitina para mulheres, submetidas ao processo de FIV, aumenta a competência de desenvolvimento dos ovócitos e embriões¹⁴⁵. No entanto altas doses de LC por longo período podem ocasionar disfunção ovariana e baixa qualidade ovocitária, e ainda desequilíbrio na imunidade sistêmica materna em ratos¹⁴⁷, levando a infertilidade.

A adição de LC melhora a competência de ovócitos maturados *in vitro* e aumenta a quantidade de ovócitos que progridem para o estágio de Metáfase II (MII) em bovinos¹⁴⁸ e em suínos^{18,125,149}, principalmente aqueles de baixo potencial de desenvolvimento¹⁵⁰, o mesmo sendo reportado para ovócitos de dromedários¹⁵¹.

O efeito da LC é mais evidente quando adicionada aos ovócitos de baixo potencial de desenvolvimento¹⁵⁰ como observado em humanos, principalmente em mulheres com mais de 40 anos, verificado pela produção de embriões de melhor qualidade quando tratados com LC¹⁵². Para ovócitos de baixo potencial de desenvolvimento obtidos de cordeiras pré-púberes o tratamento com LC foi capaz de dobrar a produção de blastocistos em comparação aos ovócitos não tratados (10,0% e 4,6%)¹⁵³.

2.11.1 Efeito anti-oxidante da L-carnitina

Além de sua função metabólica, a L-carnitina é um poderoso antioxidante¹³⁸, reduzindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e diminuindo a frequência de apoptose em células animais^{146,154}. O mecanismo de ação antioxidante da LC pode ser pelo sequestro de radicais livres¹⁶ via 1,1-difenil- 2-picril-hidrazil (DPPH), pela eliminação dos radicais ânions superóxido, eliminação do peróxido de hidrogênio, potência redutora total, e quelante de metais de íons ferrosos¹³⁸.

O efeito antioxidante da LC foi verificado também em ovócitos e embriões suínos^{18,125}, e em embriões bovinos onde a elevada produção de EROS ocasionada pelo metabolismo de lipídeos foi controlada pela LC¹⁶. O estresse oxidativo também é aumentado em ovócitos quando oxidação de ácidos graxos aumenta, resultando em aumento abundante de genes para manter o equilíbrio redox¹²⁶.

A LC reduz ainda o dano do citoesqueleto e diminui o nível de apoptose em ovócitos e embriões de rato ¹⁵⁵, sendo capaz de neutralizar os efeitos embriotóxicos da indução de estresse oxidativo por H₂O₂ ^{25,149}. A LC também diminuiu o nível de apoptose em embriões de camundongos tratados com actinomicina-D (fator indutor de apoptose) e controla o efeito antiproliferativo induzido pela presença de citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral – alfa (TNF- α)²⁵.

A adição de L-carnitina durante a MIV reduz as EROS e aumenta as concentrações de GSH em ovócitos suínos ¹²⁵, melhorando a competência meiótica e da maturação citoplasmática ¹⁵⁶. A adição ao CIV também inibe a geração de EROS e reduz a incidência de apoptose em embriões suínos partenogênicos ¹²⁵ e embriões clones ⁴¹. Concentrações de 3,72 mM de LC foi eficiente na promoção de algumas respostas celulares no nível de expressão gênica relacionada à homeostase energética e defesa celular antioxidante em embriões ovinos produzidos *in vivo* ¹⁵⁷.

Os efeitos protetores da L-carnitina também podem ser por diminuir as gotas lipídicas em torno de mitocôndrias e / ou para melhorar o metabolismo energético necessário para a sobrevivência celular sob estresse oxidativo ^{158,159}. Durante a cultura embrionária, a pressão causada pelo estresse oxidativo pode ser atenuada adicionando antioxidantes aos meios de cultura ¹⁶⁰.

2.11.2 Potencial mitocondrial

A translocação das mitocôndrias para as regiões centrais é um processo natural durante a maturação *in vivo* ¹⁶¹, sendo que a redistribuição de mitocôndrias ativas é relacionada com a alta produção de ATP, que é requerida durante essa fase ⁶². A distribuição mitocondrial de forma homogênea em ovócitos MIV é associada à competência de desenvolvimento em bovinos ¹¹⁰. No entanto ovócitos suínos maturados *in vitro* apresentam essas translocações com menor abundância ¹⁶¹, possivelmente associados a problemas relacionados ao cultivo.

A LC aumenta significativamente a densidade de mitocôndrias ativas nas áreas centrais em ovócitos suínos MIV ¹⁸, e aumenta os níveis de ATP e da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico em embriões bovinos ¹⁶. Essa translocação mitocondrial foi associada a uma redução significativa de conteúdo lipídico intracelular de ovócitos suínos ⁹⁴. Estudos sugerem que o efeito protetor da L-carnitina ocorre preferencialmente em torno das mitocôndrias ¹⁵⁹. Ela é capaz de estabilizar as membranas

mitocondriais e aumentar o fornecimento de energia para a organela protegendo a célula da apoptose ¹⁴⁶, fato também observado em ovócitos de ratas pré-púberes, nos quais a LC aumentou em duas vezes a via de β -oxidação, melhorando a competência ovocitária ¹⁷.

2.12 Forskolin

O Forskolin (7_-acetoxy-8,13-epoxy-1_,6_,9_-trihydroxylabd-14-ene-11-one) é um diterpeno (Figura 2) extraído das raízes de *Coleus forskohlii*. A substância é capaz de ativar a adenilato ciclase (ATP pirofosfato-liase) em cultura de tecidos ¹⁶². O Forskolin causa uma elevação rápida e prontamente reversível de 35 vezes de AMP cíclico em cortes de córtex cerebrais de ratos, que não é bloqueado por uma variedade de antagonistas de neurotransmissores ¹⁶².

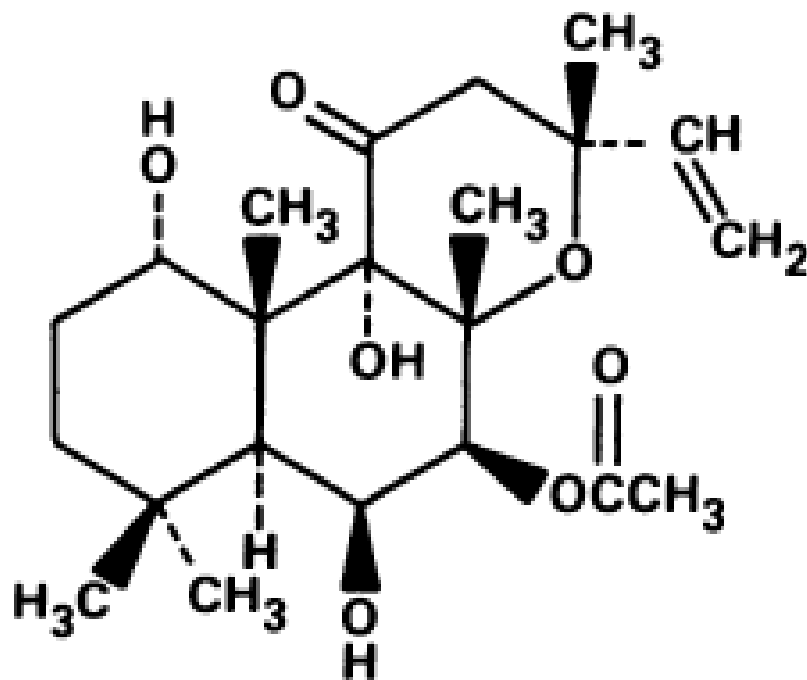


FIGURA 2 – Estrutura molecular do Forskolin (7_-acetoxy-8,13-epoxy-1_,6_,9_-trihydroxylabd-14-ene-11-one) extraído das raízes de *Coleus forskohlii*. Fonte: Seamon et al.1981¹⁶².

As concentrações celulares aumentadas de AMPc ativam as lipases endógenas através da via AMPc / proteína quinase, causando lipólise do triacilglicerol (revisado em Honnor)¹⁶³, ocorrendo a liberação de ácidos graxos + glicerol²¹.

Os métodos de deleção parcial de lipídeos são de grande interesse para criopreservar embriões com maiores conteúdos lipídicos, pois diminuem a chance de lesões em organelas durante o processo de desidratação, criopreservação e descongelamento⁸³. A estimulação química da lipólise com Forskolin têm sido sugerida como método alternativo para melhorar taxas de sucesso da vitrificação para embriões produzidos *in vitro*¹⁹, já que reduz o conteúdo lipídico de ovócitos de suínos⁸³ e de blastocistos¹⁹.

Em embriões bovinos uma concentração de 2,5 µM Forskolin²⁴ ou 5 µM²³, durante 24 horas, já é capaz de reduzir os níveis de lipídios intracelulares, o que é positivo, pois o uso de altas doses de drogas é indesejável nos meios de cultura e sistemas *in vitro*²⁴. Estudos demonstram que a utilização de Forskolin reduziu significativamente o conteúdo lipídico de ovócitos suínos e a porcentagem de sobrevivência após criopreservação e descongelamento foi significativamente maior nos grupos tratados⁸³. Em ovócitos pré-MIV o nível de AMPc foi significativamente aumentado e as comunicações celulares do tipo GAP foram mantidas²⁰.

Na PIV de suínos, Park et al.²⁰ observaram também melhora significativa na produção de blastocistos partenogenéticos e clones utilizando Forskolin. Em bovinos não houve diferenças na produção de blastocisto utilizando 10µM por 48 horas¹³⁷, o que foi observado também quando se utilizou 2,5 e 5 µM por 24 horas. Neste estudo a produção de blastocistos utilizando 10µM foi menor que o controle e os outros tratamentos²³.

Concentrações mais baixas de Forskolin (2,5 µM) aumentam o número total de células em embriões bovinos²⁴, já concentrações mais altas (10 µM) não resultaram em uma diferença em relação ao número de células em embriões de controle *in vitro*¹⁶⁴, assim como em embriões suínos *in vivo*²².

O aumento da atividade lipolítica em embriões suínos²¹ e bovinos²³ é associado a uma maior tolerância à vitrificação em termos de sobrevivência embrionária, tanto os produzidos em *in vivo* quanto *in vitro*. *In vivo* o pré-tratamento com Forskolin por 24 horas antes da vitrificação melhora a criotolerância de embriões de duas e quatro células²², já *in vitro* o Forskolin foi capaz de aumentar as taxas de sobrevivência à criopreservação em comparação com os controles (71,2 ± 2,8% versus 37,1 ± 5,1%)¹⁹.

Apesar de vários estudos não encontrarem diferença significativa na criotolerância, há relato de que a utilização de Forskolin em embriões melhora a taxa de

prehenção em relação a controle (48,8% vs. 18,5%)¹³⁷. É possível que o Forskolin possa induzir efeitos nas células embrionárias que ainda são desconhecidos¹³⁷, no entanto, além de causar lipólise química o Forskolin é capaz de manter a integridade do citoplasma do embrião após a criopreservação²⁴.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito da L-carnitina e do Forskolin na produção *in vitro* de embriões bovinos e na criopreservação por vitrificação e congelamento lento.

3.2 Específico

- Determinar qual o melhor momento do desenvolvimento embrionário para a adição do agente delipidador L-Carnitina.
- Comparar a produção de embriões utilizando os agentes delipidadores L-Carnitina e o Forskolin.
- Mensurar o estoque de lipídeos intracitoplasmáticos e a atividade mitocondrial de embriões delipidados.
- Aumentar as taxas de sobrevivência de embriões PIV vitrificados pela técnica do CRYOTOP e pelo congelamento lento em palhetas de 0,25 mL.

REFERÊNCIAS

1. Bousquet D, Twagiramungu N, Morin C, Carboneau G, Durocher J. In Vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*. 1999;51(98):59–70.
2. Durocher J, Morin N, Blondin P. Effect of hormonal stimulation on bovine follicular response and oocyte developmental competence in a commercial operation. *Theriogenology*. 2006;65(1):102–15.
3. Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, et al. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*. 2010;74(8):1349–55.
4. Viana JHM, Figueiredo ACS, Siqueira LGB. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim Reprod* [Internet]. 2017;14(3):476–81. Available from: <http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p476-481> (AR989) SBTE.pdf

5. 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. *Mol Reprod Dev.* 2002;61(1):57–66.
6. Seidel GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology.* 2006;65(1):228–35.
7. Alexopoulos NI, Maddox-Hyttel P, Tveden-Nyborg P, D’Cruz NT, Tecirlioglu TR, Cooney MA, et al. Developmental disparity between in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21 embryos: Implications for embryonic loss. *Reproduction.* 2008;136(4):433–45.
8. Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Kepczynski M, Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology.* 2011;75(1):42–54.
9. Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, et al. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts1. *Biol Reprod* [Internet]. 2012;87(6):1–11. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.112.102897>
10. Thompson JG, Gardner DK, Anne Pugh P, McMillan WH, Robin Tervit H. Lamb Birth Weight is Affected by Culture System Utilized during in Vitro Pre-Elongation Development of Ovine Embryos. *Biol Reprod* [Internet]. 1995;53(6):1385–91. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2761892/Lamb>
11. Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Smorag Z. Changes of lipid composition in non-cultured and cultured porcine embryos. *Theriogenology.* 2010;74(2):265–76.
12. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998;51(1):53–8.
13. Ushijima, H., Yamakawa, H., and Nagashima H. Cryopreservation of bovine IVM/IVF embryos at early cleavage stage following removal of cytoplasmic droplets. *Theriogenology* [Internet]. 1995;159. Available from: [https://www.theriojournal.com/article/0093-691X\(96\)84632-2/abstract](https://www.theriojournal.com/article/0093-691X(96)84632-2/abstract)
14. Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R. J., Grupen, C. G. and N, B. M. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature.* 1995;374:416.
15. Li R, Murphy CN, Spate L, Wax D, Isom C, Rieke A, et al. Production of piglets after cryopreservation of embryos using a centrifugation-based method for delipation without micromanipulation. *Biol Reprod.* 2009;80(3):563–71.
16. Takahashi T, A YI, A TS, A MK, A MG, A TN. Supplementation of culture medium with L -carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev.* 2013;25:589–99.

17. Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development. *Biol Reprod* [Internet]. 2010;83(6):909–18. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.110.084145>
18. Somfai T, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(7):912–20.
19. Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology*. 2006;66(8):2008–16.
20. Park B, Lee H, Lee Y, Elahi F, Lee J, Lee ST, et al. Cilostamide and forskolin treatment during pre-IVM improves preimplantation development of cloned embryos by influencing meiotic progression and gap junction communication in pigs. *Theriogenology*. 2016;86(3):757–65.
21. Cuello C, Gomis J, Almiñana C, Maside C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, et al. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of in vitro-produced pig embryos. *Anim Reprod Sci*. 2013;136(4):296–302.
22. Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Parrilla I, Angel MA, et al. Forskolin improves the cryosurvival of in vivo-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. *Cryobiology* [Internet]. 2013;66(2):144–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.12.009>
23. Meneghel M, Dall'Acqua PC, Ambrogi M, Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Mingoti GZ. Lipid content and cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. *Pesqui Vet Bras*. 2017;37(4):395–400.
24. Paschoal MD, Sudano JM, Schwarz RK, Maziero RR, Guastali DM, Crocomo FL, et al. Cell apoptosis and lipid content of in vitro – produced , vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology* [Internet]. 2017;87:108–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.011>
25. Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R, Agarwal A. L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;91(2):589–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.067>
26. Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte 1. *Rev Bras Reprodução Anim*. 2007;31(2):212–7.
27. Bols, P.E.J. Ysebaert, M.T., Soom, A. Van, Kruif A de. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. 1997;(97):1221–36.
28. Gonçalves, Paulo Bayard Dias, Figueiredo, JR, Freitas V. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 1a ed. São Paulo: Varela; 2002. 340 p.

29. Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev.* 2001;58(2):186–95.
30. Côté I, Vigneault C, Laflamme I, Laquerre J, Fournier É, Gilbert I, et al. Comprehensive cross production system assessment of the impact of in vitro microenvironment on the expression of messengers and long non-coding RNAs in the bovine blastocyst. *Reproduction.* 2011;142(1):99–112.
31. Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology.* 2008;69(1):17–22.
32. Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Anim Reprod.* 2012;9(1):12–8.
33. Mishra A, Reddy IJ, Gupta PSP, Mondal S. Developmental regulation and modulation of apoptotic genes expression in sheep oocytes and embryos cultured in vitro with L-carnitine. *Reprod Domest Anim.* 2016;51(6):1020–9.
34. Kidder GM. The genetic program for preimplantation development. *Dev Genet.* 1992;13(5):319–25.
35. Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, et al. Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and Their Regulation by Alternative In Vivo and In Vitro Culture Conditions1. *Biol Reprod* [Internet]. 2012;87(4). Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.112.099697>
36. Nagai T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology.* 2001;55(6):1291–301.
37. Krisher RL, Brad AM, Herrick JR, Sparman ML, Swain JE. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation. *Anim Reprod Sci.* 2007;98(1–2):72–96.
38. Zhou W, Xiang T, Walker S, Farrar V, Hwang E, Findeisen B, et al. Global gene expression analysis of bovine blastocysts produced by multiple methods. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(5):744–58.
39. Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology.* 2007;68(SUPPL. 1):77–83.
40. Held-Hoelker E, Klein SL, Rings F, Salilew-Wondim D, Zidane M, Neuhoff C, et al. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology.* 2017;96:145–52.
41. You J, Lee J, Hyun SH, Lee E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* [Internet]. 2012;78(2):235–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.027>

42. Long CR, Dobrinsky JR, Garrett WM, Johnson LA. Dual labeling of the cytoskeleton and DNA strand breaks in bovine and porcine embryos using confocal microscopy. *Theriogenology*. 1997;47(1):309.
43. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* [Internet]. 1998;13(4):998–1002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619561>
44. Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biol Reprod*. 1999;61(4):1050–5.
45. Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. 2003;59(3–4):939–49.
46. Johnson M, Nasr-esfahani M. Could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? *BioEssays*. 1994;16(1).
47. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Human*. 2000;15(Suppl.2):199–206.
48. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003;79(4):829–43.
49. Sturmev RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim*. 2009;44(SUPPL. 3):50–8.
50. Renaville B, Bacciu N, Comin A, Motta M, Poli I, Vanini G, et al. Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(1):118–21.
51. Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Staines ME, Ewen M, Lomax MA, et al. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2003;15(5–6):275–84.
52. McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JSM, Speake BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil* [Internet]. 2000;118(1):163–70. Available from: <http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/reprod/118.1.163>
53. Pinyopummintra T, Bavister BD. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*. 1994;1241–9.
54. Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and Early Embryos. *J Reprod Fertil*. 1999;116:373–8.
55. Thompson JG. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - A decade of achievement. *Anim Reprod Sci*. 2000;60–61:263–75.

56. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction*. 2002;124(5):675–81.
57. Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction*. 2001;122(1):131–8.
58. Dunning KR, Akison LK, Russell DL, Norman RJ, Robker RL. Increased Beta-Oxidation and Improved Oocyte Developmental Competence in Response to L-Carnitine During Ovarian In Vitro Follicle Development in Mice. *Biol Reprod* [Internet]. 2011;85(3):548–55. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.110.090415>
59. Montjean D, Entezami F, Lichtblau I, Belloc S, Gurgan T, Menezo Y. Carnitine content in the follicular fluid and expression of the enzymes involved in beta oxidation in oocytes and cumulus cells. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(11):1221–5.
60. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effect of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 2003;9(1):35–48.
61. Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG, Dunning KR. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* [Internet]. 2012;77(8):1632–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.008>
62. Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol*. 2010;224(3):672–80.
63. Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006;65(1):126–36.
64. Lonergan P, Monaghan P, Boland M, Rizos D, Boland MP, Gordon I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence Effect of Follicle Size on Bovine Oocyte Quality and Developmental Competence Following Maturation , Fertilization , and Culture In Vitro. 1994;53(January):48–53.
65. Guerin P, Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reaction oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Reprod Updat*. 2001;7(2):175–89.
66. Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles F V., Ferriani RA, Navarro PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 2009;71(5):836–48.
67. Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction*. 2014;148(1).
68. Dumollard R, Duchen M, Sardet C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin Cell Dev Biol*. 2006;17(2):314–23.

69. Dadarwal D, Adams GP, Hyttel P, Brogliatti GM, Caldwell S, Singh J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13(1):1–11.
70. Bols PEJ, Leroy JLMR, Vanholder T, Van Soom A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*. 2004;62(5):906–14.
71. Dunning KR, Robker RL. The role of l-carnitine during oocyte in vitro maturation: essential co-factor? *Anim Reprod* [Internet]. 2017;14(3):469–75. Available from: <http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p469-475> (AR988) SBTE.pdf
72. Martino NA, Lacalandra GM, Filioli Uranio M, Ambruosi B, Caira M, Silvestre F, et al. Oocyte mitochondrial bioenergy potential and oxidative stress: Within-/between-subject, in vivo versus in vitro maturation, and age-related variations in a sheep model. *Fertil Steril*. 2012;97(3).
73. Brevini Gandolfi TAL, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*. 2001;(01).
74. Blondin, P. Coenen, I.K. Guilbault J, L.A. Sirard M-A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*. 1997;(97):1061–75.
75. Gilchrist RB, Thompson JG. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. *Theriogenology*. 2007;67(1):6–15.
76. Yang X, Dunning KR, Wu LLY, Hickey TE, Norman RJ, Russell DL, et al. Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22(8):1262–71.
77. Dunning KR, Anastasi MR, Zhang VJ, Russell DL, Robker RL. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. *PLoS One*. 2014;9(2):1–11.
78. Costa Mello R, Ferreira J, Sousa L, Mello M, Palhano H. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. *Rev Bras Reprodução Anim*. 2016;40(2):58–64.
79. Telford N, Watson A, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 1990;26(1):90–100. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.1080260113/full>
80. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 1999;52:683–700.
81. Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Bashar S, Mandel R, Librach C. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertil Steril*. 2012;98(1):77–83.

82. Du QY, Wang EY, Huang Y, Guo XY, Xiong YJ, Yu YP, et al. Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril*. 2016;105(4):910–919.e1.
83. Fu XW, Wu GQ, Li JJ, Hou YP, Zhou G Bin, Lun-Suo, et al. Positive effects of Forskolin (stimulator of lipolysis) treatment on cryosurvival of in vitro matured porcine oocytes. *Theriogenology*. 2011;75(2):268–75.
84. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biol Reprod* [Internet]. 2008;78(1):2–12. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2629758/Cryopreservation>
85. Bó GA, Mapletoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod*. 2013;10(3):344–8.
86. Dalcin L, Silva RC, Paulini F, Silva BDM, Neves JP, Lucci CM. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*. 2013;67(2):137–45.
87. Aksu DA, Agca C, Aksu S, Bagis H, Akkoc T, Caputcu AT, et al. Gene expression profiles of vitrified in vitro- and in vivo-derived bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2012;79(9):613–25.
88. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: Which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009;21(3):270–4.
89. Hu W, Marchesi D, Qiao J, Feng HL. Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: An animal model. *Fertil Steril*. 2012;98(3).
90. Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicacio AC, Assumpção MEOA. Cryopreservation of bos taurus vs bos indicus embryos: are they really different? *Theriogenology*. 2002;57(01):345–59.
91. Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 2006;65(8):1551–62.
92. Gasparrini B, Attanasio L, De Rosa A, Monaco E, Di Palo R, Campanile G. Cryopreservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Anim Reprod Sci*. 2007;98(3–4):335–42.
93. Chankitisakul V, Somfai T, Inaba Y, Techakumphu M, Nagai T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2013;79(4):590–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.011>
94. Sturmey RG, O’Toole PJ, Leese HJ. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: Lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction*. 2006;132(6):829–37.
95. Edidin M. Lipids on the frontier: A century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(5):414–8.

96. Fahy GM, Macfarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an Approach to Cryopreservation. *Cryobiology*. 1984;426(June):407–26.
97. Kasai M, Komi JH, Takakamo a, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* [Internet]. 1990;89(1):91–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2374136>
98. Okada A, Yoshii K, Mizuochi Y, Andoh T. Viability of Cryopreserved and Vitrified Embryos and Fertility. *Reproduction*. 2002;48(2).
99. Whittingham D, Leibo S, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to 196 and 269°C. *Science* (80-). 1972;(9):411–4.
100. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67(1):73–80.
101. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*. 2000;60–61:357–64.
102. Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification Properties of Solutions of Ethylene Glycol in Saline Containing PVP, Ficoll, or Dextran. *Cryobiology*. 1997;35(3):219–29.
103. Wang Z, Xu L, He F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2. *Fertil Steril*. 2010;93(8):2729–33.
104. Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajno R, Gambardella A, Scaravelli G, Borini A, et al. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(SUPPL. 3):29–34.
105. Rall W, Fahy G. Ice-free cryopreservation of mouse embryo at 196°C by vitrification. *Nature*. 1985;318:556–7.
106. Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 1992;37(1):23–37.
107. Fritz RB, Keltz M, Stein D, Gonzales E, Cruz R. A comparison of slow freeze and vitrification in frozen embryo transfer in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;425.
108. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23(2):139–55.
109. Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote*. 2006;14(4):299–304.

110. Stojkovic M. 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. *Biol Reprod* [Internet]. 2001;64(3):904–9. Available from: <http://www.biolreprod.org/content/64/3/904.abstract>
111. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: Quietness revisited. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(12):667–72.
112. Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*. 2011;11(5):797–813.
113. Conaghan, J. Handyside, A. H. Winston, R. M. L. Leese HJ. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 1993;99(Icm):87–95.
114. Harris SE, Adriaens I, Leese HJ, Gosden RG, Picton HM. Carbohydrate metabolism by murine ovarian follicles and oocytes grown in vitro. *Reproduction*. 2007;134(3):415–24.
115. Sutton ML, Cetica PD, Beconi MT, Kind KL, Gilchrist RB, Thompson JG. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction*. 2003;126(1):27–34.
116. Saito T, Hiroi M, Kato T. Development of glucose utilization studied in single oocytes and preimplantation embryos from mice. *Biol Reprod* [Internet]. 1994;50(2):266–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8142545>
117. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *Reproduction* [Internet]. 1996;106(1993):299–306. Available from: <http://www.reproduction-online.org/content/106/2/299.short>
118. Purcell SH, Moley KH. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(10):483–9.
119. Rich PR. The molecular machinery of Keilin’s respiratory chain. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2003;31(6):1095–105. Available from: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/bst0311095>
120. Berger PS, Wood PA. Disrupted blastocoele formation reveals a critical developmental role for long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Mol Genet Metab*. 2004;82(4):266–72.
121. Moawad AR, Tan SL, Xu B, Chen HY, Taketo T. l-Carnitine Supplementation During Vitrification of Mouse Oocytes at the Germinal Vesicle Stage Improves Preimplantation Development Following Maturation and Fertilization In Vitro. *Biol Reprod* [Internet]. 2013;88(4):1–8. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2514213/lCarnitine-Supplementation-During-Vitrification-of>
122. Dunning KR, Robker RL. Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2012;134(1–2):69–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.013>

123. Downs SM, Mosey JL, Klinger J. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2009;76(9):844–53.
124. FLYNN TJ, HILLMAN N. the Metabolism of Exogenous Fatty-Acids By Pre-Implantation Mouse Embryos Developing Invitro. *J Embryol Exp Morphol.* 1980;56(APR):157–68.
125. Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, et al. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology.* 2011;76(5):785–93.
126. Paczkowski M, Schoolcraft WB, Krisher RL. Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake and is essential to oocyte competence. *Reproduction.* 2014;148(4):429–39.
127. Ghanem N, Ha AN, Fakruzzaman M, Bang J Il, Lee SC, Kong IK. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced invitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology.* 2014;82(2):238–50.
128. Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AEM, Portugal P V., Bessa RJB, et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Anim Reprod Sci.* 2007;98(3–4):293–301.
129. Absalón-Medina VA, Bedford-Guaus SJ, Gilbert RO, Siqueira LC, Esposito G, Schneider A, et al. The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 on in vitro bovine embryo production and cryopreservation. *J Dairy Sci* [Internet]. 2014;97(10):6164–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214005141>
130. Andrade JC, Ascensão K, Gullón P, Henriques SMS, Pinto JMS, Rocha-Santos TAP, et al. Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review. *Int J Dairy Technol.* 2012;65(4):467–81.
131. Batista RITP, Raposo NRB, Campos-Junior PHA, Pereira MM, Camargo LSA, Carvalho BC, et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of in vitro-produced crossbred bovine embryos. *J Anim Sci Biotechnol.* 2014;5(1):1–8.
132. Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Saebø A, Bauman DE. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2000;278(1):R179-84. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/content/278/1/R179.abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10644637>
133. Brodie a E, Manning V a, Ferguson KR, Jewell DE, Hu CY. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. *J Nutr.* 1999;129(July 1998):602–6.
134. De La Torre-Sanchez J, Gardner D, Preis K, Gibbons J, Seidel GE. Metabolic regulation of in vitro-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate; sodium azide and 2;4- dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18:597–607.

135. Barceló -Fimbres M, Seidel GEJ. Effects of Either Glucose or Fructose and Metabolic Regulators on Bovine Embryo Development and Lipid Accumulation In Vitro. *Mol Reprod Dev.* 2007;74:1406–18.
136. Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Magalhães LCO, Crocomo LF, de Lima-Neto JF, et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology.* 2011;75(7):1211–20.
137. Sanches B V, Marinho LSR, Filho BDO, Pontes JHF, Basso AC, Meirinhos MLG, et al. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitri fi cation. *Theriogenology* [Internet]. 2013;80(4):372–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.026>
138. Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 2006;78(8):803–11.
139. Vanella A, Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Di Giacomo C, Sorrenti V, et al. L-Propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol.* 2000;16(2):99–104.
140. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2000;1486(1):1–17.
141. Eaton S. Control of mitochondrial b -oxidation flux. *Prog Lipid Res.* 2002;41:197–239.
142. Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Justo ML, Herrera MD, de Sotomayor MA. Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L-carnitine. *Nutr Rev.* 2011;69(5):279–90.
143. Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J.* 2002;361(Pt 3):417–29.
144. Eder K. Influence of L-carnitine on metabolism and performance of sows. *Br J Nutr.* 2009;102(5):645–54.
145. Várnagy Á, Bene J, Sulyok E, Kovács GL, Bódis J, Melegh B. Acylcarnitine esters profiling of serum and follicular fluid in patients undergoing in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013;11(1):1–9.
146. Pillich RT, Scarsella G, Risuleo G. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Exp Cell Res.* 2005;306(1):1–8.
147. Kyvelidou C, Sotiriou D, Antonopoulou T, Tsagkaraki M, Tserevelakis GJ, Filippidis G, et al. L-Carnitine affects preimplantation embryo development toward infertility in mice. *Reproduction.* 2016;152(4):283–91.
148. Phongnimitr T, Liang Y, Srirattana K, Panyawai K, Sripunya N, Treetampinich C, et al. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Anim Sci J.* 2013;84(11):719–25.

149. Yazaki T, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. L-carnitine improves hydrogen peroxide-induced impairment of nuclear maturation in porcine oocytes. *Anim Sci J*. 2013;84(5):395–402.
150. Knitlova D, Hulinska P, Jeseta M, Hanzalova K, Kempisty B, Machatkova M. Supplementation of l -carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2017;102:16–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X1730300X>
151. Fathi M, El-Shahat KH. L-carnitine enhances oocyte maturation and improves in vitro development of embryos in dromedary camels (*Camelus dromedaries*). *Theriogenology*. 2017;104:18–22.
152. Tanaka T, Satoh M, Hashimoto S, Nakaoka AY, Morimoto Y. L-Carnitine improves the human blastocyst development. *Fertil Steril*. 2016;107.
153. Reader KL, Cox NR, Stanton JAL, Juengel JL. Effects of acetyl-L-carnitine on lamb oocyte blastocyst rate, ultrastructure, and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology* [Internet]. 2015;83(9):1484–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.028>
154. Ye J, Li J, Yu Y, Wei Q, Deng W, Yu L. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul Pept*. 2010;161(1–3):58–66.
155. Mansour G, Abdelrazik H, Sharma RK, Radwan E, Falcone T, Agarwal A. L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;91(5 SUPPL.):2079–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.097>
156. Zare Z, Masteri Farahani R, Salehi M, Piryaee A, Ghaffari Novin M, Fadaei Fathabadi F, et al. Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(4):635–43.
157. Saraiva HFRA, Batista RITP, Alfradique VAP, Pinto PHN, Ribeiro LS, Oliveira CS, et al. L-carnitine supplementation during vitrification or warming of in vivo-produced ovine embryos does not affect embryonic survival rates, but alters CrAT and PRDX1 expression. *Theriogenology*. 2018;105:150–7.
158. Chang B, Nishikawa M, Nishiguchi S, Inoue M. L-carnitine inhibits hepatocarcinogenesis via protection of mitochondria. *Int J Cancer*. 2005;113(5):719–29.
159. Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, et al. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010;49(4):674–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.025>
160. Truong TT, Soh YM, Gardner DK. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1445–54.

161. Sun Q, Wu G, Lai L, Park K, Cabot R, Cheong H, et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* [Internet]. 2001;122(1):155–63. Available from: <http://www.reproduction-online.org/cgi/doi/10.1530/rep.0.1220155>
162. Seamon KB, Padgett W, Daly JW. Forskol: unique diterque activator of adenylate cyclase in membranes in intact cells. *Biochemistry*. 1981;78(6):3363–7.
163. Honnor R, Dhillon G, Londos C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1985;260(28):15139–45.
164. Paschoal DM, Sudano MJ, Guastali MD, Dias Maziero RR, Crocomo LF, Oña Magalhães LC, et al. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*. 2014;22(2):146–57.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA ADIÇÃO DE L-CARNITINA AO MEIO DE CULTIVO IN VITRO E NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO

O alto conteúdo lipídico em embriões produzidos *in vitro* está associado à baixa criotolerância. Esse experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da L-carnitina (LC) sobre o desenvolvimento e a sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro* e criopreservados pelo método Cryotop, sendo avaliadas a atividade mitocondrial, o conteúdo intracitoplasmático de lipídeos, a apoptose celular e a eclosão (24 e 48 horas) após o aquecimento. Para os tratamentos a LC foi utilizada na concentração de 0,6 mg/mL no meio para maturação (MIV), cultivo (CIV) e/ou recultivo embrionário (REC), em quatro tratamentos: sem LC (Controle), LC adicionado ao meio CIV (LCiv), LC ao meio CIV+LC ao meio REC (LCivR), e LC ao MIV/CIV+ LC ao meio REC (LMivCR). A adição de LC não alterou a taxa de clivagem em nenhum tratamento ($P>0,05$), mas aumentou a produção de blastocistos em D7 em 28,6% (LCiv) e a quantidade de embriões grau I em 36,9% em LCivR quando comparado ao Controle ($P <0,05$). A taxa de re-expansão após o re-aquecimento (2 horas) foi 22,7% maior e a eclosão em 48 horas foi 20,1% maior em LCiv em relação ao Controle ($P <0,05$). A taxa de eclosão em 24 horas e o número total de células não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$), mas o número de células apoptóticas foi menor nos LCivR e LMivCR quando comparados ao LCiv e Controle ($P <0,001$). A quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos foi 29% menor em LCiv e LCivR e 50,2% em LMivCR em relação ao Controle ($P <0,001$). A atividade mitocondrial foi 1,9 vezes maior em LCivR comparado ao Controle ($P <0,001$). A adição de 0,6mg/mL de L-carnitina aos meios de cultivo e recultivo aumentou a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos atuando positivamente sobre a atividade mitocondrial, reduzindo a quantidade de lipídeos intracelulares e a apoptose celular e aumentando a criotolerância.

Palavras-chave: Delipidadores; PIV; Cryotop; embriões bovinos.

ABSTRACT

The high lipid content in embryos produced *in vitro* is associated with low cryotolerance. This experiment was conducted with the objective of evaluating the effect of L-carnitine (LC) on the development and survival of *in vitro* produced bovine embryos cryopreserved by the Cryotop method, by evaluating the mitochondrial potential, the intracytoplasmic lipid content, apoptosis and hatching (24 and 48 hours) post-thawing. To the treatments, the LC was used in the concentration of 0.6 mg/mL of maturation medium (IVM), culture (IVC) and / or post-thawing (REC), in four treatments: without LC (Control), LC added to IVC medium (LCiv), LC to IVC + LC in post-thawing medium (LCivR), and LC to IVM / IVC + LC in post-thawing medium (LMivCR). The addition of LC did not change the cleavage rate in any treatment ($P > 0.05$), but increased the production of blastocysts in D7 by 28.6% (LCiv) and the quantity of embryos grade I by 36.9% in LCivR when compared to Control ($P < 0.05$). The re-expansion rate post-thawing (2 hours) was 22.7% higher and hatching in 48 hours was 20.1% higher in LCiv compared to Control ($P < 0.05$). The hatching rate in 24 hours and the total number of cells did not differ between treatments ($P > 0.05$), but the number of apoptotic cells was lower in the LCivR and LMivCR when compared to the LCiv and Control ($P < 0.001$). The amount of intracytoplasmic lipids was 29% lower in LCiv and LCivR and 50.2% in LMivCR than in Control ($P < 0.001$). Mitochondrial potential was 1.9 times higher in LCivR compared to Control ($P < 0.001$). The addition of 0.6mg / mL of L-carnitine to the culture medium and the post-thawing medium increased the rate of *in vitro* production bovine embryos acting positively on mitochondrial potential, reducing the amount of intracellular lipids and cellular apoptosis and increasing cryotolerance.

Keywords: Delipidators; IVP; Cryotop; bovine embryos.

1 INTRODUÇÃO

Os embriões produzidos *in vitro* (PIV) apresentam maior sensibilidade à criopreservação que embriões *in vivo*^{1,2}. A criopreservação bem sucedida de ovócitos e embriões mamíferos oferece oportunidades para a preservação de germoplasma e transporte de genética dentro do país e internacionalmente³, sendo esta a chave para expandir ainda mais a indústria de embriões PIV^{4,5}.

Em ovócitos e embriões de mamíferos, os ácidos graxos são armazenados nas células principalmente como triacilglicerol (TAG) dentro de gotículas lipídicas⁶. Os lipídeos intracelulares servem como importante fonte de energia para a produção de ATP nas mitocôndrias via β -oxidação^{7,8}. A via metabólica de β -oxidação é expressa tanto em embriões *in vivo* como *in vitro*⁹ e a utilização de lipídeos endógenos como fonte de energia pelos ovócitos bovinos é fator determinante durante a maturação^{6,10}, e também para a qualidade do embrião^{7,11}, pois têm a capacidade de gerar ATP, mesmo em baixos níveis de substratos extracelulares^{9,12}. A atividade mitocondrial e os níveis de adenosina trifosfato (ATP) apresentam um papel essencial na determinação da qualidade e competência do ovócito^{13,14} e influenciam o metabolismo e a capacidade de desenvolvimento do embrião^{15,16}.

O citoplasma dos ovócitos e dos embriões mamíferos é naturalmente rico em lipídeos⁷, assim como o fluido folicular bovino, que possuem níveis abundantes de triglicérides e ácidos graxos livres¹⁷. No entanto, ovócitos e embriões cultivados na presença de soro fetal apresentam maior quantidade de lipídeo intracelular, quando comparados com os produzidos *in vivo*^{18,19} ou em sistemas livres de soro²⁰. O ambiente de cultivo *in vitro* pode modular a expressão gênica em células e embriões de mamíferos²¹ e influenciar o transcriptoma dos blastocistos¹¹, particularmente o metabolismo lipídico^{11,22}, assim como a resposta ao estresse oxidativo¹¹, alterando as taxas de desenvolvimento e a sensibilidade à criopreservação²³.

A relação inversa entre a qualidade do embrião e o conteúdo lipídico foi demonstrada pelo acúmulo de conteúdo lipídico dentro de embriões, sendo que a localização destas gotículas compromete o desenvolvimento e a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (vs. *in vivo*)^{19,24,25}. A grande quantidade de conteúdo lipídico no citoplasma está relacionada à crioinjúria em ovócitos^{26,27} e em blastocistos bovinos e suínos^{2,26}. Além do acúmulo de lipídeos intra-celulares são encontradas diferenças no perfil lipídico das membranas de blastocistos PIV, alterando diretamente as propriedades físico-químicas da membrana celular, incluindo fluidez, permeabilidade e comportamento da fase térmica^{19,28}.

Essa diferença no potencial de desenvolvimento de ovócitos e embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* pode ser relativa a ausência de cofatores para facilitar a via metabólica de β -oxidação²⁹ como a L-carnitina, Forskolin entre outros. A L-carnitina (LC) (3-hidroxi-4-N-trimetilamoniobutirato) é uma pequena molécula hidrossolúvel que desempenha papel muito importante no metabolismo da gordura³⁰. A LC é um potencializador do metabolismo lipídico em células animais e sua principal função é facilitar o transporte de ácidos graxos livres do citosol para as mitocôndrias, abastecendo a β -oxidação e gerando trifosfato de adenosina (ATP)^{31,32}, além de apresentar função antioxidante^{33,34}.

Apesar da sua importância para o desenvolvimento embrionário inicial o metabolismo lipídico é um parâmetro negligenciado³². As formulações de meios comerciais definidos utilizadas para maturação de ovócitos e cultivo de embriões não incluem um substrato de ácido graxo³⁵.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos e o melhor momento para a adição de L-Carnitina a produção *in vitro* de embriões bovinos, visando aumentar as taxas de sobrevivência de embriões PIV vitrificados pela técnica do CRYOTOP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Composição dos meios

Meio de maturação (MIV)– Meio TCM 199 com sais de Earle e L-glutamina (Gibco[®], Invitrogen Co, Grand Island, NY, USA) adicionado com 10% soro fetal bovino (v/v), 0,2 mM piruvato, 5 mg/mL hormônio luteinizante (Lutropin-V[®], Bioniche Co., Belleville, ON, Canada), 1 mg/mL hormônio folículo estimulante (Folltropin[®], Bioniche Co., Belleville, ON, Canada), 75 μ g/mL amicacina e 1mM cistamina.

Meio de fecundação (FIV) – TALP-FERT suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) - livre de ácidos graxos, 0,2 mM piruvato, 30 μ g/mL heparina, 20 μ M penicilamina, 10 μ M hipotaurina, 1 μ M epinefrina e 75 μ g/mL amicacina.

Meio de Capacitação (CAP) – Meio tamponado Tyrode's HEPES, suplementado com 0,2 mM piruvato e 75 μ g/mL amicacina.

Meio de cultivo (CIV) – SOFaa³⁶ suplementado com 2,7 mM mio-inositol, 0,2 mM piruvato, 2,5% soro fetal bovino (v/v), 5 mg/mL BSA-livre de ácido graxo, 75 μ g/mL amicacina.

Solução de L-carnitina – meio de maturação/cultivo adicionado de 0,6mg/mL de L-carnitina (Sigma-Aldrich® Merck KGaA, Darmstad, Alemanha).

Soluções de vitrificação

Solução Manutenção (SM) – meio TCM-199 tamponado com HEPES (GIBCO® BRL, Invitrogen) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil).

Solução vitrificação 1 (SV1) – solução SM suplementado com 7,5% de etilenoglicol (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) e 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Co., St. Louis, MO, USA).

Solução vitrificação 2 (SV2) – solução SM adicionada com 15% de etilenoglicol, 15% de DMSO e 0,5 M de sacarose (Sigma Co., St. Louis, MO, USA).

Soluções de aquecimento

Solução Manutenção (SM) – meio TCM-199 tamponado com HEPES (GIBCO® BRL, Invitrogen) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil).

Solução de Desvitrificação 1 (DV1) – solução SM suplementada com 1,0 M de sacarose (Sigma Co., St. Louis, MO, USA).

Solução de Desvitrificação 2 (DV2) – solução SM suplementada com 0,5 M de sacarose (Sigma Co., St. Louis, MO, USA).

2.2 Seleção de ovócitos e maturação *in vitro*

Foram utilizados ovócitos de vacas mestiças de corte (*Bos indicus* x *Bos taurus*) aspirados de ovários coletados em abatedouro e transportados em solução salina aquecida (NaCl 0,9%) suplementada com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) a 35° C. Os complexos *cummulus* ovócito (CCOs) foram aspirados de folículos de dois a oito milímetros com seringas e agulhas 18G. O líquido folicular aspirado com os CCOs foi depositado em tubo cônico de 15 mL e os CCOs recuperados após filtração em malha de 80µm.

Após seleção com o auxílio do estereomicroscópio, ovócitos de qualidade I e II¹⁴ foram utilizados. Os CCOs selecionados foram lavados e transferidos para placas de petri (Corning, Nova Iorque, EUA), em gotas de 200 µL (para 30-35 ovócitos) de meio de maturação (MIV) cobertas com óleo mineral (Sigma-Aldrich® Merck KGaA, Darmstad, Alemanha) permanecendo por 22 a 24 horas em incubadora a 38,8°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação.

A diluição da L-carnitina (0,6mg/mL) a ser adicionada ao MIV foi realizada sempre no momento do uso.

2.3 Fecundação *in vitro*

Após a MIV, os CCO's foram lavados em meio de fecundação e transferidos para placas com gotas de 200 µL cobertas com óleo mineral.

Para a fecundação *in vitro* (FIV) utilizou-se sêmen comercial convencional de touro da raça Holandesa testado para PIV. Após descongelação em banho-maria a 37°C por 30 segundos, motilidade e vigor foram avaliados, e o sêmen foi depositado sobre a coluna de gradiente Percoll 45-90%³⁷ e centrifugado a 9000 rpm por cinco minutos. O sedimento de espermatozoides foi ressuspensionado em um mL de meio CAP e novamente centrifugado a 9000 rpm por três minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de meio de fecundação e a motilidade e o vigor foram novamente avaliados. A gota foi fertilizada com a concentração final de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides vivos/mL. Após a fertilização, as placas foram incubadas a 38,8°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação por 18 horas.

2.4 Cultivo *in vitro* dos embriões

Os possíveis zigotos foram desnudados parcialmente por sucessivas pipetagens, e transferidos para gotas de 200 µL de meio de cultivo sob óleo mineral por sete dias a 38,8°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação.

Após 72 horas de cultivo pós-fertilização (D3 pf) avaliou-se a taxa de clivagem e foi feita a remoção e substituição de 50% do meio de cultivo da gota (*Feeding*). A qualidade morfológica e a taxa de blastocistos foram avaliadas após sete dias (D7), utilizando-se o padrão recomendado pro Bó e Mapletoft 2013³⁸, sendo o dia zero (D0) o dia da FIV.

A diluição da L-carnitina (0,6mg/mL) no CIV foi realizada sempre no momento do uso.

2.5 Vitrificação, aquecimento e recultivo dos embriões

Os blastocistos expandidos com sete dias de cultivo (grau I e II) foram criopreservados pela técnica de vitrificação utilizando Cryotop proposta por Kuwayama et al.³⁹ em placa aquecedora a 36°C, utilizando hastes Ingá-med[®] (Maringá-PR, Brasil) e

armazenados em nitrogênio líquido. Os blastocistos foram depositados em uma gota de 70 μL de meio SM e em seguida, passaram por três gotas de 70 μL de meio SV1, sendo três minutos em cada uma. Posteriormente, foram lavados em três gotas de 50 μL de meio SV2 e posicionados na haste com o mínimo de solução ($\pm 0,2\mu\text{L}$) no intervalo de 40 a 90 segundos, e imediatamente imergidos em nitrogênio líquido.

O aquecimento foi realizado a 39°C, imergindo-se a haste de vitrificação em dois mL de meio DV1 para a remoção dos embriões. Logo em seguida, estes foram transferidos para outra gota de 200 μL de DV1 por um minuto e posteriormente para uma gota de 200 μL de DV2 durante três minutos. Imediatamente depois, passaram por duas gotas de 200 μL de solução SM durante cinco minutos em cada uma.

2.6 Análise da Atividade Mitocondrial (AAM)

O potencial da membrana mitocondrial nos embriões foi avaliada após 24 horas do reaquecimento e foi mensurada através do indicador de fluorescência da atividade mitocondrial (tiol-clorometil) de acordo com metodologia descrita por Santos et al.⁴⁰. Os embriões foram lavados em PBS-PVA e mantidos a 38,5°C, durante 30 min, em PBS/PVA com $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$ a 0,5 μM (MitoTracker Orange CMTMRos[®], Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Os embriões foram então lavados em PBS/PVA, fixados em paraformaldeído 3,7% por 24 horas a 4°C, protegidos de luz. Após a fixação, os embriões foram incubados em solução de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Hoechst 33342 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) por 10 minutos, protegidos de luz. Após incubação foram novamente lavados em PBS/PVA, alocados em lâminas de vidro com ProLong[®]Gold (Molecular Probes, Eugene, OR), cobertos por lamínula e examinados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX43, Tóquio, Japão) com o filtro de comprimento de onda de 550 nm para o MitoTracker Orange, e 365 nm para o Hoechst 33342.

As imagens obtidas foram salvas em formato Tagged Image File Format (TIFF) por meio de câmera acoplada (Olympus SC30, Tóquio, Japão) ao microscópio de epifluorescência, sendo padronizado o tempo de exposição e intensidade luminosa. A intensidade da fluorescência e a contagem total de células dos embriões foi realizada individualmente pelo software Image J (versão 1.46; National Institutes of Health, Bethesda, MD). A intensidade de fluorescência (intensidade média de pixel) por área foi corrigida retirando o *background*, o valor corrigido foi dividido pelo número de células obtendo-se a intensidade média de pixel por célula, normalizando-se para o tratamento Controle e definida

como valor numérico 1.0. A intensidade de fluorescência relativa das estruturas foi considerada diretamente proporcional à atividade mitocondrial.

2.7 Avaliação de células apoptóticas

Para a avaliação de apoptose celular foi utilizado o método TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) por meio do conjunto comercial *In Situ Cell Death Detection* (Roche, Mannheim, Germany). Os embriões foram preparados de acordo com metodologia descrita pelo fabricante: controle positivo e negativo, e tratamentos. Os embriões (D7) foram lavados em tampão fosfato-salino (PBS-PVP) com 0,1% de polivinilpirrolidona, e depois fixados em paraformaldeído 3,7% diluído em PBS-PVP por uma hora em temperatura ambiente. Na sequência, as estruturas foram incubadas em solução permeabilizadora de membrana (PBS contendo 0,5% de Triton X-100 e citrato de sódio) por uma hora a 4°C. Após a permeabilizadora o grupo controle positivo foi incubado em solução DNase por uma hora em câmara úmida a 37°C, enquanto que os demais grupos permaneceram em PBS-PVP a 37°C. Os grupos foram então incubados para reação TUNEL (grupos tratados e positivo em solução enzimática e marcadora (1:9); grupo negativo apenas na solução marcadora) por uma hora em câmara úmida a 37°C protegida da luz. Na sequência todos os grupos foram incubados em solução de $10\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Hoechst 33342 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) durante 10 minutos, protegidos de luz. As lâminas foram montadas utilizando ProLong®Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) e observadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX43, Tóquio, Japão). Entre cada etapa do protocolo, as estruturas foram lavadas três vezes em PBS-PVP, permanecendo dois minutos na última gota. O núcleo de todas as células foi corado com azul fluorescente (365 nm), os núcleos das células TUNEL positivas, ou seja, com DNA fragmentado, foram visualizados em verde fluorescente (450 nm). Os embriões foram avaliados individualmente e todas as células marcadas em ambos os filtros foram contadas para mensuração do número total de células (NTC) e número de células apoptóticas (NCA).

2.8 Avaliação do teor lipídico intracelular

As gotas lipídicas intracelulares dos embriões foram marcadas com o corante lipídico específico vermelho do Nilo (NR) (Nile Red, Invitrogen™ Molecular Probes™, Eugene, OR) baseado no método de Genicot et al.⁴¹. Em resumo, $1\text{mg}/\text{mL}^{-1}$ de solução estoque de NR (Molecular Probes) foi preparado por diluição em dimetilsulfóxido (DMSO) e

armazenado à temperatura ambiente no escuro. Os embriões foram fixados em paraformaldeído a 4% por 24 horas, lavados em PBS-PVP três vezes (10 min cada) e corados durante três horas em 500 μL de solução de trabalho ($10\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de solução estoque de NR dissolvida em solução salina fisiológica (0,9% NaCl) com $1\text{mg}/\text{mL}^{-1}$ de PVP). Novamente os embriões foram novamente lavados em PBS-PVP por três vezes e a seguir, todos os grupos foram incubados em solução de $10\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de Hoechst 33342 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) durante 10 minutos, protegidos de luz, os embriões foram lavados em PBS-PVP três vezes e procedeu-se a montagem da lâmina. Utilizou-se ProLong®Gold (Molecular Probes, Eugene, OR) durante a montagem das lâminas e lamínulas para observação em microscópio de epifluorescência (Olympus BX43, Tóquio, Japão).

Os procedimentos de análise das fotos realizados para o Vermelho do Nilo foram os mesmos aplicados para a avaliação do potencial mitocondrial. A intensidade de fluorescência relativa das estruturas foi considerada diretamente proporcional a quantidade de lipídeos intracelulares.

2.9 Delineamento experimental

Efeito da adição de L-carnitina ao meio de cultivo in vitro e vitrificação de embriões bovinos

Após a seleção, 1.205 CCO's oriundos de dez sessões de punção folicular foram distribuídos ao acaso nos tratamentos e submetidos à maturação *in vitro*. Para os tratamentos a LC foi utilizada na concentração de 0,6 mg/mL de meio para maturação (MIV), cultivo (CIV) e/ou recultivo embrionário (REC), em quatro tratamentos: sem LC (Controle), LC adicionado ao meio CIV (LCiv), LC ao meio CIV+LC ao meio REC (LCivR), e LC ao MIV/CIV+ LC ao meio REC (LMivCR).

Foram realizadas avaliações do efeito do agente delipidador L-carnitina nas taxas de produção de embriões, morte celular, quantificação de lipídeos, atividade mitocondrial, taxas de re-expansão e eclosão em embriões PIV vitrificados.

Após 22-24 horas de maturação todas as gotas foram fecundadas (D0). Após 18 horas os possíveis zigotos foram transferidos para placas com meio CIV, onde permaneceram por sete dias. No terceiro dia de cultivo (D3), avaliou-se a taxa de clivagem e a metade do meio de cultivo de cada gota foi substituída (*feeding*). Após sete dias de cultivo, avaliou-se a taxa e a qualidade morfológica dos blastocistos, segundo Bó e Mapletoft 2013³⁸.

No D7 os blastocistos classificados com grau I e II foram vitrificados pelo método Cryotop, o total de 644 embriões foram vitrificados e re-aquecidos. Do total 124 embriões

foram utilizados para a análise de apoptose celular (Tunel), 116 para análise e mensuração de lipídeos intracitoplasmáticos (Red Nile), 120 para análise do potencial de membrana e 284 para análise de re-expansão e eclosão.

Após o aquecimento, os blastocistos foram lavados três vezes em CIV e incubados em meio de cultivo sob óleo mineral em incubadora a 38,8°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação por 48 horas. A taxa de re-expansão foi avaliada após duas horas. A taxa de eclosão foi avaliada após 24 e 48 horas.

2.10 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional R versão 3.0.2⁴².

Os dados que não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis a 5% de significância (atividade mitocondrial e quantificação de lipídeos intracelulares). O número de embriões clivados, blastocistos, qualidade embrionária, média do número total de células e número de células apoptóticas entre os tratamentos foram analisadas utilizando o modelo linear generalizado com distribuição binomial, testando contrastes de pares de tratamentos a 5% de significância. Os dados quantitativos foram apresentados na forma de média e os qualitativos em porcentagem.

3 RESULTADOS

Os dados referentes à clivagem, produção total de embriões e porcentagem de embriões grau I estão apresentados na Tabela 1

TABELA 1 – Taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos, sem L-carnitina (controle) e cultivados na presença de L-carnitina no CIV (LCiv e LCivR), no MIV + CIV (LMivCR)

Tratamentos	Clivagem D3 (%)	Produção de Embriões D7	
		Total de Embriões (%)	Embriões grau I (%)
Controle	89,2 (266/298) ^a	34,9 (104/298) ^b	17,4 (52/298) ^a
LCiv	90,4 (276/305) ^a	48,9 (149/305) ^a	24,9 (76/305) ^{ab}
LCivR	89,1 (271/304) ^a	44,1 (134/304) ^{ab}	27,6 (84/304) ^b
LMivCR	90,6 (270/298) ^a	39,9 (119/298) ^{ab}	21,8 (65/298) ^{ab}

^{a,b}Letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,05$ pelo modelo linear generalizado com distribuição binomial).

A suplementação com LC não alterou a taxa de clivagem em D3 ($P > 0,05$), mas aumentou a produção de blastocistos em D7 no LCiv e o de embriões de qualidade grau I em LCivR ($P < 0,05$) em relação ao Controle (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta os dados sobre re-expansão, eclosão avaliada em 24 e 48 horas, e total de degenerados após o reaquecimento de embriões vitrificados pelo método de Cryotop a Figura 1 demonstra a cinética de desenvolvimento dos embriões após reaquecimento.

TABELA 2 – Taxa de re-expansão (2 horas) e eclosão (24 e 48 horas) de blastocistos expandidos produzidos *in vitro*, sem L-carnitina (Controle) e cultivados na presença de L-carnitina no CIV (LCiv), no CIV+ LC no reaquecimento (LCivR), e LC no MIV e CIV+ LC no reaquecimento (LMivCR), vitrificados, aquecidos e recultivados por 48 horas

Tratamentos	Re-expansão (%)	Eclosão (%)		Degenerados
		24h	48h	
Controle	67,6 (46/68) ^b	47,1 (32/68) ^a	72,1 (49/68) ^b	4,4 (3/68) ^a
LCiv	87,5 (63/72) ^a	50,0 (36/72) ^a	90,3 (65/72) ^a	1,4 (1/72) ^a
LCivR	78,4 (58/74) ^{ab}	52,7 (39/74) ^a	86,5 (64/74) ^{ab}	1,4 (1/74) ^a
LMivCR	75,7 (53/70) ^{ab}	45,7 (32/70) ^a	77,1 (54/70) ^{ab}	4,3 (3/70) ^a

^{a,b}Letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,05$ pelo modelo linear generalizado com distribuição binomial).

A taxa de re-expansão (2 horas) foi maior no grupo LCiv, e a taxa de eclosão em 24 horas não teve diferença entre os tratamentos assim como o número de degenerados ($P > 0,05$), mas a eclosão em 48 horas foi maior em LCiv ($P < 0,05$) comparando ao Controle (Tabela 2).

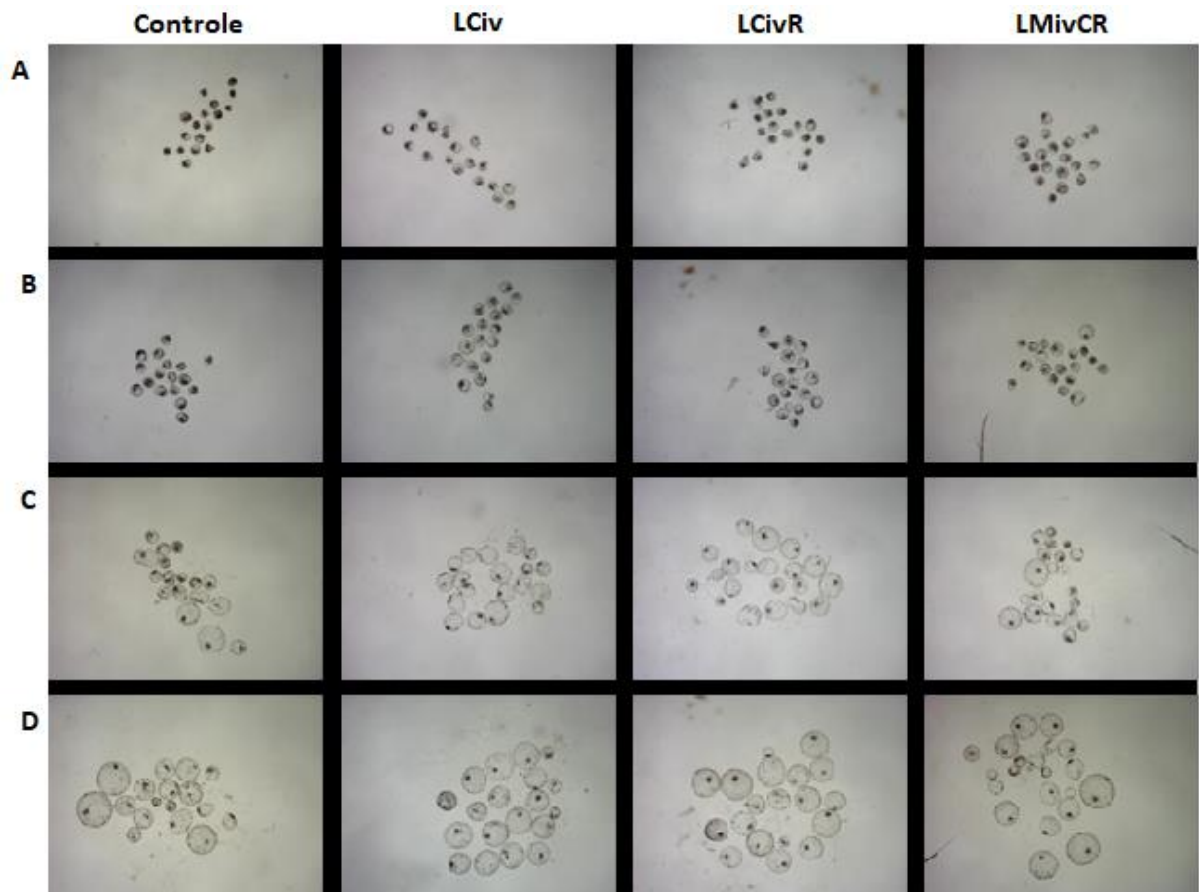


FIGURA 1 – Cinética de desenvolvimento de embriões vitrificados pelo método Cryotop e reaquecidos, avaliando re-expansão às 2 horas, eclosão em 24 e 48 horas após reaquecimento.

Linha A- Imediatamente após reaquecimento zero hora

Linha B- Análise de re-expansão com duas horas após o reaquecimento

Linha C - Análise de eclosão com 24 horas após o reaquecimento

Linha D - Análise de eclosão com 48 horas após o reaquecimento

O número total de células (NTC) e o número de células apoptóticas (NCA) são apresentadas na Tabela 3 e Figura 2

TABELA 3 – Análise de apoptose celular pela técnica TUNEL em blastocistos expandidos produzidos *in vitro*, sem L-carnitina (Controle) e cultivados na presença de L-carnitina no CIV (LCiv), no CIV+ LC no reaquecimento (LCivR), e LC no MIV e CIV+ LC no reaquecimento (LMivCR), vitrificados, aquecidos e recultivados por 24 horas

Tratamentos	Nº de Blastocistos	NTC	NCA
Controle	31	165,3 ^a	6,5 ^a
LCiv	31	168,5 ^a	5,7 ^a
LCivR	31	175,1 ^a	3,2 ^b
LMivCR	31	179,5 ^a	3,6 ^b

NTC-Número total de células,

NCA-Número de células apoptóticas

^{a,b}Letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa

($P < 0,001$ pelo modelo linear generalizado com distribuição binomial).

Na avaliação de células apoptóticas o número total de células não diferiu ($P > 0,05$) e a morte celular foi menor nos grupos LcivR e LMivCR quando comparados ao LCiv e Controle ($P < 0,001$) (Tabela 3) e Figura 2.

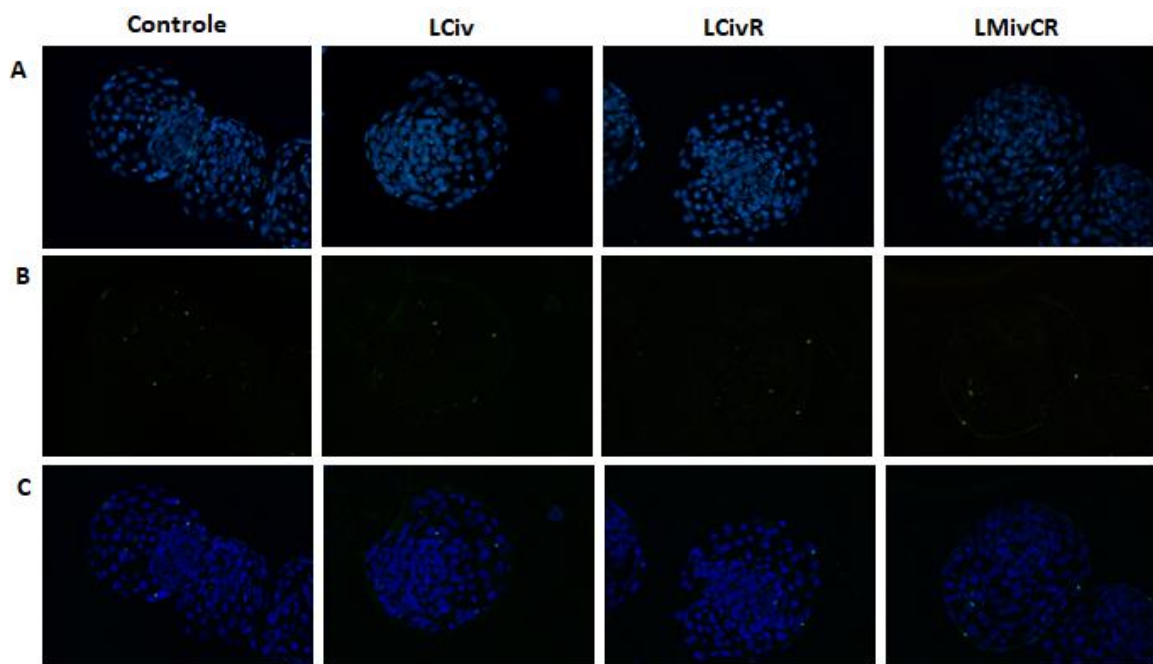


FIGURA 2 – Análise de apoptose celular em embriões realizada após 24 horas do reaquecimento pela técnica TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling).

Linha A- Marcação do núcleo celular com Hoechst 33342 (azul)

Linha B- Marcação de apoptose celular utilizando o TUNEL positivo (verde)

Linha C - Sobreposição de imagens

Os resultados da análise de quantificação de lipídeos intracelulares por fluorescência utilizando Vermelho do Nilo são apresentadas nas Figuras 3 e 4.

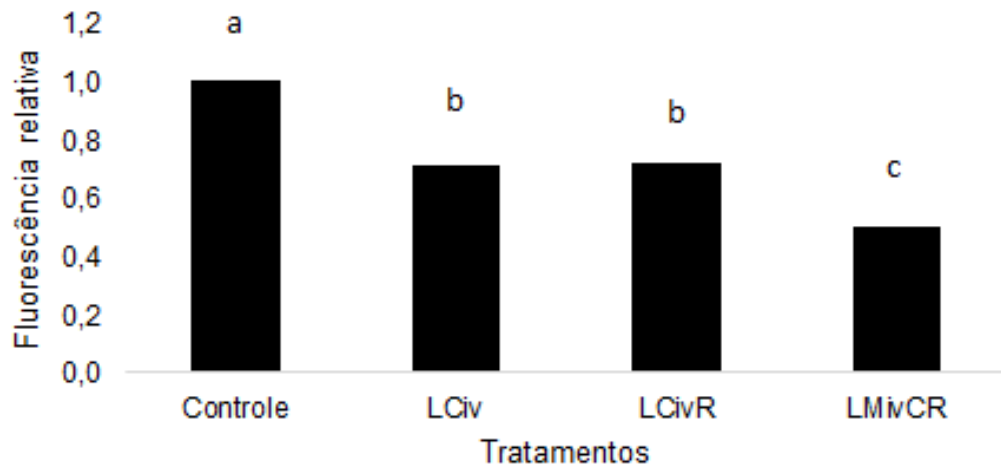


FIGURA 3 – Quantificação de lipídeos intracelulares por fluorescência utilizando Vermelho do Nilo em embriões bovinos vitrificados, reaquecidos e cultivados por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata ($n = 116$). ($P < 0,001$ pelo teste de Kruskal-Wallis). Eixo Y: média de fluorescência do Controle foi definida como 1,00.

O tratamento LMivCR apresentou menor na quantidade de lipídeos intracelulares em relação aos outros tratamentos ($P < 0,01$), os tratamentos LCiv e LCivR não diferiram entre si, mas apresentaram menores quantidades de lipídeos em relação ao Controle ($P < 0,01$) (Figuras 3 e 4).

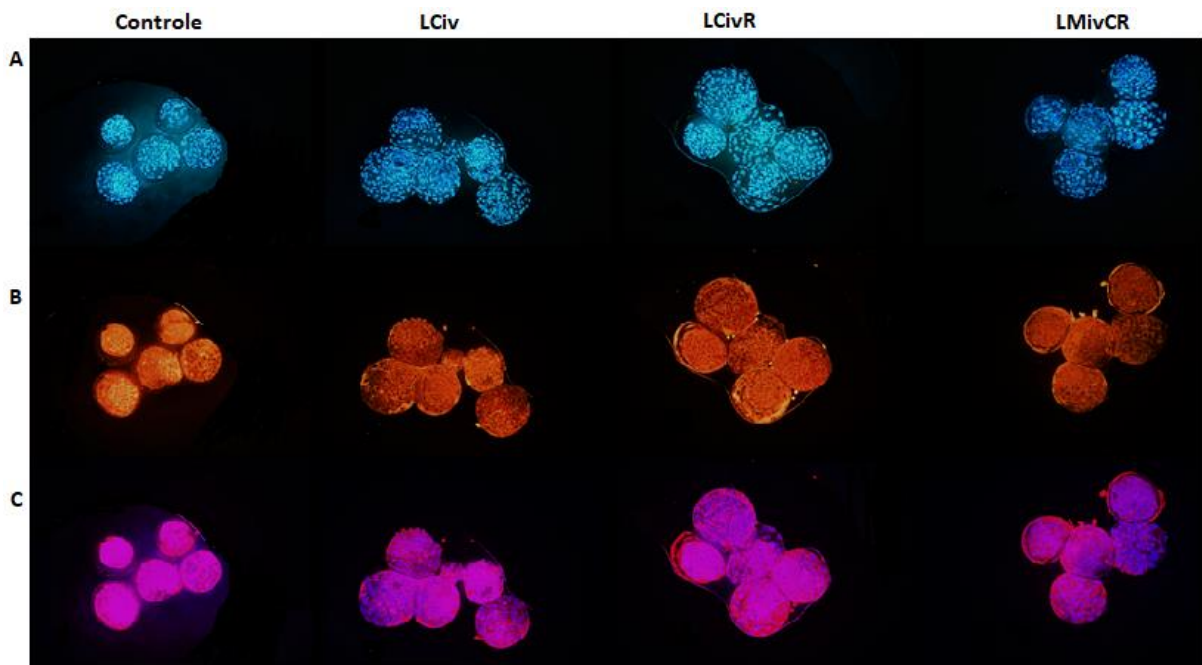


FIGURA 4 – Quantificação de conteúdo lipídico intracelular dos embriões realizada após 24 horas do reaquecimento utilizando corante lipídico específico Vermelho do Nilo.
 Linha A- Marcação do núcleo celular com Hoechst 33342 (azul)
 Linha B- Marcação de gotas lipídicas com Vermelho do Nilo (vermelho)
 Linha C - Sobreposição de imagens

Os dados referentes a atividade mitocondrial avaliada por fluorescência estão demonstrados nas Figuras 5 e 6.

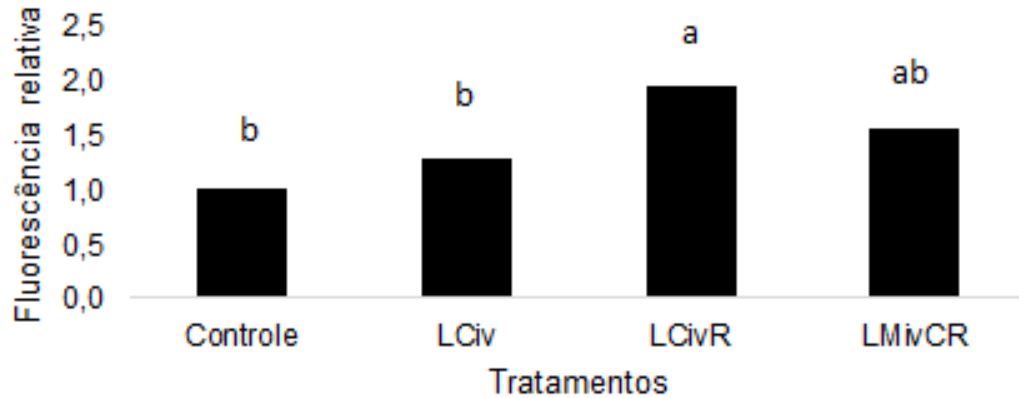


FIGURA 5 – Atividade mitocondrial em embriões bovinos vitrificados, reaquecidos e cultivados por 24hs. As análises foram realizadas em triplicata (n = 120). ($P < 0,001$ pelo teste de Kruskal-Wallis). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00.

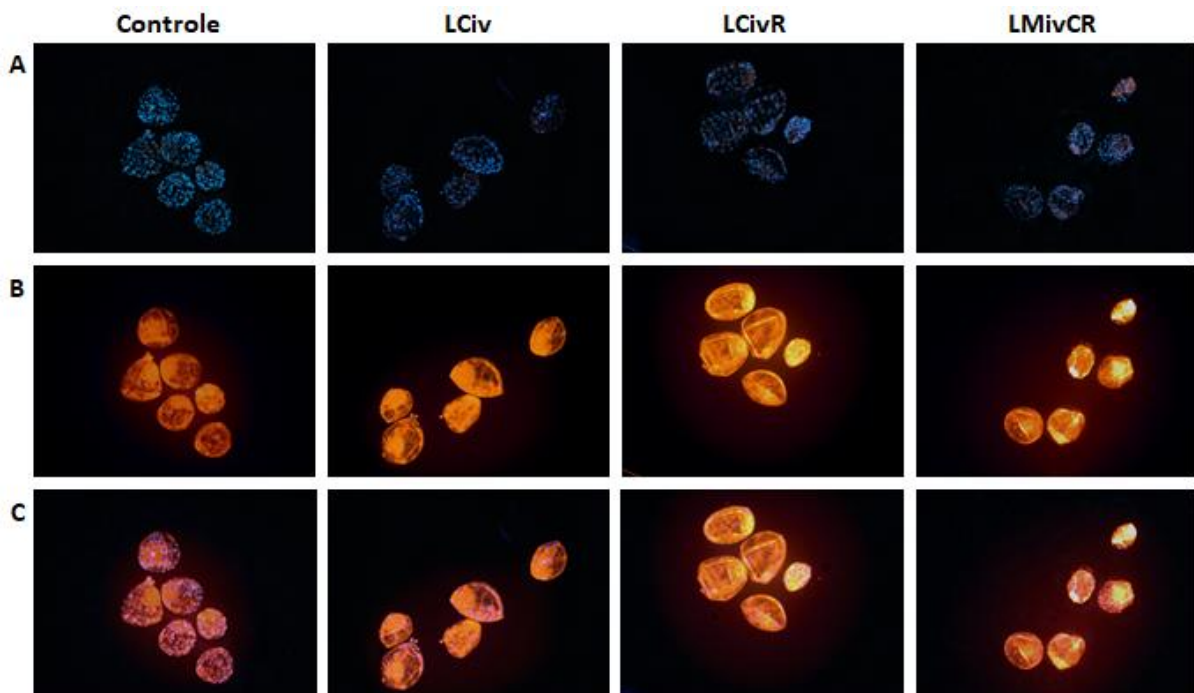


FIGURA 6 – Análise de atividade mitocondrial de embriões realizada após 24 horas do reaquecimento utilizando MitoTracker Orange e Hoechst.

Linha A- Marcação do núcleo celular com Hoechst 33342 (azul)

Linha B- Marcação de gotas lipídicas com MitoTracker Orange (Alaranjado)

Linha C - Sobreposição de imagens

A atividade mitocondrial foi maior em LCivR ($P < 0,001$), em relação aos grupos LCiv e Controle (Figura 5 e 6).

4 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito da adição de L-carnitina a PIV de embriões bovinos. De modo geral os resultados obtidos demonstram o efeito positivo da adição de 0,6 mg/mL de L-carnitina sobre a qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

No presente estudo não se observou melhoria nas taxas de clivagem, o que corrobora os resultados obtidos em embriões de camundongo⁴³, bovino^{23,29,44}, humano⁴⁵, rato⁴⁶, e em embriões suínos clones⁴⁷, apesar de estudos demonstrarem que a LC provoca diminuição do estresse oxidativo em embriões de duas células³⁴. Porém alguns dados mostram que a LC promoveu efeito benéfico na taxa de clivagem em dromedários⁴⁸, ovinos⁴⁹, camundongos (0,6mg/mL)⁵⁰, suínos⁵¹ e bovinos³⁴. A adição de 1mM de LC aumentou a taxa de clivagem em embriões produzidos com ovócitos de ratas pré-púberes tratadas com Etomoxir (um bloqueador da β -oxidação)⁹.

Quanto a quantidade de embriões obtida houve influência positiva da LC, onde foi observado aumento de produção no número total de embriões em 28,6% em LCiv, comparado ao Controle ($P < 0,05$), assim como embriões de qualidade grau I que teve um incremento de 36,9% em LCivR em relação ao Controle ($P < 0,05$). Esse aumento de produção também foi observado em estudos com camundongos^{43,50}, dromedários⁴⁸, suínos⁵², em embriões clone ativados partenogeneticamente⁴⁷, e em bovinos³⁴. A melhora na produção de embriões é associada à LC devido ao incremento da via de β -oxidação dando melhor aporte de ATP aos ovócitos e embriões^{9,12}. Essa ativação da via de β -oxidação é um fator importante, pois além de aumentar a velocidade de desenvolvimento na clivagem e formação de blastocistos expandidos (Bx)⁴⁶ é também determinante para a qualidade do embrião^{7,11}.

Não ocorreu o aumento no número total de células dos embriões tratados com LC, corroborando com pesquisas anteriores onde não se encontrou diferença no número total de células, da MCI nem na proporção MCI/Trofoectoderma em bovinos⁴⁴. O mesmo foi observado em camundongos⁵³. O NTC também não aumentou em embriões suínos clones⁴⁷. Alguns autores, no entanto, observaram o efeito positivo no número de células da MCI e NTC em embriões de camundongo^{9,43,46}. O número total de células nos blastocistos, assim como o número de células da massa celular interna (MCI) é indicativo da qualidade do embrião⁵⁴, e é crucial para a implantação bem sucedida⁵⁵.

O número de células apoptóticas diminuiu em embriões vitrificados em 53,8% em LCivR e 48,7% em LMivCR quando comparado ao Controle ($P < 0,001$). Esse resultado positivo supera os resultados relatados por Takahashi et. al ³⁴, também para embriões bovinos. Essa diminuição no número de células apoptóticas nos embriões tratados com LC vitrificados e reaquecidos pode ser associada a produção de antioxidantes ^{56,57}, à redução de danos ao citoesqueleto ⁵⁸, e à diminuição de conteúdo lipídico ³⁴, o que diminui a morte celular relacionada à crioinjúria em blastocistos bovinos e suínos ^{2,26}. Estudos sugerem que o efeito protetor da L-carnitina em embriões criopreservados ocorre preferencialmente em torno das mitocôndrias ⁵⁹, e que a LC é capaz de estabilizar as membranas mitocondriais e aumentar o fornecimento de energia para a organela, protegendo a célula da apoptose ⁵⁶.

Os grupos tratados com LC apresentaram quantidades menores de conteúdo lipídico intracelular em comparação ao Controle ($P < 0,001$), a redução foi de 29% para LCiv e LCivR e de 50,2% para LMivCR, similares aos relatados previamente em ovócitos suínos ⁵¹, de camundongos ⁵³ e embriões bovinos ^{23,34}, nos quais observou-se a diminuição de 2,8 vezes o conteúdo lipídico nos embriões ²⁹. Experimentos feitos com ovócitos e embriões de ratos mostraram 39% de redução em relação ao Controle ⁶⁰, sendo o mesmo efeito observado em bubalinos ⁶¹. Essa diminuição de conteúdo lipídico é associada à ativação da via de β -oxidação causada pela LC ⁹, resultando na utilização de lipídeos endógenos como fonte de energia pelos ovócitos ^{6,10} e embriões bovinos ¹¹.

Nos embriões tratados com LC a atividade mitocondrial apresentou um incremento de 1,9 vezes no LCivR em relação ao Controle ($P < 0,001$). A LC induz a redistribuição de mitocôndrias ativas e isso é relacionado com a alta produção de ATP ⁶². A densidade de mitocôndrias ativas nas áreas centrais dos ovócitos suínos MIV tratados com LC é maior ⁵¹, assim como os níveis de ATP em embriões bovinos ³⁴.

A taxa de re-expansão foi 22,7% maior no LCiv em relação ao controle ($P < 0,05$). Essa velocidade de recuperação pode ser devido ao aumento do fornecimento de energia ⁵⁶ associado ao efeito antioxidante da LC ³³, que produz embriões mais resistentes ao estresse oxidativo com capacidade de se recuperar mais rapidamente após o descongelamento ²³.

A eclosão avaliada em 24 horas não diferiu, mas com 48 horas após o reaquecimento a eclosão foi 20,1% maior em LCiv em relação ao Controle ($P < 0,05$), a melhoria na sobrevivência de embriões criopreservados tratados com LC já foi reportada em bovinos ³⁴ e em bubalinos; o tratamento dos embriões antes da vitrificação pelo método Open Pulled Straw OPS resultou em sobrevivência de 100% ⁶¹.

A criopreservação causa danos às células tais como fraturas do citoesqueleto (alterações ultraestruturais decorrentes de desorganização de filamentos de actina), alteração na distribuição de organelas (incluindo áreas sem organelas citoplasmáticas, complexo de Golgi localizado longe do núcleo), alteração do padrão de distribuição e atividade mitocondrial, presença de grandes vesículas e diminuição de junções inter-celulares⁶³, atraso na retomada de síntese proteica, mudanças nos níveis de expressão gênica⁶⁴ e danos no DNA⁶⁵, indicando estresse oxidativo adicional durante a criopreservação.

Além da função metabólica, a L-carnitina atua como antioxidante³³, aumentando os níveis de GSH e reduzindo as EROS⁴⁷, diminuindo desta forma a ocorrência de apoptose em células animais^{56,57}. Os efeitos antioxidantes da LC são reportados em diversos estudos^{43,66}, com embriões suínos^{51,52} e bovinos³⁴. Os efeitos protetores da L-carnitina podem ser por diminuir as gotas lipídicas em torno de mitocôndrias e por melhorar o metabolismo energético necessário para a sobrevivência celular sob estresse oxidativo^{59,67}.

Os efeitos positivos observados pela maior eclosão no grupo LCiv podem ser associados também a ação da LC sobre a zona pelúcida (ZP), pois a espessura da desta é um indicador importante para a eclosão bem sucedida e implantação de embriões transferidos⁶⁸. O cultivo *in vitro* de embriões mamíferos muda as características da ZP. Embriões PIV têm a ZP mais espessa, especialmente a camada interna⁶⁹. Somado a isso o processo de criopreservação também altera a ZP levando ao endurecimento da mesma. A zona pelúcida de embriões tratados com LC é significativamente mais fina⁴³. Sprícigo et al.⁷⁰ também encontraram maior eclodibilidade para embriões originados da fertilização de ovócitos tratados com LC antes da vitrificação.

5 CONCLUSÃO

A adição de 0,6 mg/mL de L-carnitina aos meios de cultivo e recultivo aumentou a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos e a atividade mitocondrial, reduzindo a quantidade de lipídeos intracelulares e a apoptose celular e aumentando a criotolerância.

REFERÊNCIAS

1. Seidel GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006;65(1):228–35.

2. 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. *Mol Reprod Dev.* 2002;61(1):57–66.
3. Mazur P, Leibo SP, Seidel GE. Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biol Reprod* [Internet]. 2008;78(1):2–12. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2629758/Cryopreservation>
4. Viana JHM, Figueiredo ACS, Siqueira LGB. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim Reprod* [Internet]. 2017;14(3):476–81. Available from: [http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p476-481 \(AR989\) SBTE.pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p476-481 (AR989) SBTE.pdf)
5. Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev.* 2001;58(2):186–95.
6. Ferguson EM, Leese HJ. Triglyceride content of bovine oocytes and Early Embryos. *J Reprod Fertil.* 1999;116:373–8.
7. Sturmeý RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod Domest Anim.* 2009;44(SUPPL. 3):50–8.
8. Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction.* 2001;122(1):131–8.
9. Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development1. *Biol Reprod* [Internet]. 2010;83(6):909–18. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.110.084145>
10. Cetica P, Pintos L, Dalvit G, Beconi M. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction.* 2002;124(5):675–81.
11. Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, et al. Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and Their Regulation by Alternative In Vivo and In Vitro Culture Conditions1. *Biol Reprod* [Internet]. 2012;87(4). Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.112.099697>
12. Dunning KR, Akison LK, Russell DL, Norman RJ, Robker RL. Increased Beta-Oxidation and Improved Oocyte Developmental Competence in Response to L-Carnitine During Ovarian In Vitro Follicle Development in Mice. *Biol Reprod* [Internet]. 2011;85(3):548–55. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.110.090415>

13. Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote*. 2006;14(4):299–304.
14. Stojkovic M. 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. *Biol Reprod* [Internet]. 2001;64(3):904–9. Available from: <http://www.biolreprod.org/content/64/3/904.abstract>
15. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: Quietness revisited. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(12):667–72.
16. Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*. 2011;11(5):797–813.
17. Renaville B, Bacciu N, Comin A, Motta M, Poli I, Vanini G, et al. Plasma and follicular fluid fatty acid profiles in dairy cows. *Reprod Domest Anim*. 2010;45(1):118–21.
18. Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Kepczynski M, Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology*. 2011;75(1):42–54.
19. Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, et al. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts1. *Biol Reprod* [Internet]. 2012;87(6):1–11. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.112.102897>
20. Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Staines ME, Ewen M, Lomax MA, et al. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2003;15(5–6):275–84.
21. Zhou W, Xiang T, Walker S, Farrar V, Hwang E, Findeisen B, et al. Global gene expression analysis of bovine blastocysts produced by multiple methods. *Mol Reprod Dev*. 2008;75(5):744–58.
22. Côté I, Vigneault C, Laflamme I, Laquerre J, Fournier É, Gilbert I, et al. Comprehensive cross production system assessment of the impact of in vitro microenvironment on the expression of messengers and long non-coding RNAs in the bovine blastocyst. *Reproduction*. 2011;142(1):99–112.
23. Held-Hoelker E, Klein SL, Rings F, Salilew-Wondim D, Zidane M, Neuhoff C, et al. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*. 2017;96:145–52.
24. Thompson JG, Gardner DK, Anne Pugh P, McMillan WH, Robin Tervit H. Lamb Birth Weight is Affected by Culture System Utilized during in Vitro Pre-Elongation Development of Ovine Embryos. *Biol Reprod* [Internet]. 1995;53(6):1385–91. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2761892/Lamb>

25. Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Smorag Z. Changes of lipid composition in non-cultured and cultured porcine embryos. *Theriogenology*. 2010;74(2):265–76.
26. Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R. J., Grupen, C. G. and N, B. M. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*. 1995;374:416.
27. Gasparrini B, Attanasio L, De Rosa A, Monaco E, Di Palo R, Campanile G. Cryopreservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Anim Reprod Sci*. 2007;98(3–4):335–42.
28. Edidin M. Lipids on the frontier: A century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(5):414–8.
29. Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG, Dunning KR. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* [Internet]. 2012;77(8):1632–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.008>
30. Vanella A, Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Di Giacomo C, Sorrenti V, et al. L-Propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol*. 2000;16(2):99–104.
31. Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2000;1486(1):1–17.
32. Montjean D, Entezami F, Lichtblau I, Belloc S, Gurgan T, Menezo Y. Carnitine content in the follicular fluid and expression of the enzymes involved in beta oxidation in oocytes and cumulus cells. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(11):1221–5.
33. Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci*. 2006;78(8):803–11.
34. Takahashi T, A YI, A TS, A MK, A MG, A TN. Supplementation of culture medium with L -carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25:589–99.
35. Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effect of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 2003;9(1):35–48.
36. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 1999;52:683–700.
37. Parrish JJ, Krogenaes A, L. S-P. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 1995;44:859–69.
38. Bó GA, Mapletoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod*. 2013;10(3):344–8.
39. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67(1):73–80.

40. Santos ECS, Sato D, Lucia T, Iwata H. Brilliant cresyl blue staining negatively affects mitochondrial functions in porcine oocytes. *Zygote*. 2014;23(3):352–9.
41. Genicot G, Leroy JLMR, Van Soom A, Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology*. 2005;63(4):1181–94.
42. R CoreTeam. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018; Available from: <https://www.r-project.org/>.
43. Khanmohammadi N, Movahedin M, Safari M, Sameni HR, Yousefi B, Jafari B, et al. Effect of L-carnitine on in vitro developmental rate, the zona pellucida and hatching of blastocysts and their cell numbers in mouse embryos. *Int J Reprod Biomed (Yazd, Iran)* [Internet]. 2016;14(10):649–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27921089>
44. Knitlova D, Hulinska P, Jeseta M, Hanzalova K, Kempisty B, Machatkova M. Supplementation of l -carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2017;102:16–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X1730300X>
45. Tanaka T, Satoh M, Hashimoto S, Nakaoka AY, Morimoto Y. L-Carnitine improves the human blastocyst development. *Fertil Steril*. 2016;107.
46. Truong TT, Soh YM, Gardner DK. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1445–54.
47. You J, Lee J, Hyun SH, Lee E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* [Internet]. 2012;78(2):235–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.027>
48. Fathi M, El-Shahat KH. L-carnitine enhances oocyte maturation and improves in vitro development of embryos in dromedary camels (*Camelus dromedaries*). *Theriogenology*. 2017;104:18–22.
49. Mishra A, Reddy IJ, Gupta PSP, Mondal S. Developmental regulation and modulation of apoptotic genes expression in sheep oocytes and embryos cultured in vitro with L-carnitine. *Reprod Domest Anim*. 2016;51(6):1020–9.
50. Zare Z, Masteri Farahani R, Salehi M, Piryaee A, Ghaffari Novin M, Fadaei Fathabadi F, et al. Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(4):635–43.
51. Somfai T, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(7):912–20.

52. Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, et al. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology*. 2011;76(5):785–93.
53. Paczkowski M, Schoolcraft WB, Krisher RL. Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake and is essential to oocyte competence. *Reproduction*. 2014;148(4):429–39.
54. Du QY, Wang EY, Huang Y, Guo XY, Xiong YJ, Yu YP, et al. Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril*. 2016;105(4):910–919.e1.
55. Lee YSL, Thouas GA, Gardner DK. Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2015;30(3):543–52.
56. Pillich RT, Scarsella G, Risuleo G. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Exp Cell Res*. 2005;306(1):1–8.
57. Ye J, Li J, Yu Y, Wei Q, Deng W, Yu L. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul Pept*. 2010;161(1–3):58–66.
58. Mansour G, Abdelrazik H, Sharma RK, Radwan E, Falcone T, Agarwal A. L-carnitine supplementation reduces oocyte cytoskeleton damage and embryo apoptosis induced by incubation in peritoneal fluid from patients with endometriosis. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;91(5 SUPPL.):2079–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.097>
59. Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, et al. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010;49(4):674–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.025>
60. Kyvelidou C, Sotiriou D, Antonopoulou T, Tsagkaraki M, Tserevelakis GJ, Filippidis G, et al. L-Carnitine affects preimplantation embryo development toward infertility in mice. *Reproduction*. 2016;152(4):283–91.
61. Verma M, Pandey S, Bhat IA, Mukesh B, Anand J, Chandra V, et al. Impact of L-carnitine on lipid content and post thaw survivability of buffalo embryos produced in vitro. *Cryobiology*. 2018;(March):1–7.
62. Yu Y, Dumollard R, Rossbach A, Lai FA, Swann K. Redistribution of mitochondria leads to bursts of ATP production during spontaneous mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol*. 2010;224(3):672–80.
63. Dalcin L, Silva RC, Paulini F, Silva BDM, Neves JP, Lucci CM. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*. 2013;67(2):137–45.
64. Aksu DA, Agca C, Aksu S, Bagis H, Akkoc T, Caputcu AT, et al. Gene expression profiles of vitrified in vitro- and in vivo-derived bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2012;79(9):613–25.

65. Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: Which one is better? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009;21(3):270–4.
66. Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R, Agarwal A. L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;91(2):589–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.067>
67. Chang B, Nishikawa M, Nishiguchi S, Inoue M. L-carnitine inhibits hepatocarcinogenesis via protection of mitochondria. *Int J Cancer.* 2005;113(5):719–29.
68. Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Bashar S, Mandel R, Librach C. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women’s age and hormonal levels? *Fertil Steril.* 2012;98(1):77–83.
69. Elhelw BA, Sadek MM El, Nomrosy KM El. Assisted hatching: routine or selective application in IVF. *Middle East Fertil Soc.* 2004;9(3):198–202.
70. Sprícigo JF, Morató R, Arcarons N, Yeste Ma, Alves Dode M, López-Bejar M, et al. Assessment of the effect of adding L-carnitine and / or resveratrol to maturation medium before vitri fi cation on in vitro -matured calf oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2017;89:47–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.035>

CAPÍTULO 3 - EFEITO DA ADIÇÃO DOS DELIPIDADORES QUÍMICOS L-CARNITINA E FORSKOLIN NA PRODUÇÃO *IN VITRO*, VITRIFICAÇÃO (CRYOTOP) E NO CONGELAMENTO LENTO DE EMBRIÕES BOVINOS.

RESUMO

Embriões produzidos *in vitro* apresentam menor resistência à criopreservação devido ao alto acúmulo de conteúdo lipídico intracitoplasmático. Este estudo foi conduzido com o objetivo de verificar os efeitos de dois delipidadores químicos no desenvolvimento e na sobrevivência de embriões bovinos PIV, criopreservados por vitrificação (Experimento 1) ou por congelamento lento modificado (Experimento 2). Foram avaliados o conteúdo intracitoplasmático de lipídeos, a apoptose celular, as taxas de re-expansão e eclosão após aquecimento. Os embriões foram cultivados sem adição de delipidadores (Controle), na presença de 10µM de Forskolín adicionado ao meio entre o D5 e D7 (FORSK) e na presença de L-carnitina (0,6mg/mL) adicionada ao CIV do D1 ao D7+ LC durante o recultivo (LC). A suplementação com delipidadores não alterou a taxa de clivagem em D3 ($P > 0,05$), mas aumentou a produção de blastocistos em D7 em 22,0% e a proporção de embriões grau I em 30,1% no grupo LC ($P < 0,05$), em relação ao Controle e ao grupo FORSK. O tratamento com delipidadores reduziu o conteúdo intracitoplasmático de lipídeos ($P < 0,001$) em 2,2 vezes em FORSK e quatro vezes no LC comparados ao Controle. No Experimento 1 a taxa de re-expansão (duas horas) foi maior no grupo LC ($P < 0,05$), nos embriões vitrificados por Cryotop os grupos FORSK e LC apresentaram diminuição no número de células apoptóticas ($P < 0,001$) (37,0% e 53,7% respectivamente) em relação ao Controle. No Experimento 2 foram utilizados dois tratamentos Controle para congelamento lento (Clássico e Modificado). A taxa de re-expansão (duas horas) no tratamento LC foi 84,9% maior em relação ao Controle Modificado ($P < 0,05$), e a eclosão após 24 horas aumentou 83,5% quando comparado ao grupo FORSK ($P < 0,05$). A taxa de eclosão após 48 horas também foi maior em LC em comparação ao FORSK e aos Controles Clássico e Modificado (77,5%, 41,9%, 40,5%, 40,8% respectivamente) ($P < 0,05$). No tratamento LC foi observada diminuição ($P < 0,05$) de 64,7% na taxa de embriões degenerados em relação ao Controle Clássico, e de 42,0% na quantidade de células apoptóticas em relação ao Controle Modificado ($P < 0,001$). A utilização de delipidadores químicos foi efetiva na diminuição do conteúdo intracitoplasmático de lipídeos em embriões bovinos PIV, e a LC aumentou a criotolerância dos embriões submetidos ao protocolo de congelamento lento modificado.

Palavras-chave: Delipidadores; PIV; congelamento lento; criotolerância; embriões bovinos.

ABSTRACT

Embryos *in vitro* produced show less resistance to cryopreservation due to the high accumulation of intracytoplasmic lipid content. The aim of this study was verifying the effects of two chemical delipidators on the development and survival of IVP bovine embryos, cryopreserved by vitrification (Experiment 1) or modified slow freezing (Experiment 2). The intracytoplasmic content of lipids, cellular apoptosis, rates of re-expansion and hatching post-thawing were evaluated. The embryos were cultured without addition of delipidators (Control), in the presence of 10 μ M of Forskolin added to the medium between D5 and D7 (FORSK) and in the presence of L-carnitine (0.6mg / mL) added to the IVC from D1 to D7 + LC in post-thawing medium (LC). Supplementation with delipidators did not change the cleavage rate in D3 ($P > 0.05$), but increased the production of blastocysts in D7 by 22.0% and the proportion of grade I embryos by 30.1% in the LC group ($P < 0.05$), in relation to the Control and the FORSK group. Treatment with delipidators reduced the intracytoplasmic lipid content ($P < 0.001$) by 2.2 times in FORSK and four times in the LC compared to Control. In Experiment 1 the re-expansion rate (two hours) was higher in the LC group ($P < 0.05$), in the Cryotop vitrified embryos the FORSK and LC groups presented a decrease in the number of apoptotic cells ($P < 0.001$) (37.0% and 53.7% respectively) in relation to the Control. In Experiment 2, two treatments were used for slow freezing (Classic and Modified). The re-expansion rate (two hours) in the LC treatment was 84.9% higher than the Modified Control ($P < 0.05$), and hatching after 24 hours increased 83.5% when compared to the FORSK group ($P < 0.05$). The hatching rate after 48 hours was also higher in LC compared to FORSK and the Classical and Modified Controls (77.5%, 41.9%, 40.5%, 40.8% respectively) ($P < 0.05$). In the LC treatment, there was a decrease ($P < 0.05$) of 64.7% in the degenerate embryo rate in relation to the Classic Control, and 42.0% in the number of apoptotic cells in relation to the Modified Control ($P < 0.001$). The use of chemical delipidators was effective in reducing intracytoplasmic lipid content in IVP bovine embryos, and LC increased the cryotolerance of embryos submitted to the modified slow freezing protocol.

Keywords: Delipidators; IVP; slow freezing; cryotolerance; bovine embryos.

1 INTRODUÇÃO

Existe uma relação inversa entre a qualidade do embrião e o conteúdo lipídico. Tendo em vista que o acúmulo de conteúdo lipídico nos embriões e a localização destas gotas são fatores que comprometem o desenvolvimento e a qualidade de embriões produzidos *in vitro* (vs. *in vivo*)¹⁻³. A alta quantidade de conteúdo lipídico no citoplasma está também relacionada à crioinjúria em ovócitos^{4,5} e em blastocistos bovinos e suínos^{4,6}.

Ovócitos maturados e embriões produzidos *in vitro* e cultivados na presença de soro fetal bovino têm maior conteúdo lipídico intracelular (principalmente na forma de gotículas) em comparação aos *in vivo*^{2,7} ou em sistemas livres de soro⁸.

Um dos principais obstáculos associado ao uso intensivo da PIV é a grande sensibilidade dos embriões bovinos à criopreservação e/ou a falta de métodos adequados para preservar estes embriões^{6,9,10}. Existem pelo menos duas abordagens para superar esse problema; ajustar os métodos de criopreservação ou melhorar a qualidade do embrião, otimizando o ambiente *in vitro* para a produção de embriões¹¹.

Apesar de blastocistos bovinos serem produzidos sob uma ampla gama de condições de cultivo *in vitro* com algum sucesso, a PIV, em seu estado da arte atual não fornece condições ideais de produção¹², devido às condições sub-ótimas de cultivo que geram embriões de baixa qualidade¹³⁻¹⁵.

Os embriões PIV apresentam diferenças morfológicas e funcionais quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* caracterizados pela cor, densidade, número de células, alterações nos genes transcritos e criotolerância¹⁶. Embriões PIV são caracterizados pelo aumento da sensibilidade ao resfriamento e diminuição da capacidade de tolerar à criopreservação, em comparação aos produzidos *in vivo*^{6,9,10,17-19}, e o sucesso da criopreservação depende muito da qualidade dos blastocistos²⁰.

Além do acúmulo de lipídeos intra-celulares foram encontradas diferenças no perfil lipídico das membranas de blastocistos PIV, o que pode determinar alterações na sua fluidez¹, sendo a estabilidade da membrana um fator importante para determinar a susceptibilidade do embrião ao congelamento¹¹.

Quando comparado com o método tradicional de congelação lenta, o método de vitrificação parece ser mais eficiente para a criopreservação de embriões bovinos PIV^{11,21}, que são mais sensíveis a crio-lesões do que os produzidos *in vivo*²².

A vitrificação tem sido considerada uma alternativa viável ao congelamento lento²³ e é utilizada rotineiramente nos laboratórios comerciais, pois é uma técnica fácil de

executar e menos onerosa²⁴ que o congelamento lento, sendo necessário menos de 10 minutos para o resfriamento dos embriões²⁵.

No entanto a técnica também tem suas limitações sendo uma das principais o reaquecimento, que não é feito em “one-step”, o que dificulta sua aplicabilidade em nível de campo. Um método de criopreservação que permita a transferência direta (DT) de embriões bovinos produzidos *in vitro* para receptoras após o descongelamento é um complemento valioso aos procedimentos comerciais de transferência de embriões e apresentaria vantagens sobre os procedimentos de criopreservação que exigem a remoção, passo a passo, do crioprotetor após o descongelamento²⁰.

O procedimento de transferência direta permite que cada embrião seja descongelado com um mínimo de equipamento e transferido à medida que as fêmeas receptoras são preparadas para o procedimento. Não são necessárias instalações laboratoriais, uma vez que os embriões não são manipulados fora da palheta^{20,26} e, conseqüentemente, seu uso diminui o risco da contaminação mediada pelo nitrogênio líquido²⁷ ou meio ambiente.

Os embriões PIV apresentam maior sensibilidade ao congelamento lento em relação aos métodos de vitrificação¹¹, o que também ocorre em humanos²⁸, sendo a vitrificação ainda a melhor estratégia para a criopreservação de todos os estágios de desenvolvimento do ovócito e embriões²⁹.

A redução de conteúdo lipídico intracitoplasmático melhora a criotolerância de embriões bovinos^{6,11}, independente do método de criopreservação. Atualmente a delipidação mais utilizada é por meio da lipólise química utilizando cofatores da via metabólica da β -oxidação tais como L-carnitina²⁰ e moduladores do AMPc como o Forskolin³⁰.

Estudos utilizando a lipólise quimicamente induzida por Forskolin demonstraram melhora na criotolerância de ovócitos suínos^{23,31}, de embriões suínos^{32,33}, e bovinos^{30,34,35}. O efeito positivo da LC sobre o metabolismo e a taxa de sobrevivência após criopreservação também foi confirmado em bovinos²⁰, bubalinos³⁶, camundongos³⁷ e em ovócitos suínos³⁸.

A possibilidade de utilizar a delipidação química parcial, melhorando a qualidade e a criotolerância de embriões PIV, abre caminhos para o desenvolvimento de metodologias de criopreservação que possibilitarão a expansão do mercado. Este estudo foi conduzido com o objetivo de desenvolver protocolos e metodologias para melhorar a criotolerância de embriões produzidos *in vitro*, obtendo-se embriões de alto potencial de desenvolvimento após o reaquecimento e transferência direta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Composição dos meios

Meio de maturação (MIV), Meio de fecundação (FIV), Meio de Capacitação (CAP), Meio de cultivo (CIV), Solução de L-carnitina, Soluções de vitrificação, Soluções de aquecimento: conforme descrito no Capítulo 2.

Solução de Forskolin

Solução estoque: 8,21mg de Forskolin (Forskolin –F6886) (Sigma-Aldrich® Merck KGaA, Darmstad, Alemanha) diluído em 1mL de DMSO (500X:20mM) – conservada a 4°C.

Solução de trabalho: 2 µL de solução estoque em 1 mL de CIV (10µM).

Soluções de congelamento lento

Solução de manutenção – solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (D-PBS) suplementada com 0,4% de BSA (TQC Holding Plus -Nutricell Nutrientes Celulares-Brasil).

Solução de congelamento EG- solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (D-PBS) suplementada com 1,5 M de etilenoglicol (EG) e 5 mg / mL de BSA (TQC Ethylene Glycol - Nutricell Nutrientes Celulares- Brasil).

2.2 Seleção de ovócitos e maturação *in vitro*

Conforme descrito no Capítulo 2.

2.3 Fecundação *in vitro*

Conforme descrito no Capítulo 2.

2.4 Cultivo *in vitro* dos embriões

Os possíveis zigotos foram parcialmente desnudados por sucessivas pipetagens, lavados e transferidos para gotas de 200 µL de meio de cultivo sob óleo mineral por sete dias a 38,8°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação.

Após 72 horas de cultivo pós-inseminação (D3 pi) avaliou-se a taxa de clivagem e foi feita a remoção e substituição de 50% do meio de cultivo da gota (primeiro *Feeding*), repetindo-se o procedimento em D5 (segundo *Feeding*) . A qualidade morfológica e a taxa

de blastocistos foram avaliadas após sete dias (D7), utilizando-se o padrão recomendado por Bó e Mapletoft ³⁹ sendo o dia zero (D0) o dia da FIV.

A diluição da L-carnitina (0,6mg/ml) no CIV foi realizada sempre no momento do uso.

2.5 Vitrificação, aquecimento e recultivo dos embriões

Conforme descrito no Capítulo 2.

2.6 Congelamento Lento - Clássico, aquecimento e recultivo dos embriões

Os blastocistos e blastocistos expandidos com sete dias de cultivo (grau I e II) foram criopreservados pela técnica de congelamento lento – clássico proposto por Voelkel e Hu 1992 ²⁶, utilizando o equipamento de congelação TK 3000 COMPACTA[®] (TK Equipamentos para Reprodução, Brasil) e armazenados em nitrogênio líquido.

Os embriões foram colocados em gotas de meio de manutenção (TQC Holding Plus -Nutricell Nutrientes Celulares- Brasil) (Holding - solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (D-PBS) suplementada com 0,4% de BSA) em temperatura ambiente, e imediatamente, na sequencia foram lavados em três gotas de solução salina tamponada com solução fosfato de Dulbecco (D-PBS) suplementada com 1,5 M de etilenoglicol (EG) e 5.0 mg / mL de BSA (TQC Ethylene Glycol - Nutricell nutrientes celulares- Brasil). Após o período de equilíbrio de 10 minutos (primeira estabilização), os embriões foram envasados em palhetas de plástico de 0,25 mL (dois embriões por palheta) (meio com 1,5 de EG + embriões no centro e meio de manutenção nas duas extremidades da palheta) e colocados diretamente na câmara do equipamento TK 3000 com temperatura estabilizada a -6°C. Após dois minutos foi realizada a indução da cristalização (“seeding”). Após o “seeding” foi mantido o equilíbrio por 10 minutos (segunda estabilização) antes do início da curva de congelamento, de -6 a -35°C com queda gradual de 0,5 ° C / min. Ao atingir -35°C ocorreu outra estabilização de 10 minutos (terceira estabilização) e as palhetas foram então mergulhadas no nitrogênio líquido, alojadas nas canecas e armazenadas em botijão criogênico com nitrogênio líquido até o descongelamento. Para tal procedimento, as palhetas foram expostas ao ar por 10 segundos e descongeladas em banho-maria a 30°C por 30 segundos e o conteúdo foi dispensado em uma placa de Petri estéril de 35 mm a 36°C.

2.7 Congelamento Lento - Modificado, aquecimento e recultivo dos embriões

Blastocistos e blastocistos expandidos com sete dias de cultivo (grau I e II) foram criopreservados pela técnica de congelamento lento –modificado utilizando o equipamento de congelação TK 3000 COMPACTA® (TK Equipamentos para Reprodução, Brasil) e armazenados em nitrogênio líquido.

Primeiramente, os blastocistos foram depositados em uma gota de 70 µL de meio de manutenção (TQC Holding Plus -Nutricell Nutrientes Celulares- Brasil) (Holding - solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (D-PBS) suplementada com 0,4% de BSA) aquecido a 37°C, Em seguida, a gota de meio de manutenção foi unida a uma gota de 70 µL solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (D-PBS) suplementada com 1,5 M de etilenoglicol (EG) e 5 mg / mL de BSA (meio EG) por 2,5 minutos, após este tempo outra gota de 70 µL de meio EG foi unida por mais 2,5 minutos. Após os cinco minutos os blastocistos foram depositados em uma gota de 100 µL de meio EG onde permaneceram por 10 minutos a 37°C. (primeira estabilização), os embriões foram envasados em palhetas de plástico de 0,25 mL (dois embriões por palheta) (meio com 1,5 de EG + embriões no centro da palheta, e meio de manutenção nas duas extremidades da palheta) e colocados diretamente na câmara do equipamento TK 3000 com temperatura estabilizada a -6°C. Após dois minutos, foi realizada a indução a cristalização (“seeding”), após o “seeding” foi mantido o equilíbrio por 10 minutos (segunda estabilização) antes do início da rampa de congelamento, de -6 a -35°C com queda gradual de 0,5 ° C/min. Ao atingir -35°C ocorreu outra estabilização de 10 minutos (terceira estabilização) e as palhetas foram então mergulhadas no nitrogênio líquido, alojadas nas canecas e armazenadas em botijão criogênico com nitrogênio líquido até o descongelamento. Para tal procedimento, as palhetas foram expostas ao ar por 10 segundos e descongeladas em banho-maria a 35°C por 30 segundos e o conteúdo foi dispensado em uma placa de Petri estéril de 35 mm a 36°C.

2.8 Número de células apoptóticas

Conforme descrito no Capítulo 2.

2.9 Avaliação do teor lipídico intracelular

Conforme descrito no Capítulo 2.

2.10 Delineamento experimental

Experimento 1 - Efeito da adição dos delipidadores químicos L-carnitina e Forskolin na produção in vitro e na vitrificação (Cryotop) de embriões bovinos.

Após a seleção, 2.543 CCO's oriundos de dez sessões de punção folicular foram distribuídos ao acaso nos tratamentos e submetidos à maturação *in vitro*. Os tratamentos foram meio sem adição de delipidadores (Controle), cultivados na presença de 10µM de Forskolin (D5-D7) (FORSK), e cultivados na presença de 0,6mg/mL de L-carnitina no CIV+LC no reaquecimento (LC).

Foram realizadas avaliações dos efeitos dos agentes delipidadores L-carnitina e Forskolin nas taxas de produção de embriões, morte celular, quantificação de lipídeos, taxas de re-expansão e eclosão em embriões PIV vitrificados pelo método Cryotop.

Com 22-24 horas de maturação todas as gotas foram fecundadas (D0), após 18 horas os possíveis zigotos foram transferidos para placas com meio CIV, onde permaneceram por sete dias. No terceiro dia de cultivo (D3) avaliou-se a taxa de clivagem e a metade do meio de cultivo de cada gota foi substituída (primeiro *feeding*). No quinto dia de cultivo (D5) metade do meio de cultivo de cada gota foi substituída novamente (segundo *feeding*), sendo que neste momento foi adicionado o Forskolin.

Após sete dias de cultivo (D7), avaliou-se a taxa e a qualidade morfológica dos blastocistos, segundo Bó e Mapletoft, 2013³⁹. No D7 os blastocistos classificados com grau I e II foram vitrificados pelo método Cryotop, um total de 440 embriões foram vitrificados e reaquecidos. Do total 75 embriões foram utilizados para a análise de apoptose celular (Tunel), 75 para análise e mensuração de lipídeos intracitoplasmáticos (Red Nile), e 245 para análise de re-expansão e eclosão. Foram armazenados 45 embriões para posterior análise de expressão de genes.

Após o aquecimento, os blastocistos foram lavados três vezes e incubados em meio de cultivo sob óleo mineral em incubadora a 38,8°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação por 48 horas. A taxa de re-expansão foi avaliada após duas horas. A taxa de eclosão foi avaliada às 24 e 48 horas após o reaquecimento.

Experimento 2 - Efeito da adição dos delipidadores químicos L-carnitina e Forskolin na produção in vitro e no congelamento lento de embriões bovinos.

No D7, 435 blastocistos classificados com grau I e II produzidos no experimento 1 foram criopreservados pelo método de congelamento lento, 435 embriões foram congelados e re-aquecidos. Do total, 75 embriões foram utilizados para a análise de apoptose celular (Tunel) e 300 para análise de re-expansão e eclosão. Foram armazenados 60 embriões para posterior análise de expressão de genes.

Após o aquecimento, os blastocistos foram lavados três vezes em CIV e incubados em meio de cultivo sob óleo mineral em incubadora a 38,8°C em atmosfera de 5% de CO₂ e umidade relativa saturada sem condensação por 48 horas. A taxa de re-expansão foi avaliada após duas horas. A taxa de eclosão foi avaliada às 24 e 48 horas do reaquecimento.

2.11 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa computacional R versão 3.0.2⁴⁰.

Os dados que não apresentaram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk foram comparados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, a 5% de significância, (quantificação de lipídeos intracelulares). O número de embriões clivados, blastocistos, qualidade embrionária, média do número total de células e número de células apoptóticas entre os tratamentos foram analisadas utilizando o modelo linear generalizado com distribuição binomial, testando contrastes de pares de tratamentos, a 5% de significância. Os dados quantitativos foram apresentados na forma de média e os qualitativos em porcentagem.

3 RESULTADOS

Experimento 1

Os dados referentes à clivagem, produção total de embriões e embriões de qualidade grau I estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 – Taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos, sem adição de delipidadores (Controle), cultivados na presença de 10 μ M de Forskolín (D5-D7) ou 0,6mg/mL de L-carnitina

Tratamentos	Clivagem D3 (%)	Produção de Embriões D7	
		Total de Embriões (%)	Embriões grau I (%)
Controle	78,7 (667/848) ^a	30,1 (255/848) ^b	18,8 (159/848) ^b
Forskolin	77,9 (661/848) ^a	33,8 (287/848) ^{ab}	21,9 (186/848) ^b
L-carnitina	79,5 (673/847) ^a	38,6 (327/847) ^a	26,9 (228/847) ^a

^{a,b} Letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,05$ pelo modelo linear generalizado com distribuição binomial).

A utilização de delipidadores químicos não alterou a taxa de clivagem ($P > 0,05$), o tratamento com LC aumentou a produção de embriões comparando com o Controle ($P < 0,05$) (38,6% vs 30,1% respectivamente). A produção de embriões grau I também foi maior no tratamento com LC. (26,9%) em relação ao Forskolín (21,9%) e ao Controle (18,8%)($P < 0,05$).

Os resultados da análise de quantificação de lipídeos intracelulares por fluorescência utilizando Vermelho do Nilo são apresentadas nas Figuras 1 e 2.

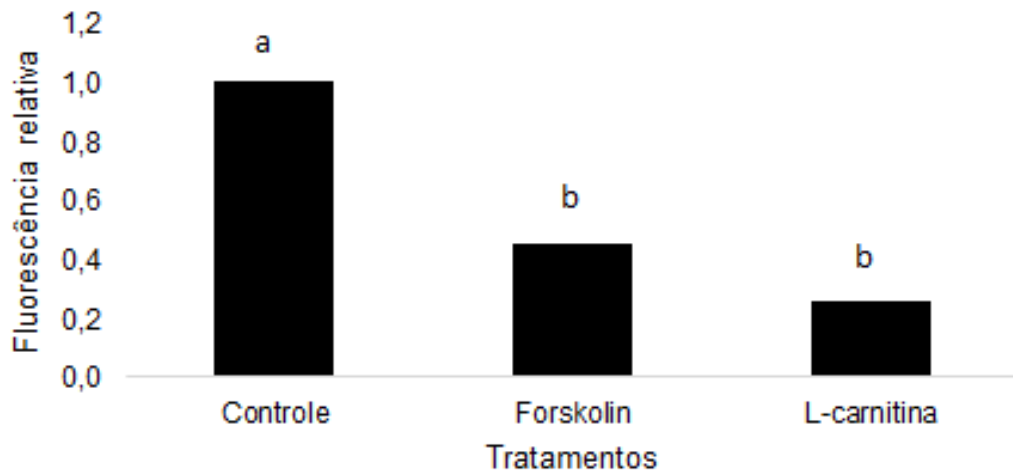


FIGURA 1 – Quantificação de lipídeos intracelulares por fluorescência utilizando Vermelho do Nilo em embriões bovinos vitrificados, reaquecidos e cultivados por 24 horas. As análises foram realizadas em triplicata ($n = 75$). $P < 0,001$ (pelo teste de Kruskal-Wallis). Eixo Y: média de fluorescência do controle foi definida como 1.00.

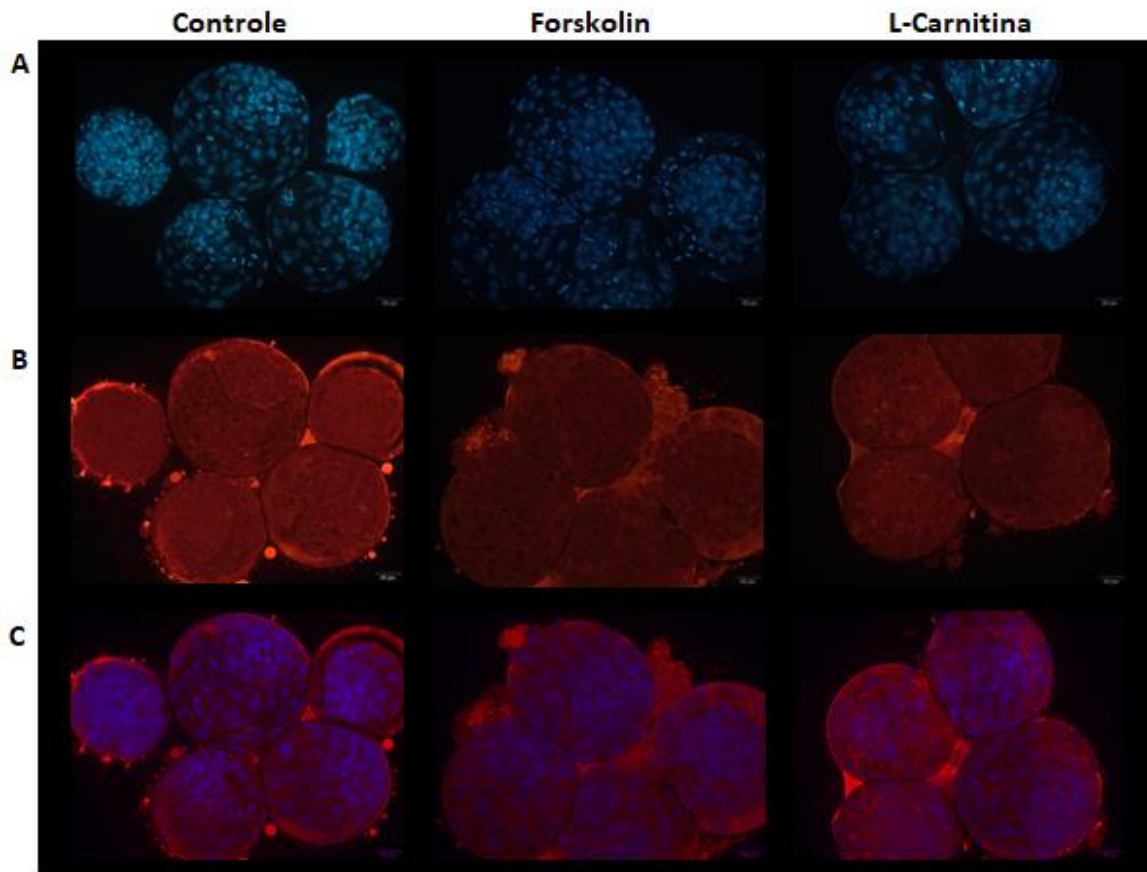


FIGURA 2 – Quantificação de conteúdo lipídico intracelular dos embriões realizada após 24 horas do reaquecimento utilizando corante lipídico específico vermelho do Nilo.
 Linha A- marcação do núcleo celular com Hoechst 33342 (azul)
 Linha B- marcação de gotas lipídicas com Vermelho do Nilo (vermelho)
 Linha C - sobreposição de imagens

O tratamento com Forskolin e L-carnitina diminuiu ($P < 0,001$) a quantidade de lipídeos intracelulares nos embriões em relação ao Controle (0,45; 0,25 e 1 respectivamente).

A Tabela 2 apresenta os dados sobre re-expansão, eclosão avaliada em 24 e 48 horas, e total de embriões degenerados, após o reaquecimento de embriões vitrificados pelo método Cryotop.

TABELA 2 – Taxa de re-expansão (2 horas) e eclosão (24 e 48 horas) de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem adição de delipidadores (Controle), cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7), e cultivados na presença de L-carnitina + LC no reaquecimento, vitrificados pelo método do Cryotop, aquecidos e recultivados por 48 horas

Tratamentos	Re-expansão (%)	Eclosão (%)		Degenerados
		24h	48h	
Controle	58,5 (48/82) ^b	54,9 (45/82) ^a	89,0 (73/82) ^a	3,7 (3/82) ^a
Forskolin	54,2 (45/83) ^b	54,2 (45/83) ^a	86,7 (72/83) ^a	2,4 (2/83) ^a
L-carnitina	76,3 (61/80) ^a	52,5 (42/80) ^a	88,8 (71/80) ^a	2,5 (2/80) ^a

^{a,b}Letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,05$ pelo modelo linear generalizado com distribuição binomial).

A taxa de re-expansão foi maior ($P < 0,05$) no tratamento LC em relação ao Forskolin e ao Controle (76,3; 54,2 e 58,5, respectivamente). A variável eclosão em 24 e 48 horas e a taxa de degenerados não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$).

A Figura 3 apresenta a cinética de desenvolvimento após o reaquecimento de embriões vitrificados pelo método Cryotop.

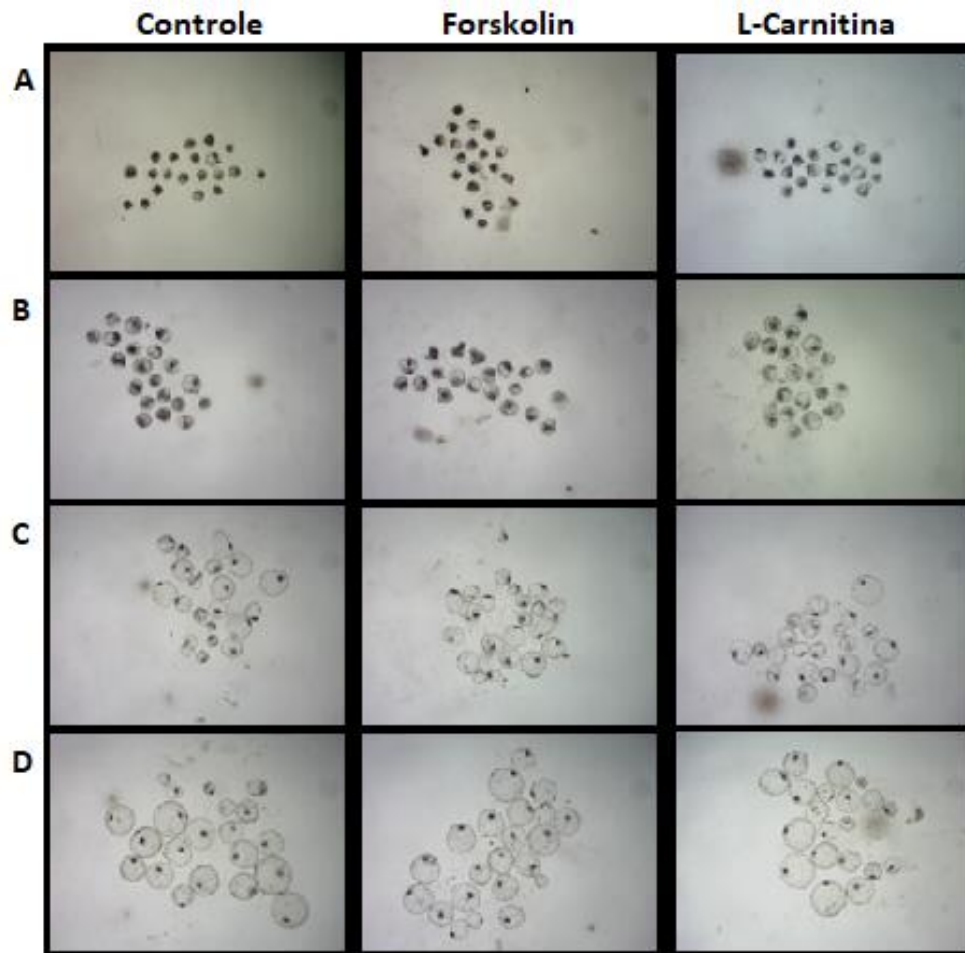


FIGURA 3 – Cinética de desenvolvimento de embriões vitrificados pelo método Cryotop e reaquecidos, avaliando re-expansão às 2 horas, eclosão em 24 e 48 horas após reaquecimento.

Linha A- Imediatamente após reaquecimento zero hora

Linha B- Análise de re-expansão com duas horas após o reaquecimento

Linha C - Análise de eclosão com 24 horas após o reaquecimento

Linha D - Análise de eclosão com 48 horas após o reaquecimento

O número total de células (NTC) e o número de células apoptóticas (NCA) em embriões vitrificados e reaquecidos pelo método do Cryotop, são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 – Análise de apoptose celular (TUNEL) em embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem adição de delipidadores (Controle), cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7), e cultivados na presença de L-carnitina+ LC no reaquecimento, vitrificados pelo método do Cryotop, aquecidos e recultivados por 24 horas

Tratamentos	Nº de Blastocistos	NTC	NCA
Controle	25	104,0 ^a	5,4 ^a
Forskolin	25	107,9 ^a	3,4 ^b
L-carnitina	25	110,8 ^a	2,5 ^b

NTC-Número total de células,

NCA-Número de células apoptóticas

^{a,b}Letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa

($P < 0,001$ pelo modelo linear generalizado com distribuição binomial).

O número total de células não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$) porém o número de células apoptóticas foi menor ($P < 0,001$) no tratamento com LC e FORSK em relação ao Controle (2,5; 3,4 e 5,4 respectivamente).

Experimento 2

A Tabela 4 e Figura 4 apresentam os dados sobre re-expansão, eclosão avaliada em 24 e 48 horas, e total de embriões degenerados após o reaquecimento de embriões vitrificados pelo método de congelamento lento.

TABELA 4 – Taxa de re-expansão (2 horas) e eclosão (24 e 48 horas) em embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem adição de delipidadores (Controle Clássico e Modificado) e cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7) e cultivados na presença de L-carnitina + LC no reaquecimento, criopreservados pelo método de congelamento lento, aquecidos e recultivados por 48 horas

Tratamentos	Re-expansão(%)	Eclosão (%)		Degenerados
		24h	48h	
Con. Clássico	17,7 (14/79) ^b	19,0 (15/79) ^b	40,5(32/79) ^b	24,1(19/79) ^a
Con.Modificado	5,3 (4/76) ^b	13,2 (10/76) ^b	40,8 (31/76) ^b	17,1 (13/76) ^{ab}
Forskolin	8,1 (6/74) ^b	8,1 (6/74) ^b	41,9 (31/74) ^b	13,5 (10/74) ^{ab}
L-carnitina	35,2 (25/71) ^a	49,3 (35/71) ^a	77,5 (55/71) ^a	8,5 (6/71) ^b

^{a,b}Letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa ($P < 0,05$ pelo modelo linear generalizado com distribuição binomial).

As taxas de re-expansão e eclosão em 24 e 48 horas foi maior ($P < 0,05$) no tratamento com LC e a taxa de degenerados foi menor ($P < 0,05$) no tratamento LC em comparação ao controle clássico (8,5% e 24,1% respectivamente).

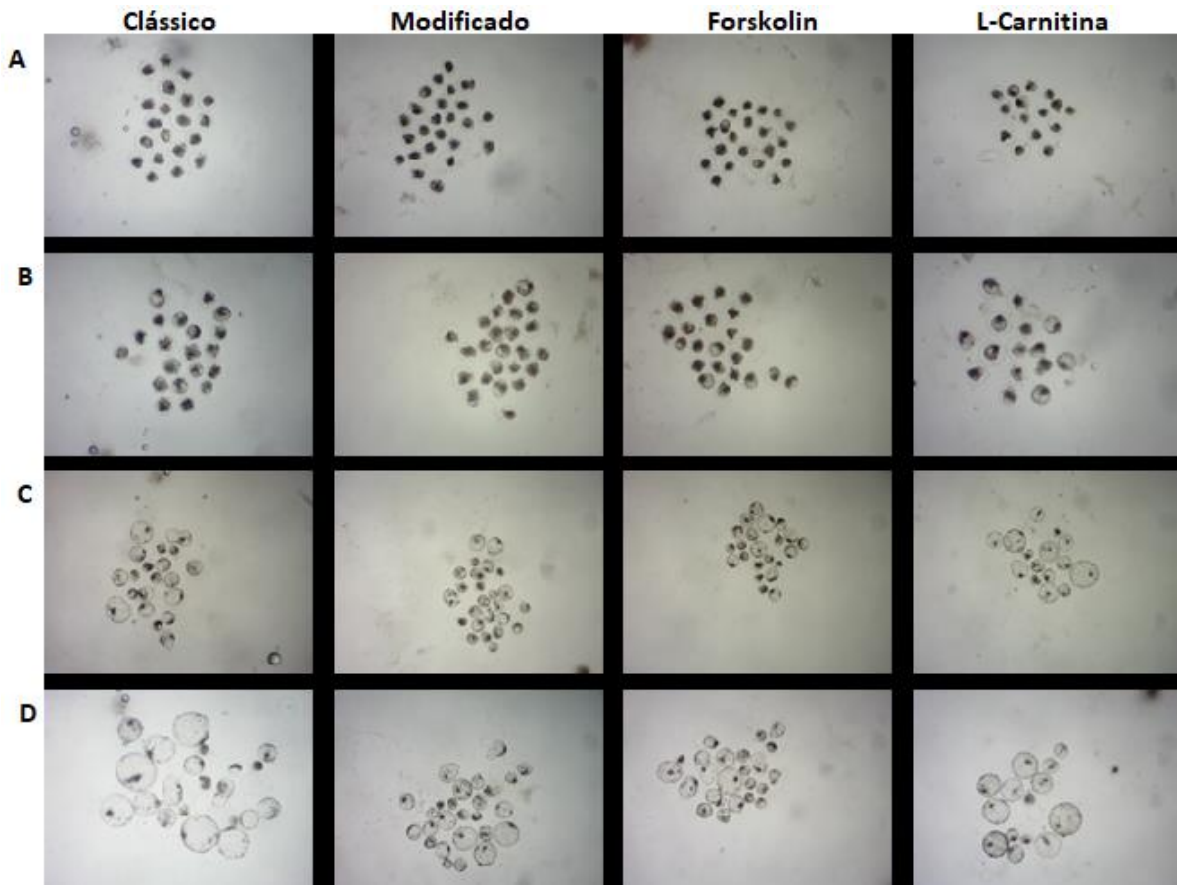


FIGURA 4 – Cinética de desenvolvimento de embriões criopreservados pelo método de congelamento lento e reaquecidos, avaliando re-expansão às 2 horas, eclosão em 24 e 48 horas após reaquecimento.

Linha A- Imediatamente após reaquecimento zero hora

Linha B- Análise de re-expansão com duas horas após o reaquecimento

Linha C - Análise de eclosão com 24 horas após o reaquecimento

Linha D - Análise de eclosão com 48 horas após o reaquecimento

O número total de células (NTC) e o número de células apoptóticas (NCA) em embriões vitrificados e reaquecidos pelo método de congelamento lento são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 – Análise de apoptose celular (TUNEL) em embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem adição de delipidadores (Controle) e cultivados na presença de 10 μ M de Forskolin (D5-D7) e cultivados na presença de L-carnitina + LC no reaquecimento, criopreservados pelo método de congelamento lento, aquecidos e recultivados por 24 horas

Tratamentos	Nº de Blastocistos	NTC	NCA
Controle	25	95,0 ^a	6,9 ^a
Forskolin	25	100,8 ^a	5,4 ^b
L-carnitina	25	102,1 ^a	4,0 ^c

NTC-Número total de células,

NCA-Número de células apoptóticas

^{a,b,c}Letras diferentes na coluna apresentam diferença significativa

($P < 0,001$ pelo modelo linear generalizado com distribuição binomial).

O NTC não diferiu entre os tratamentos ($P > 0,05$). O NCA foi menor ($P < 0,001$) no tratamento LC e diferiu do FORSK e Controle (4,0; 5,4 e 6,9 respectivamente), o NCA no tratamento FORSK foi menor quando comparado ao Controle ($P < 0,001$).

4 DISCUSSÃO

A comparação dos efeitos dos delipidadores L-carnitina e Forskolin até o presente momento não haviam sido testados em conjunto. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a adição dos delipidadores químicos foi efetivo na delipidação parcial dos embriões e que a adição 0,6 mg/mL de L-carnitina promoveu melhorias na produção e na qualidade de embriões bovinos PIV assim como na criotolerância, quando utilizado o método de congelamento lento modificado.

A suplementação do meio de cultivo com delipidadores químicos não alterou a taxa de clivagem em D3. No tratamento FORSK a suplementação ocorreu a partir do dia cinco de cultivo, ou seja, no momento da clivagem os zigotos ainda não tinham sido submetidos aos efeitos do delipidador. Os resultados obtidos com a LC são corroborados pelos obtidos em embriões de camundongo⁴¹, bovino^{18,42,43}, humano⁴⁴, rato⁴⁵, embriões produzidos a partir de ovócitos de cordeiras pré-púberes⁴⁶ e em embriões de suínos ativados partenogeneticamente e clones¹⁵, experimentos nos quais também não houve diferenças durante a clivagem.

A taxa de produção de embriões foi 22,0% maior no tratamento LC em relação ao Controle ($P < 0,05$), com diferença para a qualidade embrionária. O número de embriões de

grau I no tratamento LC foi 30,1% superior comparado ao Controle ($P < 0,05$). Esse aumento de produção também foi observado em outros estudos utilizando a LC com embriões de camundongos^{41,47}, dromedários⁴⁸, suínos⁴⁹, em embriões suínos clone¹⁵, e em bovinos²⁰. Essa diferença de resposta associada à LC em relação ao FORSK e ao Controle é principalmente em relação à qualidade embrionária, e pode ser baseada no mecanismo de ação de droga. O aumento de produção de embriões é associado à LC devido ao incremento da via de β -oxidação, favorecendo um maior aporte de ATP aos ovócitos e embriões^{37,50}, principalmente quando a LC é adicionada ao meio contendo ovócitos de baixo potencial de desenvolvimento⁴³. Além da função metabólica, a L-carnitina possui ação antioxidante e habilidades de eliminação de radicais livres^{38,51,52}.

A suplementação com Forskolin não resultou em aumento na taxa de produção de embriões, que corrobora estudos prévios em bovinos^{34,53}. O Forskolin atua aumentando as concentrações celulares de AMPc⁵⁴ mas não há relatos de elevação de atividade mitocondrial, ou efeito benéfico com relação à produção de antioxidantes quando se utiliza Forskolin. No entanto, quando o Forskolin foi utilizado para maturação *in vitro* de ovócitos suínos, houve aumento na produção, tanto dos embriões clone quanto dos embriões ativados partenogeneticamente³¹. É possível que o Forskolin possa induzir efeitos nas células embrionárias que ainda são desconhecidos³⁵.

O tratamento com delipidadores químicos foi efetivo na redução do conteúdo intracitoplasmático de lipídeos, embriões cultivados em meio suplementado com 10 μ M de Forskolin (D5-D7) e com 0,6mg/mL de L-carnitina no CIV não diferiram entre si ($P > 0,05$), mas apresentaram quantidades 2,2 vezes e 4 vezes (respectivamente) menores em relação ao Controle ($P < 0,001$). Essa diminuição de conteúdo lipídico intracelular no tratamento LC já foi reportada em estudos anteriores em ovócitos suínos³⁸, de camundongos⁵⁵, e embriões bovinos^{18,20,42}, e bubalinos³⁶. O mesmo efeito é atribuído ao Forskolin em embriões bovinos^{30,34}, e ovócitos⁵⁶ e blastocistos suínos²³. No caso da LC essa diminuição de conteúdo lipídico é associado à ativação da via de β -oxidação³⁷ e o Forskolin aumenta as concentrações celulares de AMPc (global) e ativa as lipases endógenas através da via AMPc/proteína quinase, causando lipólise do triacilglicerol (revisado em Honnor)⁵⁴.

Quando os embriões foram vitrificados pelo método de Cryotop a taxa de re-expansão (2 horas) foi maior ($P < 0,05$) no tratamento LC em 28,9% quando comparados ao tratamento FORSK e 23,3% em relação ao Controle. Em estudos prévios utilizando Forskolin não houve elevação na taxa de re-expansão embrionária^{30,35}. No entanto, Meneghel et al.³⁴ observaram aumento da capacidade de re-expansão em embriões bovinos. A maior velocidade

de re-expansão em LC pode ser pelo aumento do fornecimento de energia ⁵⁷ associado ao efeito antioxidante produzido pela LC ⁵², reduzindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) ^{57,58}, sendo que embriões cultivados com LC podem ser mais resistentes ao estresse ambiental e, portanto, requerem menor tempo de recuperação durante o descongelamento ¹⁸.

A taxa de eclosão em 24 e 48 horas dos embriões vitrificados pelo método Cryotop não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$), mas isso pode estar associada às altas taxas de eclosão observadas (LC - 88.8%, FORSK - 86.7 e Controle - 89%), principalmente no Controle. Os resultados do Controle são superiores aqueles relatados previamente comparando os sistemas de vitrificação pelo sistema *open pulled straw* (OPS) ou Cryotop, os quais mostraram eclosão de 43% ¹¹ e 63.3% de eclosão ³⁵, respectivamente. A maior sobrevivência de embriões bovinos ²⁰ e bubalinos ³⁶ criopreservados tratados com LC, assim como maiores taxas de eclodibilidade ⁵⁹ foi previamente relatado. A utilização de Forskolin também aumentou as taxas de formação do blastocisto a partir de ovócitos suínos vitrificados ⁵⁶, aumentou a criotolerância em blastocistos obtidos de ovócitos de fêmeas suínas pré-púberes e vitrificados pelo sistema OPS ³³ e em embriões produzidos *in vivo* e vitrificados em estágio de duas e quatro células ³². No entanto, em bovinos não foi observado aumento na taxa de eclosão ³⁵, apesar de aumentar as taxas de prenhez.

A proposta de modificação do protocolo clássico surgiu a partir de resultados obtidos em testes pilotos realizados com o congelamento lento clássico proposto por Voelkel e Hu 1992²⁶, no qual dois procedimentos precisam ser observados; primeiramente os embriões são transferidos para gotas de meio de manutenção (Holding - solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (D-PBS) suplementada com 0,4% de BSA) e imediatamente depositados em gotas de meio de congelamento (D-PBS, suplementadas com 1,5 M de etilenoglicol (EG) e 5,0 mg / mL de BSA), sem passar pelo processo de aumento gradual de concentração do crioprotetor, também porque é realizado em temperatura ambiente (28-30°C).

Este processo de aumento/diminuição gradual da concentração de crioprotetores tanto para desidratar como para reidratar as células tem a finalidade de evitar o choque osmótico ²⁶, a exemplo do que é preconizado nos protocolos de vitrificação ^{22,27}. O embrião produzido *in vivo* é mais resistente e consegue suportar alterações, mas é amplamente discutido que os embriões PIV apresentam diferenças morfológicas e funcionais quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* ¹⁶.

Uma das alterações que se observa é a população mais escassa de microvilosidades na superfície das células do trofoblasto (a função de microvilosidades na

superfície das células epiteliais é aumentar a área total de absorção), deixando a célula com a capacidade reduzida de transporte e trocas com o meio extracelular⁶⁰, assim como a relação volume / superfície que influencia a penetração de crioprotetores²². Além da maior quantidade de lipídeos intracelulares^{1,7} existe a presença de lipídeos nas membranas (periféricas)⁶¹ que aumentam a temperatura na fase de transição, mas também podem interferir na movimentação de troca (entrada de crioprotetor e saída de água da célula).

A utilização de temperatura controlada (37°C) durante o tempo de desidratação foi testada com a finalidade de manter a temperatura dos embriões estável, uma vez que os embriões PIV são caracterizados pelo aumento da sensibilidade ao resfriamento e ao choque térmico, assim como para melhorar as trocas de substâncias, melhorando a fluidez de membrana, já que as propriedades físico-químicas da membrana apresentam influência direta na fluidez, permeabilidade e comportamento da fase térmica da membrana^{1,62}.

Quando avaliou-se a criotolerância de embriões PIV submetidos ao congelamento lento observou-se que a taxa de re-expansão (2 horas) foi maior ($P < 0,05$) no tratamento LC em 49,7% e 84,9% em relação ao controle clássico e modificado, respectivamente, e 76,9% em relação ao FORSK. Do total de embriões degenerados em LC foi observada uma diminuição ($P < 0,05$) em 64,7% em relação ao Controle Clássico. A diminuição no número de células apoptóticas e o maior potencial de re-expansão e eclosão nos embriões tratados com LC e criopreservados por congelamento lento modificado pode ser associada à produção de antioxidantes, além da diminuição de conteúdo lipídico. O efeito protetor da L-carnitina ocorre preferencialmente em torno das mitocôndrias⁶³; a LC é capaz de estabilizar as membranas mitocondriais e aumentar o fornecimento de energia para a organela, protegendo a célula da apoptose⁵⁷.

A taxa de eclosão observada em 24 horas foi superior ($P < 0,05$) no tratamento LC em 61,4% e 73,2% em relação ao controle clássico e modificado, respectivamente, e 83,5% em relação ao FORSK, e a taxa de eclosão em 48 horas também foi maior para LC ($P < 0,05$) em 47,7% e 47,3% em relação ao controle clássico e modificado, respectivamente, e 45,9% em relação ao FORSK. As taxas de eclosão que não diferiram ($P > 0,05$) para os embriões vitrificados pelo sistema Cryotop, independente do tratamento, foram diferentes quando os embriões foram submetidos ao congelamento lento modificado, sendo que para o tratamento LC as taxas de eclosão foram maiores em relação ao FORSK e Controle, as quais foram semelhantes, a exemplo de resultados previamente relatados para o congelamento lento clássico de embriões bovinos produzidos *in vitro*³⁵. Este aumento no potencial de desenvolvimento e eclosão pode ser devido aos efeitos antioxidantes da LC^{41,51}. A adição de

L-carnitina reduz as EROS^{38,45,64} e aumenta as concentrações de GSH e em embriões^{15,20,38,49,55,65}. Também pode estar associado aos efeitos na zona pelúcida já que embriões tratados com LC apresentam ZP significativamente mais fina⁴¹. Sprícigo et al.⁵⁹ também encontraram maior eclodibilidade para ovócitos tratados com LC antes da vitrificação.

O número total de células não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$), no entanto os embriões tratados com LC e FORSK apresentaram um número de células apoptóticas, 53,7% e 37,0%, respectivamente, menores em relação ao Controle. Apesar do aumento na taxa de produção *in vitro* e incremento na criotolerância dos embriões tratados com LC não foi observado aumento no número total de células, em concordância com outros estudos,^{15,43,55}. Alguns autores, no entanto, observaram o efeito positivo no número de células da MCI e NTC em embriões de camundongos^{37,41,45}. Essa diferença no NTC também não foi encontrada em estudos utilizando Forskolin em embriões suínos produzidos *in vitro*³³, suínos produzidos *in vivo*³², ou em embriões bovinos PIV³⁰.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a suplementação com os delipidadores químicos Forskolin e L-carnitina é efetiva na redução do conteúdo intracitoplasmático de lipídeos. A adição de 0,6mg/mL de L-carnitina ao meio de cultivo eleva a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos, tornando-os mais tolerantes às injúrias causadas pela criopreservação pelo método de congelamento lento.

REFERÊNCIAS

1. Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, et al. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. *Biol Reprod* [Internet]. 2012;87(6):1–11. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.112.102897>
2. Thompson JG, Gardner DK, Anne Pugh P, McMillan WH, Robin Tervit H. Lamb Birth Weight is Affected by Culture System Utilized during in Vitro Pre-Elongation Development of Ovine Embryos. *Biol Reprod* [Internet]. 1995;53(6):1385–91. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/2761892/Lamb>
3. Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Smorag Z. Changes of lipid composition in non-cultured and cultured porcine embryos. *Theriogenology*. 2010;74(2):265–76.

4. Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R. J., Grupen, C. G. and N, B. M. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*. 1995;374:416.
5. Gasparrini B, Attanasio L, De Rosa A, Monaco E, Di Palo R, Campanile G. Cryopreservation of in vitro matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods. *Anim Reprod Sci*. 2007;98(3–4):335–42.
6. 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. *Mol Reprod Dev*. 2002;61(1):57–66.
7. Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Kepczynski M, Smorag Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology*. 2011;75(1):42–54.
8. Reis A, Rooke JA, McCallum GJ, Staines ME, Ewen M, Lomax MA, et al. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2003;15(5–6):275–84.
9. Seidel GE. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006;65(1):228–35.
10. Alexopoulos NI, Maddox-Hyttel P, Tveden-Nyborg P, D’Cruz NT, Tecirlioglu TR, Cooney MA, et al. Developmental disparity between in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21 embryos: Implications for embryonic loss. *Reproduction*. 2008;136(4):433–45.
11. Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 2006;65(8):1551–62.
12. Côté I, Vigneault C, Laflamme I, Laquerre J, Fournier É, Gilbert I, et al. Comprehensive cross production system assessment of the impact of in vitro microenvironment on the expression of messengers and long non-coding RNAs in the bovine blastocyst. *Reproduction*. 2011;142(1):99–112.
13. Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology*. 2008;69(1):17–22.
14. Bousquet D, Twagiramungu N, Morin C, Carboneau G, Durocher J. In Vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*. 1999;51(98):59–70.
15. You J, Lee J, Hyun SH, Lee E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* [Internet]. 2012;78(2):235–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.027>
16. Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*. 2007;68(SUPPL. 1):77–83.

17. Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*. 1993;81–94.
18. Held-Hoelker E, Klein SL, Rings F, Salilew-Wondim D, Zidane M, Neuhoff C, et al. Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*. 2017;96:145–52.
19. Dunning KR, Robker RL. The role of l-carnitine during oocyte in vitro maturation: essential co-factor? *Anim Reprod* [Internet]. 2017;14(3):469–75. Available from: [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p469-475 \(AR988\) SBTE.pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p469-475 (AR988) SBTE.pdf)
20. Takahashi T, A YI, A TS, A MK, A MG, A TN. Supplementation of culture medium with L -carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25:589–99.
21. Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*. 2000;60–61:357–64.
22. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 1998;51(1):53–8.
23. Men H, Agca Y, Riley LK, Critser JK. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. *Theriogenology*. 2006;66(8):2008–16.
24. Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification Properties of Solutions of Ethylene Glycol in Saline Containing PVP, Ficoll, or Dextran. *Cryobiology*. 1997;35(3):219–29.
25. Kasai M, Komi JH, Takakamo a, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* [Internet]. 1990;89(1):91–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2374136>
26. Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 1992;37(1):23–37.
27. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67(1):73–80.
28. Fritz RB, Keltz M, Stein D, Gonzales E, Cruz R. A comparison of slow freeze and vitrification in frozen embryo transfer in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004;425.
29. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23(2):139–55.
30. Paschoal MD, Sudano JM, Schwarz RK, Maziero RR, Guastali DM, Crocomo FL, et al. Cell apoptosis and lipid content of in vitro – produced , vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology* [Internet]. 2017;87:108–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.011>

31. Park B, Lee H, Lee Y, Elahi F, Lee J, Lee ST, et al. Cilostamide and forskolin treatment during pre-IVM improves preimplantation development of cloned embryos by influencing meiotic progression and gap junction communication in pigs. *Theriogenology*. 2016;86(3):757–65.
32. Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Parrilla I, Angel MA, et al. Forskolin improves the cryosurvival of in vivo-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. *Cryobiology* [Internet]. 2013;66(2):144–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.12.009>
33. Cuello C, Gomis J, Almiñana C, Maside C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, et al. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of in vitro-produced pig embryos. *Anim Reprod Sci*. 2013;136(4):296–302.
34. Meneghel M, Dall'Acqua PC, Ambrogi M, Leão BCS, Rocha-Frigoni NAS, Mingoti GZ. Lipid content and cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. *Pesqui Vet Bras*. 2017;37(4):395–400.
35. Sanches B V, Marinho LSR, Filho BDO, Pontes JHF, Basso AC, Meirinhos MLG, et al. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology* [Internet]. 2013;80(4):372–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.026>
36. Verma M, Pandey S, Bhat IA, Mukesh B, Anand J, Chandra V, et al. Impact of L-carnitine on lipid content and post thaw survivability of buffalo embryos produced in vitro. *Cryobiology*. 2018;(March):1–7.
37. Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development1. *Biol Reprod* [Internet]. 2010;83(6):909–18. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.110.084145>
38. Somfai T, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(7):912–20.
39. Bó GA, Mapletoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim Reprod*. 2013;10(3):344–8.
40. R CoreTeam. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018; Available from: <https://www.r-project.org/>.
41. Khanmohammadi N, Movahedin M, Safari M, Sameni HR, Yousefi B, Jafari B, et al. Effect of L-carnitine on in vitro developmental rate, the zona pellucida and hatching of blastocysts and their cell numbers in mouse embryos. *Int J Reprod Biomed (Yazd, Iran)* [Internet]. 2016;14(10):649–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27921089>

42. Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG, Dunning KR. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* [Internet]. 2012;77(8):1632–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.008>
43. Knitlova D, Hulinska P, Jeseta M, Hanzalova K, Kempisty B, Machatkova M. Supplementation of l -carnitine during in vitro maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2017;102:16–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X1730300X>
44. Tanaka T, Satoh M, Hashimoto S, Nakaoka AY, Morimoto Y. L-Carnitine improves the human blastocyst development. *Fertil Steril*. 2016;107.
45. Truong TT, Soh YM, Gardner DK. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1445–54.
46. Reader KL, Cox NR, Stanton JAL, Juengel JL. Effects of acetyl-L-carnitine on lamb oocyte blastocyst rate, ultrastructure, and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology* [Internet]. 2015;83(9):1484–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.028>
47. Zare Z, Masteri Farahani R, Salehi M, Piryaee A, Ghaffari Novin M, Fadaei Fathabadi F, et al. Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. *J Assist Reprod Genet*. 2015;32(4):635–43.
48. Fathi M, El-Shahat KH. L-carnitine enhances oocyte maturation and improves in vitro development of embryos in dromedary camels (*Camelus dromedaries*). *Theriogenology*. 2017;104:18–22.
49. Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, et al. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology*. 2011;76(5):785–93.
50. Eaton S. Control of mitochondrial b -oxidation flux. *Prog Lipid Res*. 2002;41:197–239.
51. Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R, Agarwal A. L-Carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;91(2):589–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.067>
52. Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci*. 2006;78(8):803–11.
53. Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, et al. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*. 2010;74(8):1349–55.
54. Honnor R, Dhillon G, Londos C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1985;260(28):15139–45.

55. Paczkowski M, Schoolcraft WB, Krisher RL. Fatty acid metabolism during maturation affects glucose uptake and is essential to oocyte competence. *Reproduction*. 2014;148(4):429–39.
56. Fu XW, Wu GQ, Li JJ, Hou YP, Zhou G Bin, Lun-Suo, et al. Positive effects of Forskolin (stimulator of lipolysis) treatment on cryosurvival of in vitro matured porcine oocytes. *Theriogenology*. 2011;75(2):268–75.
57. Pillich RT, Scarsella G, Risuleo G. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Exp Cell Res*. 2005;306(1):1–8.
58. Ye J, Li J, Yu Y, Wei Q, Deng W, Yu L. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul Pept*. 2010;161(1–3):58–66.
59. Sprícigo JF, Morató R, Arcarons N, Yeste Ma, Alves Dode M, López-Bejar M, et al. Assessment of the effect of adding L-carnitine and / or resveratrol to maturation medium before vitri fication on in vitro -matured calf oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2017;89:47–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.035>
60. Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev*. 2001;58(2):186–95.
61. Chankitisakul V, Somfai T, Inaba Y, Techakumphu M, Nagai T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology* [Internet]. 2013;79(4):590–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.011>
62. Edidin M. Lipids on the frontier: A century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(5):414–8.
63. Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H, et al. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010;49(4):674–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.025>
64. Mishra A, Reddy IJ, Gupta PSP, Mondal S. Developmental regulation and modulation of apoptotic genes expression in sheep oocytes and embryos cultured in vitro with L-carnitine. *Reprod Domest Anim*. 2016;51(6):1020–9.
65. Yazaki T, Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. L-carnitine improves hydrogen peroxide-induced impairment of nuclear maturation in porcine oocytes. *Anim Sci J*. 2013;84(5):395–402.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÃO FINAIS

O doutorado é mais que uma realização profissional, é a realização de um sonho, muitas vezes escutamos que este é um caminho árduo, mas só quem passa por isso sabe o que realmente custa.

No primeiro ensaio testando o melhor momento para adicionar a L-carnitina ao cultivo fomos surpreendidos pelos resultados, principalmente pela qualidade dos embriões após o tratamento. Isso foi positivo, pois confirmou nossa expectativa e possibilitou a continuação do estudo e um segundo ensaio foi realizado.

O segundo ensaio foi realizado na expectativa de estabelecer um protocolo que permitisse a transferência direta de embriões PIV criopreservados. De fato a utilização dos delipidadores Forskolin e L-carnitina foi efetivo na delipidação, mas a L-carnitina se mostrou mais efetiva principalmente no congelamento lento em palhetas de 0,25 mL. Antes de optar pelo congelamento lento testamos várias metodologias de vitrificação e congelamentos rápidos em palhetas, mas todos com resultados abaixo do que estávamos buscando. Após alguns ensaios com o protocolo clássico foram realizados alguns ajustes na metodologia o qual se mostrou positivo e melhorou as taxas de sobrevivência após criopreservação. A estas modificações denominamos “protocolo de congelamento lento modificado”. O próximo passo necessário neste estudo são análises de expressão gênica que vão ajudar a entender e responder algumas dúvidas que ainda temos, assim como realizar as transferências destes embriões para receptoras e confirmar a efetividade da nossa proposta nas taxas de gestação.

O desenvolvimento de todos os experimentos foi um grande desafio, como toda a pesquisa no Brasil. Mas quando coloco na balança, acredito que foi muito positivo, principalmente pelos resultados obtidos nas pesquisas. Os resultados abrem muitas perspectivas, principalmente na questão da aplicabilidade a campo, e tudo isso em um curto espaço de tempo.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 13 de abril de 2015.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 021/15

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Doutorado

II - Identificação:

- Título do projeto: Adição de delipidadores químicos ao meio de cultivo in vitro de embriões bovinos
- Pesquisador Responsável/ Unidade: Tiago Omar Diesel.
- Pesquisadores Participantes:

Nome/Endereço do Currículo Lattes	Instituição	Formação Básica	Titulação Mais Recente	Função na Pesquisa
Elisa Caroline da Silva Santos / Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/4593102293846365	UFG	Bióloga	Doutorado	Técnica de laboratório de produção in vitro de embriões
Thaís Campos Marques/ Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/8166915751398867	UFG	Médica Veterinária	Mestrado	Técnica de laboratório de produção in vitro de embriões
Thiago Nogueira Marins/ Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6332326881654124	UFG	Médico Veterinário	Especialização	Auxiliar de campo, Clínica Geral
Ariany Rafaella Neto Silva/ Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/1622199526175347	UFG	Médico Veterinário	Mestrado	Técnica de laboratório de produção in vitro de embriões
Maria Lúcia Gambarini Meirinhos/ Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/4440003524956701	UFG	Médica Veterinária	Pós-Doutorado	Orientadora

- Unidade onde será realizado: Universidade Federal de Goiás – UFG / EVZ. Universidade Estadual de Goiás – UEG/Unidade São Luís de Montes Belos.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pro-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3321-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



- Data de apresentação a CEUA: 27 de março de 2015.

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Estabelecer um tratamento específico de preparação do embrião bovino PIV para a criopreservação, possibilitando sua utilização em escala comercial.

IV - Sumário do projeto:

- **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** O projeto é composto por 3 experimentos. O experimento 1 e 2 serão executados utilizando ovários provenientes de abatedouros comerciais certificados com SIM, SIE ou SIF. Como nestes ensaios a quantidade de material necessário é maior, temos a possibilidade de trabalhar sem a necessidade da utilização de animais. Somente após a otimização dos protocolos e tratamentos em material de abatedouro serão aplicados aos ovócitos dos animais *in vivo*, possibilitando assim a diminuição expressiva na quantidade de animais necessários ao experimento. No experimento 3 serão utilizados animais da raça Gir leiteiro por se tratar de tratamentos específicos para esta raça, no entanto serão utilizadas técnicas de obtenção de ovócitos já utilizadas rotineiramente e que não trazem prejuízos ou sofrimento aos animais.
- **Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):** Os animais utilizados são da Universidade Estadual de Goiás – UEG. Serão utilizados 24 bovinos, fêmeas, da Raça Gir Leiteiro (*Bos taurus indicus*), novilhas cíclicas, que serão submetidas a aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). Os ovócitos provenientes destes animais serão distribuídos inteiramente ao acaso nos tratamentos.
- **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Para a avaliação do efeito nas taxas de re-expansão, morte celular, quantificação de lipídeos, taxas de prenhez, nascimentos viáveis e peso ao nascimento em embriões PIV vitrificados após tratamento com o agente delipidador ou não, serão utilizados 24 novilhas que serão mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. marandú, com sal mineral, água *ad libitum* e ração balanceada. Os piquetes possuem áreas de sombreamento natural para o descanso.
- **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** Não se aplica. Este projeto apresenta riscos baixos aos pesquisadores e alunos. Todos os participantes serão treinados e será fornecido EPI's. O manejo com os animais será realizado por funcionários (vaqueiros) da UEG.
- **Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:** O manejo será realizado em curral aplicando técnicas de manejo racional, para os procedimentos os animais serão contidos em tronco de contenção animal, diminuindo assim o risco de acidentes e lesões tanto nos animais como nos participantes do projeto. Para a realização das aspirações foliculares os animais serão presos em tronco de contenção bovino, e após a anti-sepsia local será realizada anestesia epidural baixa com lidocaína 2% (3 a 5 ml). Este procedimento anestesia a porção final do intestino grosso (reto) e o sistema reprodutor da fêmea, ou seja durante o procedimento de OPU o animal não sente qualquer tipo de dor ou desconforto.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Santaambiá (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: com.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



- Método de eutanásia: Não será realizada eutanásia neste experimento.
- Destino do animal: Não se aplica.

V - Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto a documentos: Todos os documentos foram apresentados na forma correta.
- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: Segundo as informações dos autores o manejo será realizado em curral aplicando técnicas de manejo racional, para os procedimentos os animais serão contidos em tronco de contenção animal, diminuindo assim o risco de acidentes e lesões tanto nos animais como nos participantes do projeto. Todos os participantes serão treinados e será fornecido EPT's. Será realizada anestesia epidural baixa com lidocaina 2% (3 a 5 ml), para que o animal não sinta qualquer tipo de dor ou desconforto.


VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

VII - Informação aos pesquisadores:

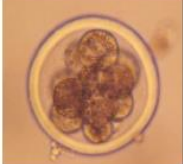
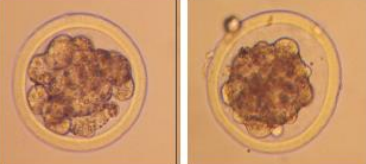
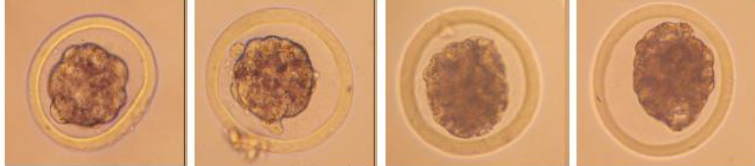
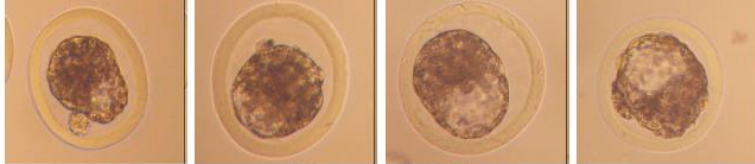
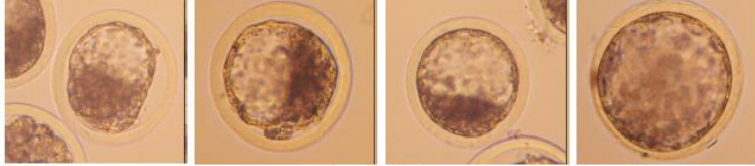
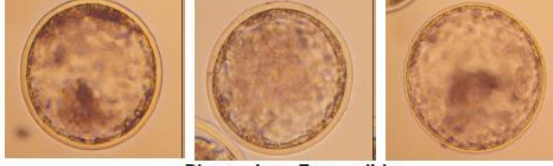
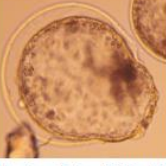
Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o *Relatório Final* baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 12/2016.

VIII - Data da reunião: 13 de abril de 2015.


Dra. Marina Pacheco Miguel
Vice-Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

ANEXO B – CLASSIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* DE ACORDO COM O ESTÁDIO DE DESENVOLVIMENTO

Fonte: Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS)

 <p>8 – 12 Células Código IETS: 2</p>	 <p>Mórula Código IETS: 3</p>	<p>Mórula Fase esperada: dias 5, 5-6, 0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.</p>
 <p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>		<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocelule.</p>
 <p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>		<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocelule. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocelule, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocelule.</p>
 <p>Blastocisto Código IETS: 6</p>		<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocelule aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
 <p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>	 <p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>	<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocelule causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.</p>