UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAMILA GABRIELA PEREIRA VAQUERO

**Influência do Etossulfato de Fenazina na produção *in vitro* de embriões
bovinos, gestação e na expressão gênica da via do metabolismo do
triacilglicerol**

Pirassununga

2015

CAMILA GABRIELA PEREIRA VAQUERO

Influência do Etossulfato de Fenazina na produção *in vitro* de embriões bovinos, gestação e na expressão gênica da via do metabolismo do triacilglicerol

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Felipe Perecin

VERSÃO CORRIGIDA

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

V286i Vaquero, Camila Gabriela Pereira
 Influência do etossulfato de fenazina na produção *in vitro* de embriões bovinos, gestação e na expressão gênica da via do metabolismo do triacilglicerol / Camila Gabriela Pereira Vaquero. -- Pirassununga, 2015.
 62 f.
 Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Medicina Veterinária.
 Área de Concentração: Reprodução animal.
 Orientador: Prof. Dr. Felipe Perecin.

1. Modulador lipídico 2. Criopreservação de embriões
3. Etossulfato de fenazina 4. SREBP1 5. SCD. I. Título.

Dedico este trabalho...

*Ao meu marido, **Mauricio**, pelo amor, amizade, cumplicidade e por ter sido crucial na minha conquista de implantação do projeto na FAYS e em outras conquistas mais!! Por ter grande interesse nos detalhes do projeto e da minha vida... e ser um excelente ouvinte das minhas apresentações, com direito a dúvidas e críticas construtivas no final!!! E por sempre acreditar em mim... Amo você!!*

*À minha mãe, **Rosely**, pelo exemplo de perseverança e coragem com que enfrenta as adversidades e pelo humor que me faz rir até quando não estou muito lá para isso!! Ao **Severino**, pelo exemplo de dedicação e amor a profissão e por ser sempre um pai incrível para mim!! Aos dois que, juntos, contribuíram, e muito, para eu me tornar uma pessoa com princípios morais e éticos dignos.*

*Aos meus sogros, **José Claudio e Cecília**, por se preocuparem não só com esse meu projeto, mas também com outros projetos da minha vida.*

*Às minhas pequenas peludas, **Luna e Zefinha**, por literalmente ficarem sempre ao meu lado em muitas situações da minha vida... Amor incondicional!!!*

Agradecimentos

À **Deus** e suas diversas manifestações, me fazendo admirar sua capacidade de nos abençoar com a natureza cheia de vida que nos cerca, desde a pequena flor até a grandiosidade do oceano.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Felipe Perecin**, pelo apoio e orientação e por ter encarado o desafio de me orientar, mesmo eu trabalhando na Aeronáutica. Agradeço os ensinamentos passados, o diálogo claro e a sinceridade que predominava no nosso relacionamento.

Ao meu antigo chefe, **Coronel Adriano**, pela confiança depositada no meu projeto e pela oportunidade de poder conciliar o projeto no trabalho. E chegando aqui onde cheguei, talvez com a sensação de não ter conseguido alcançar todos os resultados que almejei, lembro sempre dele dizendo: "O bom é inimigo do ótimo" e aí vejo que fiz o meu melhor possível!!

À minha atual chefe, **Capitã Alessandra**, que possibilitou que eu continuasse e concluísse o projeto e também acreditou nessa jornada.

Ao antigo Diretor da FAYS, **Coronel Carlos Fernandez Coelho** e ao atual diretor **Coronel Carlos Alberto de Azevedo** pela confiança e autorização para a implantação de novos projetos.

Às **minhas amigas da faculdade**, por me ensinarem a ser um pouco mais livre!!

À minha amiga colombiana, **Shirley Flores**, que me acompanhou desde o início na USP-São Paulo, compartilhando comigo ansiedades de pós-graduandos, com seu jeito quieto se tornou uma grande amiga.

Aos **funcionários da Bovinocultura de Leite da FAYS**, pelo apoio e dedicação nos trabalhos desenvolvidos do projeto. Equipe como essa não é fácil de encontrar!!!

Ao **Juliano Sangali**, pela paciência e por ter me auxiliado na maioria dos procedimentos do laboratório. À **Maite**, pelo apoio e parceria em diversas etapas do projeto e por sempre se colocar disponível para ajudar. Ao pessoal do **Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da FZEA**. E ao **Júlio Barboza** pelo apoio na fase final do projeto.

À **WTA FIVE, Yeda e Aline**, pelo apoio e auxílio em várias etapas do experimento.

*Coloque seu coração, sua mente e sua alma
até mesmo para os seus atos mais simples.
Esse é o segredo do sucesso.*

Swami Sivananda

RESUMO

VAQUERO, C. G. P. **Influência do Etossulfato de Fenazina na produção *in vitro* de embriões bovinos, gestação e na expressão gênica da via do metabolismo do triacilglicerol.** 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

A produção *in vitro* (PIV) de embriões tem sido utilizada amplamente no Brasil como ferramenta para acelerar o melhoramento genético do rebanho. Quando associada à criopreservação, a PIV permite maior flexibilidade da biotecnologia e possibilita estabelecer um banco de embriões. Há a possibilidade que a alta sensibilidade à criopreservação dos embriões bovinos seja influenciada principalmente pela grande quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos, sendo isso relacionado especialmente às condições de cultivo *in vitro*. O Etossulfato de Fenazina (PES) consiste em um regulador do metabolismo de lipídeos. Através da oxidação de NADPH, estimula a via da pentose-fosfato e assim inibe a síntese de ácidos graxos, podendo levar a efeitos benéficos na criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. O Fator de transcrição denominado proteína de ligação do elemento regulatório de esterol (SREBP-1c), regula preferencialmente a transcrição de genes da síntese de triacilglicerol e fosfolipídios e, a enzima Esteroil Co-A desaturase (SCD1) promove a síntese de ácidos graxos monoinsaturados, conferindo fluidez às membranas celulares. O objetivo desse trabalho foi avaliar a suplementação de diferentes concentrações do etossulfato de fenazina (PES) no meio de cultivo, durante a produção *in vitro* de embriões bovinos, e verificar o efeito do PES na taxa de gestação, buscando melhorar a qualidade do embrião para a criopreservação através da redução do acúmulo de lipídeos. Foram avaliadas as taxas de desenvolvimento inicial de embriões produzidos *in vitro* provenientes de ovários de abatedouro, e as taxas de gestação com o uso de embriões bovinos

produzidos *in vitro* a partir da Aspiração folicular de vacas Holandesas e vitrificados. A análise da expressão de genes relacionados com biossíntese de triacilglicerol, *SCD1* e *SREBP-1c*, teve como finalidade auxiliar nos conhecimentos básicos dos mecanismos de ação do Etossulfato de Fenazina, e foi realizada através de PCR quantitativo em Tempo Real, utilizando pools de cinco embriões para cada grupo. Para a análise estatística, foi realizada ANOVA seguida de teste de médias, e o teste qui-quadrado para as taxas de gestação. Não houve diferença estatística na taxa de clivagem e blastocisto entre o grupo controle e os grupos tratados com 0,2µM; 0,3µM; 0,5µM de PES no meio de cultivo *in vitro*. A taxa de gestação, utilizando-se embriões criopreservados, transferidos para receptoras, não foi alterada pelo uso de PES. A expressão tanto do *SREBP-1c*, quanto da *SCD1* manteve níveis similares na presença ou ausência de PES durante o cultivo *in vitro*. Sendo assim faz-se necessário novos estudos para investigar mais detalhadamente o mecanismo de ação do PES nos genes da via de biossíntese de lipídeos e se é viável sua utilização a campo.

Palavras-chave: modulador lipídico; criopreservação de embriões; Etossulfato de Fenazina; *SREBP1*; *SCD*

ABSTRACT

VAQUERO, C. G. P. **Influence of phenazine ethosulphate on in vitro production of bovine embryos, pregnancy and gene expression of triacylglycerol metabolism pathway.** 2015. 62 f. Dissertation (Master) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The *in vitro* production (IVP) of embryos has been widely used in Brazil as a tool to accelerate the genetic breeding. When combined with cryopreservation, the IVP allows greater flexibility of biotechnology and enable to establish a bank of embryos. There is a possibility that the greater sensitivity to cryopreservation of bovine embryos is influenced mainly by the large amount of intracytoplasmic lipids, and that is especially related to *in vitro* culture conditions. The phenazine ethosulfate (PES) consists of a lipid metabolism regulator. By NADPH oxidation, stimulates the pentose-phosphate pathway and thus inhibits the fatty acids synthesis, leading to beneficial effects on cryopreservation of bovine embryos *in vitro* produced. The transcription factor called sterol regulatory element binding proteins (SREBP-1c), preferably regulates the gene transcription of phospholipids and triacylglycerol synthesis and the stearyl-Co A desaturase (SCD1) enzyme promotes the monounsaturated fatty acids synthesis, giving fluidity to cell membranes. The aim of this study was to evaluate the supplementation of different concentrations of phenazine ethosulfate (PES) in the culture medium during *in vitro* production of bovine embryos, and determine the effect of PES in the pregnancy rate, aiming to improve the the embryo quality to cryopreservation by reducing the lipids accumulation. We evaluated the early development rates of *in vitro* produced embryos and pregnancy rates after inoovulation of vitrified *in vitro* produced embryos derived from the Ovum Pick Up of Holstein cows. Expression

analysis of triacylglycerol biosynthesis related genes, *SCD1* and *SREBP-1c*, had the purpose to increase the basic knowledge on phenazine ethosulfate mechanisms of action, and was performed by Quantitative Real-Time PCR using pools of five embryos for each group. For statistical analysis, was performed ANOVA followed by mean test, and the chi-square test for pregnancy rates. There was no statistical difference in the cleavage rate and blastocyst rate between the control group and the groups treated with 0,2µM; 0,3µM; 0,5µM of PES in the medium *in vitro* culture. The pregnancy rate, using cryopreserved embryos transferred to recipient was not altered by the use of PES. The expression of the *SREBP-1c* as well as *SCD1* remained similar in the presence or absence of the PES during *in vitro* cultivation. Therefore it is necessary further studies to investigate in more details the PES mechanism of action in the genes of lipid biosynthesis pathway and whether it is feasible to use the field.

Key words: lipid modulator; embryos cryopreservation; phenazine ethosulfate; *SREBP1*; *SCD*

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Acil-CoA colesterol aciltransferase
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACTB	Beta-Actina
AG	Ácidos Graxos
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
<i>bHLH-LZ</i>	Basic helix–loop–helix leucine zipper
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
CCO	Complexo <i>cumulus-oócitos</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
DGAT	Acil-CoA diacilglicerol aciltransferase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DNP	2,4-Dinitrofenol
FAS	Ácido Graxo Sintase
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GAPDH	Gliceraldeido 3 fosfato desidrogenase
GLUT8	Transpotador de Glicose
IA	Inseminação artificial
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de embriões
MHz	Mega Hertz
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro

mmHg	Milímetro de mercúrio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Reduzida
NaN ₃	Azida de Sódio
OPS	<i>Open Pull Straw</i>
OPU	<i>Ovum pick-up</i> (Aspiração Folicular)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PES	Etossulfato de Fenazina
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PPAR γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma γ
qPCR	Reação em cadeia de Polimerase em Tempo Real quantitativo
RPL15	Proteína Ribossomal L15
SCD	Estearoil-CoA Desaturase
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutase
SRE	Elemento regulatório de esterol
SREBP	Proteína de Ligação do Elemento Regulatório de Esterol
TAG	Triacilglicerol
TALP	Meio Tyrode-albumina-lactato-piruvato
TCM-199	<i>Meio</i> de cultivo de tecidos 199
TE	Transferência de embriões
UI	Unidade internacional
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	16
2.2	METABOLISMO LIPÍDICO.....	17
2.3	ETOSSULFATO DE FENAZINA.....	20
2.4	REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS.....	24
2.4.1	PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DO ELEMENTO REGULATÓRIO DE ESTEROL (SREBP-1c).....	25
2.4.2	ESTEAROIL COENZIMA A DESATURASE (SCD1).....	28
3	OBJETIVO.....	30
4	HIPÓTESE.....	30
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
5.2	LOCAL DO EXPERIMENTO.....	33
5.3	EXPERIMENTO 1.....	33
5.3.1	Coleta dos ovários.....	33
5.3.2	Maturação <i>in vitro</i> dos complexos cumulus-oócitos (ccos).....	34
5.3.3	Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	34
5.3.4	Cultivo <i>in vitro</i>	35
5.4	EXPERIMENTO 2.....	35
5.4.1	Análise da expressão gênica.....	35
5.5	EXPERIMENTO 3.....	37
5.5.1	Aspiração folicular guiada por ultra-som.....	37
5.5.2	Lavagem, seleção e transporte dos oócitos.....	37
5.5.3	Produção <i>in vitro</i> de embriões	38
5.5.4	Vitrificação dos embriões.....	38
5.5.5	Transferência dos embriões para as receptoras.....	38
5.5.6	Diagnóstico de gestação.....	39
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6	RESULTADOS.....	40

6.1	DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	40
6.2	EXPRESSÃO GÊNICA.....	41
6.3	TAXA DE PRENHEZ.....	43
7	DISCUSSÃO.....	44
8	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

A agropecuária tem papel fundamental no desenvolvimento da economia de um país. A pecuária bovina é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e consequentemente da economia nacional. Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Brasil é o maior exportador de carne bovina e sexto maior produtor de leite do mundo (USDA, 2014), sendo a pecuária leiteira uma das atividades mais tradicionais do meio rural brasileiro. De acordo com os dados mais recentes (Conab, 2014), o rebanho brasileiro em 2013 é de 212,160 milhões de cabeças. Em parte, isso foi possível em decorrência do uso da produção dos animais pelas técnicas *in vitro*, já que se tornou importante ferramenta comercial para o melhoramento genético do rebanho (BATISTA, 2009).

Dados da *Data Retrieval Committee*, da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), registraram valores de mais de 453.471 embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo no ano de 2011, sendo o Brasil responsável por aproximadamente 86% do total de embriões transferidos *in vitro* (IETS, 2012). Desta forma, a produção *in vitro* de embriões bovinos ganha papel de destaque, justificando as inúmeras pesquisas realizadas em busca de sistemas de cultura que propiciem aumento na taxa de produção de embriões de qualidade e que resultem em maior taxa de gestação após transferência para receptoras.

A PIV apresenta diversas vantagens para a biotecnologia da reprodução, acelera o melhoramento genético do rebanho e evita o descarte precoce de fêmeas de alto valor genético (REICHENBACH, 2003). Porém, ainda apresenta muitas anormalidades, como metabolismo alterado, anormalidades morfológicas (blastulação prematura), acúmulo de lipídeos citoplasmáticos, alterações ultra-estruturais e de expressão gênica (RIZOS, 2003; RIZOS; FAIR, 2002). Um dos grandes entraves consiste na reduzida criotolerância, com baixa competência de desenvolvimento após o descongelamento, fato que reflete diretamente no reduzido número de embriões criopreservados no Brasil (3 a 7%) e no mundo (7 a 8%) ao longo dos últimos 10 anos (STROUD; CALLESEN, 2012; STROUD B., 2012; VIANA et al., 2010; VIANA et al., 2012).

Considerando que diversos estudos foram direcionados na tentativa de melhorar as técnicas de criopreservação, porém com resultados limitados, faz-se necessário a busca e o aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo *in vitro*, visando a produção de embriões de melhor

qualidade, com maior capacidade de tolerar a criopreservação (SEIDEL, 2006), e que tragam resultados satisfatórios para a utilização comercial e eficiente desta tecnologia.

A reduzida criotolerância é frequentemente associada ao acúmulo de lipídeos citoplasmáticos decorrente, principalmente, do sistema de cultivo *in vitro*. Uma alternativa para reduzir o acúmulo lipídico consiste no uso de Etossulfato de Fenazina, um regulador metabólico, que promove a oxidação do NADPH, coenzima necessária para a síntese de vários lipídeos, além de estimular a via da pentose-fosfato, induzindo assim a um maior balanço na utilização da glicose (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007b; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006; SUDANO et al., 2011).

Um embrião tem alta reserva de energia endógena, sendo as principais fontes o glicogênio, triacilglicerol e proteínas. O substrato endógeno que mais parece exercer papel no suprimento de energia é o lipídeo, sendo o triacilglicerol o lipídeo de maior quantidade (FERGUSON; LEESE, 1999).

A homeostase de lipídeos em mamíferos é regulada por uma família de fatores de transcrição designada proteína de ligação do elemento regulatório de esterol (SREBP). Os SREBPs regulam a expressão de mais de 30 genes da via de biossíntese de colesterol, ácidos graxos, triacilgliceróis e fosfolipídios, sendo que o SREBP1-c preferencialmente estimula a transcrição de genes requeridos para a síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis, sem influencia na síntese de colesterol (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002).

A Estearoil-CoA Desaturase (SCD) consiste em uma enzima responsável pela conversão de ácidos graxos saturados em ácidos graxos monoinsaturados, através da inserção de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10, afetando, por sua vez, a composição de ácidos graxos das membranas de fosfolipídios e triacilgliceróis, podendo alterar a fluidez das membranas celulares (NTAMBI, 2004).

Dessa forma, esse projeto visa avaliar os efeitos da adição de Etossulfato de Fenazina (PES), um agente modificador do metabolismo de lipídeos, no desenvolvimento embrionário inicial e gestacional de embriões bovinos produzidos *in vitro*, a fim de verificar, inclusive *in vivo*, a sobrevivência desses a criopreservação.

A avaliação da expressão de genes relacionados com a via de biossíntese de triacilglicerol auxiliará nos conhecimentos básicos sobre os possíveis mecanismos de funcionamento do Etossulfato de Fenazina na redução do acúmulo lipídico nos embriões produzidos *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A crescente aplicação da produção *in vitro* de embriões, nos últimos anos, permitiu maiores avanços no aperfeiçoamento de métodos de cultivo e uma elevação nos conhecimentos da morfologia e fisiologia do embrião pré-implantação (GARDNER, 2008). A qualidade de um blastocisto produzido *in vitro* permanece inferior aos blastocistos produzidos *in vivo* (BONI et al., 1999; VIUFF et al., 1999). Prévios trabalhos verificaram que zigotos fertilizados *in vitro*, mas cultivados *in vivo* apresentaram melhor capacidade de desenvolvimento, o que demonstra que o ambiente de cultivo pós-fertilização tem uma grande influência na qualidade do blastocisto, independente da origem do zigoto (DOWNS, 1995; RIZOS; WARD, 2002). Considerando que 80% dos oócitos são fertilizados e sofrem clivagem até o estágio de 2-4 células e que apenas 30-40% dos oócitos chegam ao estágio de blastocisto, o cultivo *in vitro* é um período crítico e de grande relevância para o desenvolvimento embrionário inicial (RIZOS et al., 2008).

Diversos eventos importantes devem ocorrer durante um período de seis dias de cultivo para que haja desenvolvimento do embrião bovino, o que inclui a primeira clivagem, um valioso indicador do subsequente potencial de desenvolvimento do embrião (LONERGAN; KHATIR; PIUMI, 1999); a ativação do genoma embrionário (MEMILI; FIRST, 2000); a compactação da mórula, com o estabelecimento do primeiro contato célula a célula no embrião e a formação do blastocisto. Considerando a relevância dessas transformações, acredita-se que o cultivo pós-fertilização seja o período que tem maior impacto na qualidade do blastocisto (DOWNS, 1995). Dessa forma, torna-se evidente que qualquer modificação no meio de cultura, que venha a afetar algum ou todos esses processos, pode ter grandes efeitos na qualidade do embrião, comprometendo sua competência no desenvolvimento à gestação.

A criopreservação dos embriões obtidos por PIV tem grande impacto na expansão dessa biotecnologia, já que possibilita o estabelecimento de programas de comercialização e transferência de embriões em um momento mais adequado, atendendo à demanda das receptoras, além de possibilitar a comercialização de embriões entre países (SUDANO et al., 2012). Embora existam bons resultados na transferência de embriões a fresco, o sucesso com o uso de embriões vitrificados ainda permanece muito aquém do desejado (BLOCK; BONILLA; HANSEN, 2010;

STEWART et al., 2011). Vários estudos sustentam a hipótese que a alta sensibilidade à criopreservação dos embriões bovinos está relacionada principalmente à grande quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos (LONERGAN et al., 2003; RIZOS, 2003; BATISTA, 2009), mais evidente nos embriões produzidos *in vitro*.

2.2. METABOLISMO LIPÍDICO

Em mamíferos, há duas vias primárias responsáveis pela lipogênese: a via de biossíntese de ácidos graxos, em que o produto primário é o palmitato e, a via de síntese de colesterol, cujo produto é o colesterol. O palmitato gerado pode ser modificado através da ação de diversas enzimas, para produzir diferentes ácidos graxos e triacilgliceróis. A produção de ácidos graxos é efetuada para armazenar o excesso de energia na célula e funciona, por sua vez, como um eficiente meio de recuperação de energia (TERRY MICHAEL SMITH, 2006).

O acúmulo anormal de lipídeos nos embriões de PIV está relacionado especialmente às condições de cultivo *in vitro*, sendo frequentemente associado à inclusão de soro fetal bovino (ABE; HOSHI, 2003; RIZOS, 2003). Porém, há fortes indícios de ser decorrente de um metabolismo anormal, gerando o efeito Crabtree (KOOBS, 1972), que consiste em um maior estímulo da glicólise, com falha na fosforilação oxidativa pela alteração do metabolismo da mitocôndria, o que leva, consequentemente, ao acúmulo lipídico no citoplasma do blastocisto. A adição de soro pode promover a incorporação de ácidos graxos saturados na membrana plasmática, induzindo provavelmente a mudanças na composição da membrana, tornando-a mais rígida, e incapaz de resistir à criopreservação (MUCCI et al., 2006). Embora existam propriedades benéficas do SFB, como fonte de nutrientes e anti-oxidante (CATT, 1994), o seu uso tem sido correlacionado com a síndrome do feto grande (YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998), alteração do metabolismo (GARDNER et al., 1994), alteração na expressão gênica (LAZZARI, 2002) e acúmulo excessivo de lipídeos (ABE et al., 2002; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b).

Há evidências que, pelo menos quatro classes de lipídios afetam a criopreservação de embriões *in vitro* (SUDANO; PASCHOAL; MAZIERO, 2013), contudo, nesses embriões de PIV, as gotas lipídicas são compostas principalmente de triacilglicerol e menos lipídeos das outras classes (MCEVOY et al., 2000; MCKEEGAN; STURMEY, 2011). Essa diferença, aliada

às baixas concentrações dos ácidos graxos poli-insaturados na membrana, pode ser responsável pela baixa tolerância à criopreservação dos produtos derivados desta técnica (POLGE; WILMUT; ROWSON, 1974; USHIJIMA; YAMAKAWA; NAGASHIMA, 1999). Para melhorar o aproveitamento dos embriões PIV é necessário um protocolo de cultivo eficaz, que gere menos lipídeos intracelulares e, assim, melhore a resistência dos embriões à criopreservação (PEREIRA; MARQUES, 2008).

Oócitos imaturos apresentaram grande quantidade de ácidos graxos saturados de cadeia curta, como ácido mirístico, perfil similar a de blastocistos cultivados na ausência de soro. Já no caso de cultivo com soro, os blastocistos demonstraram acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados, como ácido palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico, semelhante ao perfil de ácidos graxos do soro fetal bovino, o que indica uma possível absorção dos lipídeos pelas células dos embriões. Os ácidos graxos saturados encontram-se em maiores concentrações (72%), do que os ácidos mono e poli-insaturados (14,7% e 13,3% respectivamente) (LAPA; MARQUES; BAPTISTA, 2005).

Os lipídeos não servem apenas como fonte de energia para as células, mas exercem um papel vital na construção de propriedades físicas e funcionalidade das membranas biológicas, e têm um potencial efeito na interação célula-célula, proliferação celular e transporte intra e intercelular. Os lipídeos fazem parte da biossíntese da membrana celular e funcionam como substrato para a produção de energia. Porém o acúmulo de lipídeo no embrião está relacionado com uma reduzida qualidade do desenvolvimento embrionário, sendo que embriões cultivados em presença de soro fetal bovino apresentam maior conteúdo de lipídeo intracelular do que embriões produzidos *in vivo* (ROMEK et al., 2011) e do que embriões produzidos na ausência de soro fetal (REIS et al., 2003).

Há diferenças na incorporação de ácidos graxos e na sua habilidade metabólica. A taxa de oxidação de ácidos graxos mantém-se constante no estágio de 1-2 células, mas passa a aumentar até o estágio de blastocisto. Além disso, enquanto o conteúdo de triacilglicerol em embriões cultivados na ausência de soro não se altera ao longo do seu desenvolvimento e esteve em quantidade similar a blastocistos produzidos *in vivo*, um aumento no triacilglicerol foi observado a partir do estágio de 5-8 células em embriões derivados de meio contendo soro fetal bovino (FERGUSON; LEESE, 1999).

Os ácidos graxos derivados dos triacilgliceróis são transportados para a mitocôndria, onde sofrem β -oxidação resultando na síntese de acetil-CoA. A acetil-CoA pode então ser metabolizada via ciclo do ácido tricarboxílico ou através da fosforilação oxidativa, podendo gerar cerca de 106 M ATP, no caso do ácido palmítico, enquanto que a glicose produz cerca de 27-31 M ATP (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012). Os lipídeos são potenciais fontes de energia ao embrião, mas em contrapartida, em embriões produzidos *in vitro*, decorrente de uma alteração no metabolismo energético e na atividade mitocondrial, ou em virtude de uma elevada absorção de lipídeos a partir do soro fetal, há um grande acúmulo de lipídeo citoplasmático, o que prejudica a qualidade do embrião e reduz a sobrevivência do mesmo à criopreservação.

As células de mamíferos podem produzir energia gerando adenosina trifosfato (ATP) basicamente por duas vias metabólicas: conversão da glicose em piruvato, através da glicólise, e oxidação dos substratos piruvato ou oxalacetato, via ciclo de Krebs/fosforilação oxidativa (BEITZ, 1996; NELSON, et al., 2005).

Geralmente, embriões durante o período de desenvolvimento inicial, pré-compactação, são dependentes da fosforilação oxidativa via oxidação do piruvato e aminoácidos para gerar ATP necessário. Entretanto, existe uma mudança na importância da glicólise no período de compactação e formação da blastocle, aumentando a sua contribuição para a produção de ATP (THOMPSON et al., 2000). O aumento na demanda de ATP causa um aumento no consumo de substratos, incluindo oxigênio e piruvato, aminoácidos e glicose (THOMPSON et al., 1996). Porém, em embriões de ruminantes, a maioria da glicose é metabolizada no estágio de blastocisto via glicólise, sendo o lactato o produto final (THOMPSON et al., 2000) e apenas uma pequena quantidade de glicose é oxidada na via da pentose-fosfato para a formação de ribose (THOMPSON et al., 1996). Essa mudança de via metabólica pode ser decorrente da preparação para implantação e da existência temporária de anaerobiose. Como em ruminantes e em suínos o período de implantação é mais longo, essa pode ser mais uma possibilidade para o maior acúmulo lipídico nesses embriões.

Segundo GARDNER et al. (2000), o metabolismo da glicose nos estágios de pré e pós-compactação é anormal em embriões produzidos *in vitro*, apresentando o Efeito Crabtree, definido por BAVISTER (1995) como sendo um excesso da metabolização da glicose, via glicólise, com uma consequente inibição da fosforilação oxidativa. Diferente do observado *in vitro*, os embriões produzidos *in vivo* não apresentam esta alteração do perfil metabólico da

glicose, já que no ambiente fisiológico acredita-se que exista um regulador natural da glicólise, inibindo este processo (BAVISTER, 1995). Nas condições do cultivo *in vitro*, os embriões perdem este regulador natural da glicólise e mostram excesso na atividade da via glicolítica e, na presença de grande tensão de oxigênio, a metabolização da glicose aumenta ainda mais (KHURANA; NIEMANN, 2000).

Embriões que metabolizam uma grande quantidade de glicose podem comprometer a sua capacidade de desenvolvimento (KRISHER; LANE; BAVISTER, 1999). Uma possível explicação é que sob estas condições, uma quantidade muito pequena de glicose é destinada para a via pentose-fosfato, já que esta via tem um importante papel na biossíntese embrionária (WALES; HUNTER, 1990), fornecendo ao embrião a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADPH); que atua na síntese das membranas celulares e possui função antioxidante, reduzindo a glutathione intracelular; e a ribose-5-fosfato, que é requerida para a síntese dos ácidos nucleicos (BEITZ, 1996; NELSON e COX, 2005). A estimulação excessiva da glicólise pode levar ao aumento da concentração dos precursores da síntese de proteínas e lipídeos (RIEGER; MCGOWAN; COX, 2002), favorecendo, não apenas a síntese proteica, mas também a formação de lipídeos citoplasmáticos nos embriões produzidos *in vitro* (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006).

2.3. ETOSSULFATO DE FENAZINA (PES)

Oócitos bovinos fertilizados *in vitro*, mas cultivados *in vivo* tiveram similar criotolerância daqueles produzidos inteiramente *in vivo*. Entretanto, embriões produzidos totalmente *in vitro* apresentaram a mais baixa criotolerância entre eles (ENRIGHT et al., 2000; LONERGAN et al.

, 2003; RIZOS; WARD, 2002). Essa redução da criotolerância parece ser alterada pelas condições de cultivo do embrião (LONERGAN et al., 2003; MTANGO et al., 2003; RIZOS et al., 2001), fato esse relacionado ao excessivo conteúdo lipídico induzido durante o processo *in vitro* (ABE et al., 2002; TOMINAGA et al., 2000).

Os triacilgliceróis representam 88% do total da massa de lipídeos em embriões produzidos *in vitro*, enquanto que, em embriões bovinos *in vivo*, corresponde a apenas 40-50% (CHARPIGNY et al., 2003). Ferguson e Leese (1999) relataram que a concentração de triacilglicerol em embriões *in vivo* permaneceu estável entre o estágio de duas células até

blastocisto, ao passo que em embriões derivados *in vitro*, expostos a 10% de soro fetal bovino, as reservas de triacilgliceróis dobraram a partir do estágio de quatro células.

A influencia dos lipídeos na criopreservação foi observada através do cultivo de embriões na ausência de soro fetal (ABE et al., 2002) e também por meio da remoção microcirúrgica de gotas lipídicas em embriões bovinos (USHIJIMA; YAMAKAWA; NAGASHIMA, 1999) e suínos (USHIJIMA et al., 2004), o que promoveu um aumento na criotolerância e na sobrevivência dos mesmos. Além de influenciar a criotolerância, o acúmulo excessivo de lipídeos citoplasmáticos em embriões bovinos tem sido associado com mitocôndrias anormais ou imaturas, microvilosidades mais curtas e menos numerosas, reduzido desenvolvimento de complexos juncionais, a alteração de genes responsivos ao estresse, prejudicando, dessa forma, a qualidade geral do embrião (ABE, H; MATSUZAKI; HOSHI, 2002; ABE et al., 2002; RIZOS, 2003).

Em prévios experimentos com embriões bovinos foi observado um decréscimo no acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma pela remoção de SFB no meio de cultura, quando comparados com o uso de BSA livre de ácidos graxos (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b) ou com albumina sérica bovina (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006). Essa redução de lipídeos também pode ser alcançada através da utilização de moduladores lipídicos, como é o caso do Etossulfato de Fenazina (PES). Modificadores do metabolismo de lipídeos correspondem a substâncias capazes de alterar ou reduzir o conteúdo lipídico nas células, podendo ser utilizadas para melhorar o desenvolvimento embrionário.

Em qualquer célula de mamíferos, o substrato energético é prontamente metabolizado pela via glicolítica, no citoplasma, seguido pelo ciclo do ácido tricarboxílico e fosforilação oxidativa na mitocôndria, para a produção de ATP. Quando há excesso de energia na célula, há um bloqueio da atividade do ciclo de Krebs e o acetil-CoA é direcionado para síntese de ácidos graxos e, conseqüentemente, triacilgliceróis, que consistem em uma forma de estoque de energia (NELSON, et al., 2005).

O Etossulfato de Fenazina (PES) é responsável pela oxidação do NADPH a NADP^+ , o que leva, por sua vez, a conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato, estimulando a síntese de ribose e ácidos nucleicos (DOWNS; HUMPHERSON; LEESE, 1998). Quando utilizado no meio de cultura de embriões bovinos, o PES aumenta o metabolismo da glicose, favorecendo o fluxo de glicose para a via da pentose-fosfato, o que promove uma redução no

acúmulo lipídico citoplasmático (BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006; SUDANO et al., 2011).

A biossíntese dos ácidos graxos envolve uma série de reações por meio da atividade da enzima Ácido Graxo Sintase e tem a necessidade da utilização de 2 moléculas de NADPH como agente redutor (NELSON, et al., 2005). Sendo assim, o PES, além de estimular a via da pentose-fosfato, com possível desvio do metabolismo da glicose da via glicolítica, tem como efeito adicional, a inibição da via de síntese dos ácidos graxos, podendo então promover uma redução de precursores da síntese de triacilgliceróis, inibindo acúmulo lipídico na célula (figura 1).

Figura 1: Metabolismo energético e mecanismos de ação do Etossulfato de Fenazina no embrião pré-implantação. Fonte: SUDANO et al. (2013) adaptado de BARCELÓ-FIMBRES; SEIDEL (2007a).

O tratamento com PES pode aumentar as taxas de sobrevivência após a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* em decorrência do menor acúmulo de lipídeos. No experimento de BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b, a utilização de PES no meio de cultivo levou a maiores taxas de reexpansão dos blastocistos após 24 e 48 horas de descongelamento, em comparação com o grupo controle e o grupo tratado com SFB, entretanto a taxa de produção de embriões não foi alterada na presença de PES. A adição de PES resultou em maior qualidade dos embriões e influenciou na luminosidade dos blastocistos, tornando-os mais claros, o que está relacionado com a redução do conteúdo lipídico dos mesmos.

Segundo Sudano et al.(2011), a redução de SFB para 2,5% no meio de cultura *in vitro*, e a adição de PES a partir do 4º dia de cultivo reduziu o conteúdo lipídico, gotas de tamanho médio e grande e facilitou a sobrevivência do embrião depois da vitrificação, sem alterar a qualidade do desenvolvimento embrionário, porém somente com a adição de PES a partir do D2,5 foi possível observar uma diminuição de gotas lipídicas pequenas. Mesmo alcançando resultados favoráveis na redução do conteúdo lipídico com alteração da concentração de SFB e uso de regulador de lipídeos, o PES, embriões *in vivo* ainda apresentam menor quantidade de lipídeos citoplasmáticos (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006; SUDANO et al., 2011).

Embriões coletados *in vivo* apresentaram menos lipídeos citoplasmáticos do que embriões produzidos *in vitro*, sendo que no primeiro as gotas lipídicas se acumularam em maior parte na massa celular interna (MCI), enquanto que no último se distribuíram ao acaso pela MCI e células do trofoblasto (SUDANO et al., 2012).

Um substrato endógeno de energia está presente em qualquer célula durante o desenvolvimento. Em embriões, a fonte energética de maior evidência corresponde ao triacilglicerol. Segundo De La Torre-Sanchez et al.(2006), há mais grânulos lipídicos pequenos em embriões produzidos *in vivo*, do que embriões cultivados *in vitro* usando diferentes tratamentos com moduladores de lipídeos, como o 2,4-Dinitrofenol (DNP), Azida de Sódio (NaN₃) e PES. Já os grânulos lipídicos de tamanho mediano foram encontrados em maior quantidade nos embriões produzidos *in vitro*, e o tratamento com PES, quando comparado com outros moduladores, foi o que mais se aproximou da característica dos embriões *in vivo*, fazendo desse tratamento uma técnica promissora para melhorar a produção *in vitro* de embriões.

2.4. REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS

Os triacilgliceróis são produzidos através da combinação de ácidos graxos com glicerol-3-fosfato. A síntese de ácidos graxos ocorre em duas etapas: a primeira consiste na carboxilação do acetil-CoA em Malonil-CoA, pela Acetil-CoA Carboxilase (ACC) e, a segunda trata-se da adição de 6 moléculas de malonil-CoA através da ação de um complexo enzimático Ácido Graxo Sintase (FAS). Ambas as enzimas são reguladas pelo SREBP-1. O palmitato, produto mais comum da síntese de ácidos graxos, serve como precursor de ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados. A biossíntese de ácidos graxos insaturados ocorre com a adição de uma dupla ligação, pela ação da Estearoil-CoA Desaturase (SCD1), que, por sua vez, também é regulada pela SREBP-1 (Figura 2) (RAWSON, 2003).

Figura 2: Genes envolvidos com a regulação da via do metabolismo de ácido graxo e triacilglicerol. O SREBP-1c, considerado o regulador mestre da biossíntese de lipídeos, preferencialmente ativa genes da via do metabolismo de triacilglicerol. O gene da Estearoil CoA Desaturase atua na relação de ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Fonte adaptado de HORTON; GOLDSTEIN; BROWN (2002).

2.4.1. PROTEÍNA DE LIGAÇÃO DO ELEMENTO DE REGULATÓRIO DE ESTEROL (SREBP-1c)

A regulação dos processos de biossíntese de colesterol e ácidos graxos (AG) é controlada por uma família de fatores de transcrição designadas proteínas de ligação do elemento regulatório de esterol (SREBPs). Os SREBPs são responsáveis por ativar a expressão de mais de 30 genes relacionados com a síntese e influxo de colesterol, AGs, triacilgliceróis e fosfolipídios, bem como o cofator NADPH, necessário para a síntese dessas moléculas, sendo, dessa forma, considerados os principais reguladores de lipogênese e da síntese de colesterol (EBERLÉ et al., 2004).

No genoma de mamíferos, três membros da família SREBP têm sido descrito: SREBP-1a e 1c, derivados de um único gene (*SREBF-1*) localizado no cromossoma humano 17p11.2 e que diferem entre si por apresentarem locais alternativos de início da transcrição, gerando formas variadas do exon1, designados 1a e 1c, e SREBP-2 codificado a partir de um gene separado (*SREBF-2*), localizado no cromossoma humano 22q13 (BROWN; GOLDSTEIN, 1997).

Os SREBPs pertencem a uma família de fatores de transcrição “basic helix–loop–helix leucine zipper” (bHLH-LZ), porém são sintetizados como precursores inativos contendo 1150 aminoácidos (aa) ligados à membrana do retículo endoplasmático. Cada precursor do SREBP é organizado em três domínios: um domínio de terminal- NH₂ de aproximadamente 480aa e que contém o domínio de transativação. Contém a região bHLH-LZ para ligação e dimerização do DNA e é rica em serina e prolina; dois segmentos abrangendo a membrana hidrofóbica, interrompidos por uma alça curta com cerca de 30aa, que se projeta para dentro do lúmen do retículo endoplasmático; e um segmento de terminal- COOH com 590 aminoácidos que exerce a função regulatória essencial (LEE et al., 2003; NAGOSHI; YONEDA, 2001; NAGOSHI, E et al., 1999).

Após a ativação, o precursor de cada SREBP, ancorado no retículo endoplasmático, deve ser liberado para alcançar o núcleo e atuar como fator de transcrição. Sendo assim, o precursor de SREBP é encaminhado para o complexo de Golgi, escoltado pela proteína de ativação da clivagem (SCAP), onde sofre um processo de clivagem sequencial em dois passos, sob ação de duas proteases (S1P e S2P), liberando por fim o domínio bHLH-LZ do terminal– NH₂, que passa a ser denominado de SREBP nuclear (nSREBP). O domínio bHLH-LZ contém um sinal específico de localização nuclear, que se liga diretamente a simportinas, um tipo de proteína que

movimenta outras moléculas de proteínas para dentro do núcleo celular, permitindo o transporte do nSREBPs para o interior núcleo. Uma vez translocado para o núcleo, nSREBPs promove a expressão de muitos genes envolvidos na síntese de colesterol e lipídeos, através da ligação com o elemento regulatório de esterol (SRE) nas regiões promotoras (figura 3) (GOLDSTEIN; RAWSON; BROWN, 2002; LEE et al., 2003; NAGOSHI; YONEDA, 2001; NAGOSHI, E et al., 1999).

Figura 3: Mecanismo de ativação do SREBP, através da liberação proteolítica mediada por esterol. Fonte: GOLDSTEIN; RAWSON; BROWN (2002).

Diversos estudos têm evidenciado que as isoformas apresentam funções específicas. Enquanto a superexpressão de *SREBP-1a* marcadamente aumenta a expressão de genes relacionados com a síntese de colesterol e ácidos graxos, causando consequentemente um acúmulo de colesterol e triacilglicerol (HORTON; SHIMOMURA; et al., 2003; SHIMANO et al., 1996), a isoforma *SREBP-1c* demonstra indução seletiva para genes lipogênicos, sem efeito nos genes da síntese de colesterol (SHIMANO et al., 1997). A superexpressão de *SREBP-2* promove uma indução preferencial de genes envolvidos com a biossíntese de colesterol, embora uma moderada indução de genes envolvidos com a síntese de ácidos graxos também seja

observada (HORTON et al., 1998; HORTON; SHAH; et al., 2003). Por fim, SREBP-1c e SREBP-2 ativam três genes necessários para gerar NADPH, que é consumido em várias fases nestas vias de biossíntese de lipídeos.

Os fatores de transcrição SREBPs podem ser regulados através de transcrição, da clivagem proteolítica de precursores de SREBP ou por meio de modificação pós-traducional de *nSREBPs*. Enquanto o SREBP-1a e SREBP-2 parecem ser principalmente regulados através da clivagem do precursor, as evidências sugerem que SREBP-1c seja regulado principalmente por transcrição (EBERLÉ et al., 2004).

As primeiras evidências sobre a regulação da transcrição do *SREBP-1c* deu-se com a realização de um sistema de jejum /realimentação em roedores, que mostrou um aumento marcante na expressão de *SREBP-1c* quando os animais foram realimentados com dietas contendo alto teor de carboidrato, porém, sem nenhum efeito nas outras isoformas do *SREBP* (HORTON, 1998; KIM; SARRAF; WRIGHT, 1998). Quando induzido pela insulina, o SREBP-1c leva a um paralelo aumento de precursores ligados ao retículo endoplasmático e da forma nuclear do fator de transcrição (AZZOUT-MARNICHE; BECARD, 2000). Porém, estudos *in vivo* têm demonstrado que a depleção de esterol não regula a clivagem de SREBP-1c, e sim mudanças no status nutricional (SHENG; OTANI, 1995).

Camundongos obesos, com fígado gorduroso, que apresentam resistência à insulina ou hiperinsulinêmicos, possuem níveis elevados de SREBP-1c e camundongos transgênicos para a super expressão do *SREBP-1c* produzem um fígado gorduroso, enriquecido com triacilgliceróis, sem qualquer aumento nos níveis de colesterol (SHIMANO et al., 1997). Portanto, a elevada quantidade de *nSREBP-1c* aumenta a expressão de genes lipogênicos, aumenta a síntese dos ácidos graxos, e acelera o acúmulo de triacilgliceróis (SHIMOMURA; BASHMAKOV; HORTON, 1999; SHIMOMURA et al., 2000).

A supressão seletiva da isoforma *SREBP-1c* leva a uma redução da expressão basal de mRNAs que codificam enzimas de síntese dos ácidos graxos e TGs (LIANG et al., 2002), confirmando assim a importância desta isoforma no controle de genes lipogênicos. Estudos *in vitro* observaram que há uma inibição da clivagem proteolítica de SREBPs na presença de esterol ou PUFA's e em razão da baixa disponibilidade de SREBP para ativar a transcrição de genes relacionados ao SRE (elemento regulatório de esterol), a expressão de promotores com SRE também se encontra reduzida (TABOR et al., 1998; WORGALL et al., 1998).

Pesquisas indicam que a supressão mediada por PUFA do gene *SREBP* ocorre em um nível pós-transcricional, possivelmente, relacionado à estabilidade do mRNA (XU et al., 1999), sendo que os PUFAs, coordenadamente, podem inibir a transcrição de genes hepáticos através da supressão da expressão de *SREBP-1*, bem como a sua maturação.

2.4.2. ESTEAROIL-COA DESATURASE (SCD1)

A Estearoil Co-A desaturase (SCD) consiste em uma enzima microssomal relacionada com a síntese de novo de ácidos graxos monoinsaturados a partir de ácidos graxos saturados, sendo que o balanço desses ácidos graxos influencia na regulação do crescimento e diferenciação celular através de efeitos nas propriedades físicas das membranas. A SCD, utilizando o NADH como equivalente redutor, promove uma reação oxidativa com a introdução de uma dupla ligação na configuração *cis* no grupo Acyl CoA, entre os carbonos 9 e 10. Os produtos, principalmente oleato e palmitoleato, são os substratos para a síntese de triacilgliceróis, ésters de colesterol e fosfolipídeos (NTAMBI, 1995).

Até o presente momento, quatro isoformas do SCD (SCD1-SCD4) têm sido identificadas em roedores, sendo que todos os genes se localizam próximo ao cromossomo 19 (MIYAZAKI et al., 2003; NTAMBI et al., 1988; ZHENG et al., 2001). A isoforma SCD1, com 85% de identidade entre as espécies, é expressa predominantemente em tecidos lipogênicos, como fígado e tecido adiposo e, é intensamente induzida em ambos os tecidos em resposta a uma alimentação com dieta rica em carboidratos (NTAMBI; MIYAZAKI, 2003).

A expressão de *SCD1* é positivamente regulada pelo receptor X hepático (LXR), importante regulador da homeostase de colesterol e ácidos graxos, bem como é mediada pela ativação da transcrição do *SREBP-1c* (KIM, 2002; LIANG et al., 2002). Dieta rica em carboidratos induz um aumento de SCD1 hepático através de mecanismos dependentes e independentes do *SREBP-1c* (MIYAZAKI; KIM; NTAMBI, 2001). Por outro lado, o controle celular da atividade da SCD1 também ocorre em nível proteico, tendo uma meia-vida normal variando entre 2 a 4 horas. O terminal-N, domínio transmembrana orientado para o citosol, contém a sequência responsável pela rápida degradação da SCD1 através de um mecanismo que envolve um sistema dependente ubiquitina proteossoma (MZIAUT; KORZA; OZOLS, 2000; KATO; SAKAKI; MIHARA, 2006).

Em experimentos anteriores, camundongos com deficiência de SCD1 apresentaram um aumento do gasto de energia e redução da deposição de gordura corporal devido ao aumento da oxidação de ácidos graxos, além de demonstrarem resistência à obesidade induzida por dieta, indicando assim uma supressão da síntese de novo de ácidos graxos (MIYAZAKI et al., 2004; NTAMBI et al., 2002).

Deficiência de SCD1 leva a uma redução do conteúdo hepático de colesterol e triacilgliceróis, porém a suplementação com dieta lipogênica pode normalizar os níveis de colesterol, enquanto que o conteúdo de triacilglicerol não retorna aos níveis encontrados em camundongos selvagens (MIYAZAKI et al., 2000). Essa situação ainda atenua o quadro de esteatose hepática induzida por jejum em camundongos deficientes em receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa, proteína nuclear que funciona como um fator de transcrição que regula genes relacionados com o metabolismo lipídico (MIYAZAKI et al., 2004). A ação anti-esteatótica da deficiência do SCD1 também envolve efeitos transcripcionais, como inibição do *SREBP-1c*, o que, conseqüentemente, leva a redução da expressão de outras enzimas lipogênicas como *ACC*, *FAS* (NTAMBI et al., 2002).

A expressão de *SCD* afeta a composição dos lipídeos na célula e na membrana, resultando em uma mudança na fluidez da membrana, no metabolismo lipídico e obesidade. Portanto, a regulação da enzima Estearoil-CoA Desaturase tem uma importância considerável para a fisiologia celular, sendo que a alta atividade dessa enzima tem sido identificada em uma série de doenças, tal como, diabetes, arteroesclerose e obesidade (MIYAZAKI; NTAMBI, 2003).

A Estearoil Co-A desaturase (SCD) é considerada uma enzima lipogênica não apenas por seu papel essencial na biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados, mas também por sua característica de regulação pela dieta.

Enzimas envolvidas na homeostase de lipídeos são reguladas ao nível transcripcional e pós-transcripcional, dessa forma um intenso aumento na atividade da SCD1 em sistemas de jejum e realimentação com dieta livre de gordura e rica em carboidrato, apresenta correlação positiva com a abundância de mRNA de *SCD1* total no fígado (THIEDE; OZOLS; STRITTMATTER, 1986). Os fatores de transcrição envolvidos nessa resposta consistem nos SREBPs. A deleção do gene *SREBP-1*, na fase de realimentação, marcadamente suprime a expressão de toda a classe de enzimas lipogênicas, incluindo a *SCD1* (SHIMANO et al., 1997).

Em camundongos *SCD-1*-knockout (camundongo asebia), a análise de lipídeos hepáticos indicou uma deficiência de ester de colesterol e triacilgliceróis, mesmo na presença de atividade normal das enzimas envolvidas com a esterificação de colesterol e síntese de triacilgliceróis. A alimentação utilizando dieta rica em trioleína e tripalmitoleína falharam em reestabelecer os níveis de oleato e palmitato nos trigliceróis (MIYAZAKI et al., 2000).

3. OBJETIVOS

- 3.1. Avaliar a taxa de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio de cultivo suplementado com três diferentes concentrações de Etossulfato de Fenazina (experimento 1).
- 3.2. Analisar a expressão de genes relacionados com biossíntese de triacilglicerol, a Esteroil Co-A desaturase (*SCD1*) e a Proteína de ligação do elemento regulatório de esterol (*SREBP-1c*) em embriões bovinos produzidos *in vitro*, expostos ou não ao PES (experimento 2).
- 3.3. Avaliar *in vivo* o efeito do PES na competência embrionária à criopreservação através da avaliação da taxa de gestação de embriões produzidos *in vitro* e posteriormente vitrificados, provenientes da aspiração folicular de vacas holandesas (Experimento 3).

4. HIPÓTESE

O uso de Etossulfato de Fenazina no cultivo *in vitro* de embriões, ao atuar como um modificador do metabolismo do triacilglicerol, promove melhoria na qualidade do embrião através da redução do acúmulo lipídico citoplasmático, tornando-o mais tolerante à criopreservação e, assim, eleva a taxa de prenhez após a transferência dos embriões.

O Etossulfato de Fenazina altera a expressão de genes da via de biossíntese de triacilglicerol, já que funciona como um modulador de lipídeos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Delineamento experimental

Legenda: Experimentos 1 e 2

Os ovários foram coletados de abatedouro e transportados para o laboratório em solução fisiológica aquecida a 27°C. No laboratório, os folículos de 2 a 8 mm foram aspirados com auxílio de uma agulha (40x12) acoplada a seringa de 10 mL. Os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) foram classificados em relação à qualidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus*, de acordo com Viana et al.(2004). Os CCOs de graus I e II foram selecionados para maturação *in vitro*. Foi verificada a taxa de clivagem (porcentagem dos embriões clivados em relação ao total dos possíveis zigotos colocados no cultivo) e após 60 horas de cultivo *in vitro* (D2,5), os embriões clivados foram divididos em quatro tratamentos: grupo controle; grupo com 0, 2µM de PES; grupo com 0, 3µM de PES e grupo 0, 5µM de PES. No sétimo e no oitavo dia de cultivo (D7 e D8) foi avaliada a taxa de blastocisto (experimento 1). Os blastocistos de graus I e II foram armazenados em eppendorfs contendo um pool de cinco embriões e conservados em freezer a -80°C para a posterior extração do mRNA e verificação da expressão gênica de genes relacionados com a biossíntese de triacilglicerol (experimento 2). O experimento 1 foi realizado em cinco replicatas e o experimento 2 em sete replicatas.

Legenda: Experimento 3

Foram realizadas cinco rotinas de aspiração folicular de vacas holandesas. Os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) foram classificados em relação à qualidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus*, de acordo com Viana et al.(2004). Os CCOs de graus I e II foram selecionados para maturação *in vitro* e fecundação *in vitro*. Com 60 horas de cultivo (D2,5) foi verificada a taxa de clivagem e os embriões clivados foram divididos em dois tratamentos: grupo controle; e grupo com 0, 3µM de PES. No sétimo dia de cultivo (D7) foi avaliada a taxa de blastocisto. Os blastocistos de graus I e II foram vitrificados e estocados em nitrogênio líquido (-196°C) por pelo menos duas semanas, para então serem transferidos para as receptoras, possibilitando a posterior análise da taxa de prenhes aos 30 dias e aos 60 dias de gestação.

5.2. Local do experimento

O experimento foi realizado no laboratório WTA FIVE, localizado em Cravinhos-SP e no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Campus de Pirassununga. A aspiração folicular das vacas holandesas e a transferência de embriões foram realizadas na Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga – FAYS (Protocolo do comitê de ética nº 14.1.863.74.8).

5.3. Experimento 1

5.3.1. Coleta dos ovários

Os ovários foram coletados em abatedouro da região de Pirassununga e transportados para o laboratório em solução fisiológica aquecida a 27°C, por um período máximo de quatro horas após o abate. No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica e os folículos de 2 a 8 mm foram aspirados com auxílio de agulha (40x12) acoplada a uma seringa de 10 mL. Após a sedimentação das estruturas, os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram selecionados e classificados em relação à qualidade do citoplasma e o número de camadas de células do cumulus (Tabela 1) utilizando-se uma lupa estéreo microscópica, de acordo com Viana et al., (2004). Para a maturação *in vitro* foram selecionados somente os CCOs de graus I e II que, em seguida, foram lavados três vezes em meio TALP-Hepes (Gibco, E.U.A.), uma vez em TCM-199 (Gibco, E.U.A.) para, assim, serem colocados em meio de maturação.

Tabela 1: Classificação dos oócitos com relação ao número de camadas e o grau de compactação das células do *cumulus*, morfologia, homogeneidade e integridade do citoplasma, segundo Viana et al., (2004).

Grau I: Complexo cumulus-oócitos compacto, mais de três camadas de células e citoplasma homogêneo.
Grau II: Complexo cumulus-oócitos compacto com número de camadas de células do cumulus igual ou menor a três, e citoplasma levemente heterogêneo.
Parcialmente desnudo: oócitos apresentando completa remoção das células do cumulus-oócitos em até 1/3 da superfície da zona pelúcida.
Desnudo e/ou degenerado: oócitos sem células do cumulus-oócitos cobrindo a maior parte da zona pelúcida e/ou vacuolização do citoplasma.
Cumulus-oócitos expandido: Complexo cumulus-oócitos apresentando expansão das células do cumulus.

5.3.2. Maturação *in vitro* dos complexos cumulus-oócitos (CCOs)

A maturação *in vitro* (MIV) dos CCOs foi realizada em meio TCM 199 (Gibco, E.U.A.) tamponado com bicarbonato, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,5 µg/mL de FSH, 5µg/mL de LH, 22µg/mL de piruvato e 50µg/mL de gentamicina. Os oócitos foram maturados por 24 horas em gotas de 100µL de meio de maturação cobertas com óleo mineral, em estufa incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade.

5.3.3. Fecundação *in vitro* dos oócitos

Os CCOs foram submetidos à fecundação *in vitro*, utilizando sêmen de touro da raça Nelore previamente testada para PIV. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 36°C, durante 30 segundos e seu conteúdo foi centrifugado em gradiente de Percoll, usando 2 mL de Percoll 45% e 2 mL de Percoll de 90% para a retirada do plasma seminal e do diluente e para a obtenção dos espermatozoides viáveis. A fecundação (considerada como dia 0,

D0) foi realizada em gota de 100µL de meio TALP (PARRISH et al., 1995) suplementado com 50µg/mL gentamicina, 2,7µg/mL penicilamina, 1µg/mL hipotaurina, 0,3µg/mL epinefrina, 5µg/mL albumina sérica bovina, 22µg/mL piruvato e 10µg/mL heparina. A concentração espermática foi de 1×10^6 espermatozoides/mL e as gotas, contendo 20-25 oócitos e espermatozoides, foram cobertas com óleo mineral e incubadas com 5% de CO₂ em ar atmosférico a 38,5 °C, por um período de aproximadamente 18-22 horas.

5.3.4. Cultivo *in vitro*

Os presumíveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para a retirada das células do *cumulus* e foram cultivados inicialmente em gotas de 100µL de meio CR4 com 2,5% SFB + 0,5% de albumina sérica bovina (BSA), sob óleo mineral.

A taxa de clivagem foi avaliada após 60 horas de cultivo (D2,5) e os embriões clivados foram transferidos para uma placa de quatro poços, sem óleo mineral, com meio CR4 e com 2,5% de soro fetal bovino, divididos aleatoriamente em quatro tratamentos: grupo controle; grupo com 0,2µM de PES; grupo com 0,3µM de PES e grupo com 0,5µM de PES. Nos dias 7 e 8 do cultivo foi analisado o desenvolvimento embrionário e no D10, a taxa de eclosão de blastocisto.

5.4. Experimento 2:

5.4.1. Análise da expressão gênica

Os embriões produzidos no experimento um foram lavados em meio Dulbecco (PBS) e colocados em eppendorfs com o mínimo de meio possível, em pools de 5 embriões e, então, foram armazenados em freezer a -80°C para posterior análise da expressão gênica.

Os genes utilizados no experimento estão relacionados com biossíntese de triacilglicerol, o Esteroil Co-A desaturase (*SCD1*), que atua principalmente na relação de ácidos graxos monoinsaturados e saturados, podendo afetar a composição dos lipídeos na célula e na membrana, e, com isso, melhorar os resultados de criopreservação de embriões, e a Proteína ligadora do elemento regulatório de esterol (*SREBP-1c*), que consiste em um fator de transcrição responsável por modular a atividade de diversos genes exclusivamente da via de biossíntese de

triacilglicerol. Para avaliar a expressão dos genes, realizou-se o PCR em Tempo Real quantitativo (qPCR), utilizando como controles endógenos os genes da Beta-Actina (*ACTB*), Proteína Ribossomal L15 (*RPL15*) e o gene gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (*GAPDH*). As sequências dos nucleotídeos iniciadores foram desenhadas baseadas em sequências do GenBank (Tabela 2).

Tabela 2: Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para qPCR.

Genes*	Sequência: 5' - 3'	Número do GenBank**
ACTB	F-GGCACCCAGCACAATGAAGA	NM_173979.3
	R-GCCAATCCACACGGAGTACTT	
RPL15	F-CAAACGCCCAGTTCCTAAGG	NM_001077866.1
	R-TCGAGCAAACCTTGAGCTGGTT	
GAPDH	F-CCACTCCCAACGTGTCTGTT	NM_001034034.1
	R-GCTTCACCACCTTCTTGATCTCATC	
SREBF1	F-TGCTGACCGACATAGAAGACAT	AB355703.1
	R-CGTAGGGCGGGTCGAATAG	
SCD	F-GTGGAGTCACCGAACCTACA	AH011561.1
	R-AAACGTCATTCTGGAACGCCA	

* ACTB Beta Actina; RPL15 Proteína Ribossomal L15; GAPDH gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase; SREBF1 Proteína de ligação do elemento regulatório de esterol; SCD estearoil coenzima A dessaturase.

** Primers baseados em sequências do GenBank

A extração do mRNA foi realizada utilizando o reagente Trizol (Life Technologies®) seguindo as recomendações do fabricante e o cDNA dupla fita foi sintetizado utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits without Rnase inhibitor (Life Technologies®), seguindo as recomendações de uso do produto.

Para a reação qPCR foram utilizados 7,5 µL de Power SYBR® Green Master Mix 2 X (Life Technologies®); 1,0 µL do nucleotídeo iniciador, preparando-se uma reação separada para cada nucleotídeo; 2,0 µL de cDNA diluído (1 µL de cDNA para 7 µL de água ultra-pura tratada com DEPC); e 4,5 µL de água ultra-pura tratada com DEPC, totalizando um volume final de 15 µL.

Os parâmetros da termociclagem incluíram um passo inicial a 50°C por 2 minutos, passando para 95 °C durante 10 minutos, para promover a desnaturação dos genes, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 57°C por 45 segundos e 60°C por 1 minuto, para anelamento e elongação dos genes, finalizando com a curva de dissociação (60-95°C). As reações de qPCR foram realizadas em duplicata e utilizando o sistema Applied Biosystems StepOne™.

5.5. Experimento 3

5.5.1. Aspiração folicular guiada por ultrassom

No experimento três, 17 vacas da raça Holandesa, não lactantes e mantidas em piquetes com pastagem e água *ad libitum*, situadas na Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga – FAYS, foram submetidas ao procedimento de aspiração folicular guiada por ultrassom. Foram realizadas 5 rotinas de aspiração folicular, recuperando uma média de 13 oócitos por aspiração, por vaca. As vacas foram devidamente contidas no tronco de contenção e, para reduzir o desconforto animal, receberam anestesia epidural baixa, que consiste na injeção de analgésico local no canal espinhal, entre a última vértebra sacral e a primeira coccígea, utilizando uma dose de 1mL/100 kg de peso vivo de lidocaína 2% e acompanhando a reação do animal.

A aspiração folicular foi realizada via transvaginal, posicionando os ovários para obtenção de uma boa visualização na tela do ultrassom. Os folículos foram puncionados utilizando agulhas descartáveis de 20 Gauge e os oócitos foram aspirados com auxílio de uma bomba de vácuo a uma pressão de 65 a 70 mm Hg, suficiente para recuperar a maior quantidade de COCs, sem comprometer a qualidade e o número de camadas de células do *cumulus* ao redor dos oócitos.

5.5.2. Lavagem, seleção e transporte dos oócitos

O material aspirado foi transferido para um filtro de colheita de embriões e lavado com PBS acrescido de 5,0 UI/mL de heparina. O sedimento restante no filtro foi observado em placas de *Petri* para a busca e a contagem dos oócitos e posterior classificação da qualidade. Os oócitos foram classificados de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumulus* e

aspecto do citoplasma) em graus I, II e III (GI, GII e GIII), oócitos sem *cumulus* (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), segundo Viana et al., (2004). Os oócitos foram lavados em solução TCM 199 Hepes (Gibco) suplementado com 10% SFB (Gibco), 50 µg de gentamicina, 2,2 µg de piruvato e transportados em criotubos (Corning®) contendo meio de maturação em atmosfera de 5% de CO₂ e 5% de O₂ a 35°C, utilizando a Transportadora de oócitos Lab Mix(WTA, Cravinhos, SP, Brasil).

5.5.3. Produção *in vitro* de embriões

A MIV e a FIV foi realizada da forma como foi descrita anteriormente (item 6.2.2 e 6.2.3, respectivamente), porém na FIV utilizou-se uma mesma partida de sêmen sexado de touro Holandês. No cultivo *in vitro* (D2,5), os embriões clivados foram transferidos para placa de quatro poços e divididos em dois tratamentos: grupo controle; e grupo com 0, 3µM de PES. No sétimo dia de cultivo (D7) foi verificada a taxa de blastocisto.

5.5.4. Vitrificação dos embriões

Os blastocistos com sete dias, de acordo com o respectivo tratamento e classificados como de grau I, foram lavados em solução de DPBS acrescida de 5% SFB (Holding Medium – HM) e, então, desidratados por um minuto em solução a 10% de etilenoglicol e 10% de DMSO em HM. Posteriormente, os embriões foram desidratados novamente em 20% de etilenoglicol e 20% de DMSO por 20 segundos, e envasados em Open Pull Straw (OPS) segundo VAJTA et al. (1998).

5.5.5. Transferência dos embriões para as receptoras

Os embriões do grupo controle e do grupo tratamento, classificados em grau I e vitrificados no D7, após pelo menos duas semanas, foram desvitrificados, envasados e transferidos de forma não cirúrgica para receptoras sincronizadas. A OPS a ser desvitrificada foi mergulhada no poço contendo 30% de solução sucrose 1M, quando todos os embriões “desceram” da OPS, eles foram

passados imediatamente para o segundo poço contendo a mesma concentração da solução, onde permaneceram por um tempo total de 5 minutos. Os embriões foram transferidos para uma solução com 20% de sucrose 1M, permanecendo por mais 5 minutos; em seguida, foram colocados em solução de manutenção para serem envasados.

As receptoras, perfazendo um total de 60 vacas mestiças aneloradas, foram mantidas em sistema de pastejo, situado na Fazenda da Aeronáutica de Pirassununga. Essas vacas receberam um tratamento hormonal para a sincronização da ovulação e posterior inovulação do embrião. O protocolo hormonal consistiu na colocação de um implante intravaginal impregnado com progesterona, o CIDR-B® (Pfizer), no dia 0, associado à administração de 2mg de Benzoato de Estradiol, seguido da retirada do implante, aplicação de 0,5mg de Cloprostenol e 1mg de Benzoato de Estradiol no dia 8, com a observação de cio no dia 9. Visando uma divisão equitativa, as receptoras foram divididas em função da atividade ovariana, utilizando somente fêmeas cíclicas, evidenciado pela presença do corpo lúteo.

5.5.6. Diagnóstico de gestação

Após 30 dias da realização da transferência dos embriões, foi realizado o diagnóstico de prenhez através do exame ultrassonográfico, com a utilização do aparelho de DP-200 Vet (Mindray) e um transdutor linear (7,5 MHz) para a observação vesícula embrionária, embrião e batimento cardíaco do conceito. Aos 60 dias de gestação foi realizada outra avaliação, também por meio de ultrassom, para a verificação de possíveis perdas embrionárias nesse período.

5.6. Análise estatística

Os resultados da avaliação do desenvolvimento embrionário, incluindo a taxa de clivagem e taxa de blastocisto, e os resultados da expressão gênica foram submetidos à ANOVA obedecendo-se os critérios de homogeneidade de variância e normalidade dos resíduos. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan. Os dados de taxa de gestação foram comparados pelo teste qui-quadrado. Nível de significância de 5% foi utilizado em todos os experimentos.

6. RESULTADOS

6.1. Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário foi avaliado até o período de eclosão do blastocisto, a fim de verificar a influência do uso de Etossulfato de Fenazina (PES) no meio de cultivo *in vitro*. No experimento um foram testadas três diferentes doses do PES (0,2µM; 0,3µM e 0,5µM) na tentativa de se obter uma dose de segurança no que tange á toxicidade da substância e ao mesmo tempo uma ação efetiva na modulação da biossíntese de lipídeos.

O uso de diferentes concentrações de Etossulfato de Fenazina não apresentou diferença estatística ($P < 0,05$), quando comparado com o grupo controle, tanto para a taxa de clivagem, quanto para a taxa de blastocisto no D7 e no D8, bem como para a taxa de eclosão. Não foi possível observar diferença entre as três doses de Etossulfato de Fenazina, embora tenha sido possível observar uma tendência de uma melhor resposta do grupo 0,3µM de PES, visto que foi numericamente superior no D8, quando comparado aos outros tratamentos (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3 - Efeito de diferentes doses de Etossulfato de Fenazina na taxa de clivagem e taxa de blastocisto derivados de embriões produzidos *in vitro* e cultivados com 2,5% soro fetal bovino.

Grupo	No	Nc	Cliv (±DP)	Nb - D7	Blast – D7 (±DP)	Nb - D8	Blast/oócitos – D8 (±DP)	Blast/clivados – D8 (±DP)
Controle	206	182	88,4%	71	34,5%	85	41,3%	46,7%
0,2µM PES	205	179	87,3%	67	32,7%	73	35,6%	40,8%
0,3µM PES	207	183	88,4%	72	34,8%	93	44,9%	50,8%
0,5 µM PES	207	173	83,6%	66	31,9%	75	36,2%	43,4%
Total	825	717	-	276	-	326	-	-

Não existe diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). No= número de oócitos; Nc = número de embriões clivados; Cliv = taxa de clivagem; Nb-D7 = número de blastocisto no dia 7; Blast – D7 = taxa de blastocisto no dia 7; Nb –D8= número de blastocisto no dia 8; Blast/oócitos – D8 = taxa de blastocisto em relação ao número de oócitos, no dia 8, Blast/clivados – D8 = taxa de blastocisto em relação ao número de clivados, no dia 8.

Figura 4: Efeito de diferentes doses do Etossulfato de Fenazina sobre a porcentagem de blastocisto no D8 (média $\pm$ erro padrão), em relação ao número de oócitos viáveis provenientes de ovários de abatedouro e em relação ao número de zigotos clivados. Não verificou-se diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

6.2. Expressão gênica

Os embriões do experimento um foram armazenados em freezer a -80°C para a posterior extração de mRNA e análise da expressão gênica, utilizando o gene *SCD1*, que atua na esterificação dos ácidos graxos e o *SREBF1*, que consiste em um fator de transcrição que modula uma série de genes da via de biossíntese de lipídeos.

No experimento dois não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos tratados. O uso de Etossulfato de Fenazina durante o período de cultivo *in vitro* de embriões bovinos não induziu alterações nos genes relacionados com a biossíntese do triacilglicerol (Figuras 5 e 6).

Figura 5: Expressão gênica relativa do gene Estearoil Co-A Desaturase (*SCD1*), em pools de cinco blastocistos bovinos, tratados com três diferentes doses de Etossulfato de Fenazina durante o cultivo *in vitro*. Não existe diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Figura 6: Expressão gênica relativa do Fator de Transcrição Proteína de ligação do elemento regulatório de esterol (*SREBF1*), em pools de cinco blastocistos bovinos tratados com três diferentes doses de Etossulfato de Fenazina durante o cultivo *in vitro*. Não existe diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

6.3. Taxa de desenvolvimento embrionário inicial e taxa de gestação

Os embriões do experimento três foram produzidos *in vitro*, a partir da aspiração folicular de vacas holandesas e foram vitrificados no dia 7 do cultivo. Com relação ao desenvolvimento embrionário inicial, não foi constatada diferença estatística para taxa de clivagem, tão pouco para a taxa de blastocisto no D7 (figura 7).

Figura 7: Efeito do etossulfato de fenazina, na dose de 0,3µM, no desenvolvimento embrionário inicial de embriões produzidos *in vitro*, a partir da OPU de vacas holandesas.

Após, pelo menos, duas semanas armazenados em nitrogênio líquido, os embriões foram transferidos para as receptoras, previamente sincronizadas através de um protocolo hormonal. Os embriões do grupo controle e do grupo tratado com 0,3µM PES foram transferidos de forma aleatória para as receptoras a fim de verificar a capacidade de sobrevivência dos mesmos à criopreservação, possibilitando analisar esses dados *in vivo* por meio da taxa de gestação aos 30 e aos 60 dias. No presente estudo, não houve influencia do Etossulfato de Fenazina na taxa de prenhez com 30 e 60 dias de gestação (Tabela 4).

Tabela 4: Taxa de prenhez com 30 e 60 dias de gestação em receptoras que receberam embriões vitrificados/desvitrificados, produzidos *in vitro* a partir da OPU de vacas holandesas.

Grupo	Nº embriões transferidos	Nº Receptoras prenhes – 30 d.	% Prenhez – 30 d.	Nº Receptoras prenhes - 60 d.	% Prenhez – 60 d.
Controle	49	13	26,5%	11	22,4%
0,3µM PES	48	12	25%	11	22,9%
Total	97	25	25,8%	22	22,7%

Não existe diferença entre os tratamentos (P<0.05).

7. DISCUSSÃO

Tendo em vista o cenário do crescente avanço de diversas biotecnologias na área da ciência, a produção *in vitro* de embriões bovinos ainda enfrenta uma grande barreira, a criopreservação dos embriões, etapa essa que facilitaria o gerenciamento das receptoras e ainda possibilitaria a comercialização da genética por meio de embriões. Considerando que o Brasil utiliza de forma significativa a produção *in vitro*, contribuindo com uma grande parcela dos embriões produzidos, mais de 80% em 2011 (IETS), melhorias nos resultados de criopreservação e sobrevivência após a transferência seriam de grande incentivo para a ampliação dessa biotecnologia. Em função dos resultados negativos com a criopreservação, nos últimos 10 anos somente 3 a 7% dos embriões produzidos *in vitro* foram vitrificados (VIANA, 2010; STROUD, 2010, 2012; VIANA, 2012).

A reduzida criotolerância tem sido principalmente atribuída ao acúmulo de lipídeos no citoplasma do embrião, o que está fortemente relacionado ao cultivo *in vitro*, visto que embriões produzidos *in vivo* apresentam menor quantidade de lipídeos e respondem melhor a vitrificação (ABE et al., 2002; RIZOS; FAIR, 2002).

O acúmulo lipídico nos embriões de PIV está frequentemente associado à presença de soro fetal bovino no meio de cultura e ao metabolismo energético anormal dos embriões cultivados *in vitro*. Atualmente, a quantidade de SFB mais utilizada comercialmente nos meios de cultivo foi reduzida para 2,5%, a fim de reduzir os efeitos prejudiciais do soro fetal e de manter uma taxa de produção de embriões condizente para uma aplicação a campo, já que, de acordo

com Sudano et al. (2011), o uso de 2,5% de SFB no meio de cultivo não reduz a criotolerância dos embriões, quando comparado com cultivo na ausência de soro. O cultivo *in vitro*, mesmo na ausência de soro fetal bovino, induz a um metabolismo anormal no embrião, gerando o efeito Crabtree (KOOBS, 1972), o que, por sua vez, provoca um maior acúmulo lipídico no citoplasma e consequentemente interfere na criopreservação desse embrião.

A modificação nos métodos de criopreservação pode ser considerada uma boa alternativa para melhorar a taxa de sobrevivência dos embriões, porém, mesmo com resultados favoráveis, esses ainda são limitados. Por conta disso, torna-se interessante a utilização de modificadores do metabolismo de triacilglicerol, na tentativa de melhorar o sistema de cultivo e assim produzir um embrião de melhor qualidade e com maior capacidade de resistir à criopreservação, melhorando os resultados de concepção.

O Etossulfato de Fenazina (PES) consiste em uma substância capaz de alterar o direcionamento de componentes energéticos na célula, podendo ser um ótimo candidato a agente modificador do metabolismo lipídico no embrião. Ao oxidar o NADPH, gerando NADP⁺, o PES estimula a via da pentose-fosfato, levando a síntese de ácidos nucleicos e reduz, por conseguinte, a atividade na via glicolítica. Além disso, o PES diminui a disponibilidade do agente redutor, NADPH, fundamental na síntese de ácidos graxos. Ambos os efeitos provocados pelo PES podem levar a uma redução do acúmulo lipídico no embrião de PIV.

No experimento um, a utilização de três diferentes doses de PES a partir de 60 horas de cultivo, não provocou diferença estatística na taxa de clivagem, semelhante ao verificado por Sudano et al. (2011). O PES não causou efeito na taxa de desenvolvimento embrionário, similar aos resultados observados por Ghanem et al. (2014). No trabalho realizado por Sudano et al. (2011) não houve efeito de PES na taxa de blastocisto quando o mesmo foi adicionado no dia 4 do cultivo, porém foi notada uma redução na produção de blastocisto com o uso de 0,3 μ M de PES a partir do D 2,5.

Outros estudos não reportaram efeito do PES na taxa de blastocisto, quando comparado com controle ou outros reguladores metabólicos, como DNP e NaN₃, mas em associação com DNP, o PES foi prejudicial, causando redução na taxa de blastocisto (BARCELÓ-FIMBRES E SEIDEL, 2007a; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006). Por outro lado, no cultivo de embriões de suínos, que também possuem grande quantidade de lipídeos citoplasmáticos, o uso

de PES, na dose de 0,05 μ M, induziu a um aumento na taxa de mórula e blastocisto, acompanhado pela redução do conteúdo lipídico (GAJDA et al., 2011).

A biossíntese do triacilglicerol envolve inicialmente a produção de ácidos graxos saturados através da ação do complexo enzimático ácido graxo sintase, com a utilização de NADPH como agente redutor em duas fases do processo, passando para a etapa de síntese de ácidos graxos monoinsaturados, com a introdução de duplas ligações na cadeia carbônica, reação essa catalisada pela enzima Estearoil Co-A desaturase (SCD1) e mais uma vez com o NADPH fornecendo os equivalentes redutores para a reação.

Tendo em vista que o PES oxida o NADPH, reduzindo sua disponibilidade para atuar na conversão dos ácidos graxos saturados a monoinsaturados, esperava-se que houvesse uma inibição da ação da enzima Estearoil Co-A Desaturase, com a subsequente redução da expressão gênica da mesma quando se utilizou o PES, porém, de acordo com os resultados do experimento dois, não foi constatado efeito do PES nos níveis de mRNA da SCD1. Alguns hormônios esteroides provocam redução da expressão gênica em conjunto com a diminuição direta da atividade enzimática da SCD1 (GOMEZ et al., 2002). Em contrapartida, outras substâncias, como o ácido graxo ciclopropenóide, inibe somente a atividade da enzima SCD1 tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (GOMEZ et al., 2003). Sendo assim, o Etossulfato de Fenazina pode ter provocado redução da atividade enzimática, sem alteração da transcrição do mRNA da SCD1.

Prévios estudos perceberam que a proteína SCD sofre rápida degradação em resposta a demanda fisiológica da célula, produzindo uma elevação transitória da enzima SCD, o que indica uma regulação da expressão muito diversificada (HEINEMANN; OZOLS, 2003). Wrenzycki, Herrmann, Carnwath e Niemann (1999), analisando alguns genes em embriões de bovinos cultivados *in vitro*, observaram diferenças na expressão temporal de certos genes. Visto isso, existe a possibilidade do PES ter causado uma alteração transitória na expressão ou atividade da enzima no início do tratamento, nos primeiros dias do cultivo, regularizando os níveis de mRNA da SCD na fase de blastocisto, momento em que foram congelados para a avaliação da expressão.

Aparentemente não há relatos sobre o perfil da expressão do gene SCD1 em embriões tratados com PES, porém o uso de PES promoveu um aumento de genes relacionados com a atividade metabólica da mitocôndria, como o GLUT8, SOD2 e NADH. Considerando o mecanismo de ação do PES, que oxida o NADPH em NADP, com subsequente estímulo do

metabolismo da glicose e produção de ATP, pode-se explicar a alta regulação dos genes citados em embriões tratados com PES e com PES em associação a L-Carnitina (GHANEM et al., 2014).

Camundongos com a mutação do gene SCD1 apresentam deficiência de triacilgliceróis hepáticos, mesmo com a atividade normal da ACAT e DGAT (NTAMBI, 2004). Tudo indica que existe relação entre os triacilgliceróis e o gene, por conta disso, espera-se que um aumento de síntese/disponibilidade de triacilgliceróis induza a uma elevação na transcrição gênica da SCD1. Lembrando que o cultivo *in vitro* leva a um aumento de lipídeos e que o PES já demonstrou promover a redução dos mesmos, esperava-se que houvesse uma diferença na expressão da SCD entre o controle e o grupo tratado, porém o PES não causou efeito entre os grupos, podendo então ter causado apenas uma variação direta na atividade da enzima, ou alteração transitória em outra fase do desenvolvimento.

Embora o PES não tenha causado alteração significativa na transcrição de SCD1, em prévios experimentos, o uso de PES provocou uma redução na expressão de genes que regulam a formação de gotas lipídicas, que catalisam a formação de triacilglicerol, como o DGAT1 e DGAT2 e ainda do gene ACC-a, responsável pela carboxilação do Acetil-CoA para a produção do Malonil-CoA, o precursor da síntese de ácidos graxos (GHANEM et al., 2014). Sendo assim, pode-se dizer que o PES pode estar agindo em outras partes da via de biossíntese de lipídeos.

O SREBP pertence a uma família de fatores de transcrição que regulam a atividade de enzimas responsáveis pela síntese de colesterol (SREBP-2), fosfolipídios e triacilgliceróis (SREBP-1c). Para ser ativado, o precursor SREBP, ligado à membrana do retículo endoplasmático, deve ser clivado para que possa entrar no núcleo, se ligar ao elemento regulatório de esterol dos genes alvo e assim ativar a transcrição (EBERLÉ et al., 2004; HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002). Em cultura de células, quando há uma disponibilidade excessiva de esterol, a clivagem proteolítica do precursor SREBP é inibida, acompanhada por um decréscimo na forma nuclear ativa, o que por sua vez provoca a redução da transcrição de todos os genes da via de biossíntese de lipídeos (BROWN; GOLDSTEIN, 1997).

Horton (1998), utilizando um protocolo de jejum-realimentação de camundongos com dieta rica em carboidrato, relatou um aumento de SREBP-1c nuclear acompanhado por um aumento na quantidade de mRNA do *SREBP-1c* em camundongos realimentados, porém não verificou diferença na quantidade de SREBP-1c precursor entre os grupos, sugerindo que houve

um estímulo da clivagem do precursor, com a possibilidade de uma concomitante redução na taxa de degradação do SREBP-1c.

Em um estudo com camundongos transgênicos, super-expressando a forma nuclear do SREBP-1c no fígado, foi verificado um aumento na expressão de genes relacionados com a síntese de ácidos graxos, como o *ACC*, *FAS* e *SCD-1*, sem alteração na síntese de colesterol (SHIMANO et al., 1997). Visto que existe um mecanismo de regulação dependente entre a *SCD1* e o SREBP-1c, pode-se esperar o mesmo padrão de atividade conforme alteração do ambiente. No experimento dois não se observou diferença estatística entre o controle e os grupos de tratamento para a expressão gênica do *SREBP-1*, seguindo o mesmo perfil da *SCD1*.

O fator de transcrição SREBP1 é crucial para a regulação de diversos genes da via que controla o metabolismo lipídico. O acúmulo lipídico no fígado de roedores promoveu um aumento na transcrição de *PPAR γ* e *SREBP1* (KIM et al., 2007). Segundo Ghanem et al. (2014), apesar da redução do conteúdo lipídico em embriões tratados com PES, L-Carnitina e ambos, somente o uso de PES associado com L-Carnitina induziu um aumento na expressão gênica e abundância de *SREBP1*.

No presente experimento, os resultados da taxa de prenhez com 30 e 60 dias de gestação, de embriões vitrificados e tratados com Etossulfato de Fenazina foram similares aos de embriões do grupo controle. Segundo Barceló-Fimbres, Brink e Seidel (2009), a utilização de PES no meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos não promoveu efeito na taxa de prenhez, perda fetal ou mesmo no desenvolvimento pós-natal de bezerros nascidos normalmente, porém nesse último experimento os embriões foram transferidos a fresco. De forma similar, embriões de suínos, cultivados na presença de PES, não apresentaram efeito significativo na sobrevivência *in vitro* após a criopreservação, mesmo tendo sido observado uma redução do conteúdo lipídico (GAJDA et al., 2011).

Por outro lado, já foi observado efeito positivo do PES na criotolerância de embriões bovinos, verificado através de um aumento na capacidade de reexpansão *in vitro*, quando é adicionado tanto no D2,5; quanto no D4 (SUDANO et al., 2011). Barceló-Fimbres e Seidel (2007b) também relataram um efeito benéfico na sobrevivência *in vitro* de embriões submetidos ao congelamento convencional e vitrificação com a adição de PES no meio de cultivo a partir do dia 2,5.

A suplementação do meio de cultura com químicos redutores de lipídeos não afetaram significativamente a taxa de sobrevivência embrionária, mas na presença de PES associado com L-Carnitina foi observado uma maior taxa de eclosão tanto pré como pós-criopreservação (GHANEM et al., 2014).

Embriões vitrificados de bovinos e suínos, previamente tratados com diferentes protocolos de redução de lipídeos, como centrifugação, combinada ou não com micromanipulação, apresentaram melhora efetiva na sobrevivência à criopreservação (LI et al., 2009; USHIJIMA; YAMAKAWA; NAGASHIMA, 1999). Recentemente, a desvitrificação de embriões ovinos submetidos à centrifugação e tratados com um estabilizador de citoesqueleto, a citocalasina, demonstrou um aumento na taxa de reexpansão, com melhora nas características de blastocle (ROMÃO et al., 2015).

A PIV é uma biotecnologia de grande aplicação no Brasil, usada principalmente para acelerar o melhoramento genético, porém o acúmulo lipídico no citoplasma dos embriões produzidos *in vitro* continua sendo um dos fatores que prejudica a criopreservação desses, o que, por sua vez, ainda mantém essa biotecnologia com uma grande limitação, a flexibilidade no uso dos embriões.

O uso de PES tem se mostrado eficaz na redução do conteúdo lipídico, no desenvolvimento embrionário inicial e melhora na reexpansão *in vitro*, porém com resultados inconsistentes.

8. CONCLUSÃO

O Etossulfato de fenazina, no presente experimento, não causou efeito na taxa de gestação, sendo necessários novos estudos para avaliar a eficácia do PES na criopreservação, quando utilizado *in vivo*, como tentativa de tornar a criopreservação aplicável a campo.

A expressão dos genes estudados no experimento, relacionados com a via de biossíntese do triacilglicerol, não foi alterada com a suplementação do PES, indicando que os mecanismos moleculares pelos quais o PES atua reduzindo a quantidade lipídica são independentes das vias reguladas por esses genes. Pesquisas adicionais a fim de verificar mais detalhadamente o mecanismo de ação do PES na redução dos lipídeos citoplasmáticos se fazem necessárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **The Journal of reproduction and development**, v. 49, n. 3, p. 193–202, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14967928>>.

ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**, v. 57, p. 1273–1283, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02006349>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 1, p. 57–66, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11774376>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

AZZOUT-MARNICHE, D.; BECARD, D. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. **Biochem. J**, v. 393, p. 389–393, 2000. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/bj/350/bj3500389.htm>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

BARCELO, M.; FIMBRES AND G.E. SEIDEL, J. Effects of Fetal Calf Serum, Phenazine Ethosulfate and Either Glucose or Fructose During In Vitro Culture of Bovine Embryos on Embryonic Development After Cryopreservation. **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 7, p. 815–820, 2007a. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20699/full>>. Acesso em: 29 jul. 2014.

BARCELO, M.; FIMBRES AND G.E. SEIDEL, J. Effects of Either Glucose or Fructose and Metabolic Regulators on Bovine Embryo Development and Lipid Accumulation In Vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 7, p. 815–820, 2007b. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.20700/abstract>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

BARCELÓ-FIMBRES, M.; BRINK, Z.; SEIDEL, G. E. Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. **Theriogenology**, v. 71, n. 2, p. 355–368, 2009.

BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. **Journal of**

dairy science, v. 93, n. 11, p. 5234–5242, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3443>>.

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 4, p. 1050–5, out. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491643>>.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 331–40, 2 maio 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150132>>.

CATT, J. Bovine embryo co-culture. **Cell biology international**, v. 18, p. 1155–1162, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1065699584710420>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; GARDNER, D. K.; PREIS, K.; GIBBONS, J.; SEIDEL, G. E. 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. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 5, p. 597–607, 2006a.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; GARDNER, D. K.; PREIS, K.; GIBBONS, J.; SEIDEL, G. E. 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. **Reproduction, fertility, and development**, v. 18, n. 5, p. 597–607, jan. 2006b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16836966>>.

DOWNS, S. M.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J. Meiotic induction in cumulus cell-enclosed mouse oocytes: involvement of the pentose phosphate pathway. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 4, p. 1084–94, abr. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546744>>.

EBERLÉ, D.; HEGARTY, B.; BOSSARD, P.; FERRÉ, P.; FOUFELLE, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839–48, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15589694>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

ENRIGHT, B. P.; LONERGAN, P.; FAIR, T.; WARD, F. A.; YANG, X.; BOLAND, M. P. CULTURE OF IN VITRO PRODUCED BOVINE ZYGOTES IN VITRO VS IN VIVO: IMPLICATIONS FOR EARLY EMBRYO DEVELOPMENT- AND QUALITY Department of Animal Science and Production , University College Dublin Farm , Newcastle , County Dublin Ireland of Animal Science , U. n. 00, p. 659–673, 2000.

FERGUSON, E.; LEESE, H. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of reproduction and fertility**, n. 116, p. 373–378, 1999. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/116/2/373.short>>. Acesso em: 25 jun. 2014.

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

GARDNER, D. K. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. **Reproduction, fertility, and development**, v. 20, n. 1, p. 9–18, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18154693>>.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; SPITZER, a; BATT, P. a. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 390–400, fev. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8142556>>.

GHANEM, N.; HA, a. N.; FAKRUZZAMAN, M.; BANG, J. Il; LEE, S. C.; KONG, I. K. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced invitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 238–250, 2014.

GOLDSTEIN, J. L.; RAWSON, R. B.; BROWN, M. S. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 397, n. 2, p. 139–48, 15 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11795864>>. Acesso em: 16 jul. 2014.

GOMEZ, F. E.; BAUMAN, D. E.; NTAMBI, J. M.; FOX, B. G. Effects of sterculic acid on stearoyl-CoA desaturase in differentiating 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, n. 2, p. 316–326, 2003.

GOMEZ, F. E.; MIYAZAKI, M.; KIM, Y. C.; MARWAH, P.; LARDY, H. a.; NTAMBI, J. M.; FOX, B. G. Molecular differences caused by differentiation of 3T3-L1 preadipocytes in the presence of either dehydroepiandrosterone (DHEA) or 7-oxo-DHEA. **Biochemistry**, v. 41, n. 17, p. 5473–5482, 2002.

HEINEMANN, F. S.; OZOLS, J. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, n. 2, p. 123–133, 2003.

HORTON, J. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. May, p. 5987–5992, 1998. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/95/11/5987.short>>. Acesso em: 21 jul. 2014.

HORTON, J. D.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Critical review SREBPs : activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. v. 109, n. 9, p. 1125–1131, 2002.

HORTON, J. D.; SHAH, N. a; WARRINGTON, J. a; ANDERSON, N. N.; PARK, S. W.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p. 12027–32, 14 out. 2003a. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=218707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I.; BROWN, M. S.; HAMMER, R. E.; GOLDSTEIN, J. L.; SHIMANO, H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 11, p. 2331–9, 1 jun. 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508822&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I.; IKEMOTO, S.; BASHMAKOV, Y.; HAMMER, R. E. **Overexpression of sterol regulatory element-binding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver.** [s.l: s.n.]v. 278

J. J. PARRISH, A. K. and J. 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**, v. 44, n. 95, p. 859–869, 1995.

KATO, H.; SAKAKI, K.; MIHARA, K. Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. **Journal of cell science**, v. 119, n. Pt 11, p. 2342–2353, 2006.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 4, p. 847–856, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10727252>>.

KIM, H.-J. Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. **The Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 10, p. 1750–1757, 1 out. 2002. Disponível em: <<http://www.jlr.org/cgi/doi/10.1194/jlr.M100433-JLR200>>. Acesso em: 3 jun. 2014.

KIM, J.; SARRAF, P.; WRIGHT, M. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 1, p. 1–9, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC508533/>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

KIM, K. H.; SHIN, H.-J.; KIM, K.; CHOI, H. M.; RHEE, S. H.; MOON, H.-B.; KIM, H. H.; YANG, U. S.; YU, D.-Y.; CHEONG, J. Hepatitis B virus X protein induces hepatic steatosis via transcriptional activation of SREBP1 and PPARgamma. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1955–1967, 2007.

KOOPS, D. H. Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. **Science (New York, N.Y.)**, v. 178, n. 57, p. 127–133, 1972.

KRISHER, R. L.; LANE, M.; BAVISTER, B. D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1345–52, jun. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330091>>.

LAPA, M.; MARQUES, C.; BAPTISTA, M. Fatty acid profile of oocytes and blastocysts during in vitro bovine embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 4, p. 365 (abstract), 2005. Disponível em: <http://horta.0catch.com/aemh/lapa_reprod_domest_anim_2005.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2014.

LAZZARI, G. Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 767–775, 1 set. 2002. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.102.004481>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

LEE, S. J.; SEKIMOTO, T.; YAMASHITA, E.; NAGOSHI, E.; NAKAGAWA, A.; IMAMOTO, N.; YOSHIMURA, M.; SAKAI, H.; CHONG, K. T.; TSUKIHARA, T.; YONEDA, Y. The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5650, p. 1571–5, 28 nov. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645851>>. Acesso em: 16 jul. 2014.

LI, R.; MURPHY, C. N.; SPATE, L.; WAX, D.; ISOM, C.; RIEKE, A.; WALTERS, E. M.; SAMUEL, M.; PRATHER, R. S. Production of piglets after cryopreservation of embryos using a

centrifugation-based method for delipation without micromanipulation. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 3, p. 563–571, 2009.

LIANG, G.; YANG, J.; HORTON, J. D.; HAMMER, R. E.; GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 11, p. 9520–8, 15 mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782483>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of reproduction and fertility**, v. 117, p. 159–167, 1999. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/117/1/159.short>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYE, a M.; KINGSTON, M.; WADE, M.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 126, n. 3, p. 337–46, set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12968941>>.

MCEVOY, T. G.; COULL, G. D.; BROADBENT, P. J.; HUTCHINSON, J. S.; SPEAKE, B. K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of reproduction and fertility**, v. 118, n. 1, p. 163–70, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793638>>.

MCKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reproduction, fertility, and development**, v. 24, n. 1, p. 59–67, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394718>>.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 8, n. 1, p. 87–96, fev. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840878>>.

MIYAZAKI, M.; DOBRZYN, A.; SAMPATH, H.; LEE, S. H.; WENG, C. M.; CHU, K.; PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J.; NTAMBI, J. M. Reduced adiposity and liver steatosis by stearyl-CoA desaturase deficiency are independent of peroxisome proliferator-activated receptor-?? **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 35017–35024, 2004.

MIYAZAKI, M.; JACOBSON, M. J.; MAN, W. C.; COHEN, P.; ASILMAZ, E.; FRIEDMAN, J. M.; NTAMBI, J. M. Identification and Characterization of Murine SCD4, a Novel Heart-specific

Stearoyl-CoA Desaturase Isoform Regulated by Leptin and Dietary Factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 36, p. 33904–33911, 2003.

MIYAZAKI, M.; KIM, Y. C.; GRAY-KELLER, M. P.; ATTIE, A. D.; NTAMBI, J. M. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 39, p. 30132–30138, 2000.

MIYAZAKI, M.; KIM, Y. C.; NTAMBI, J. M. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. **Journal of lipid research**, v. 42, n. 7, p. 1018–1024, 2001.

MIYAZAKI, M.; NTAMBI, J. M. Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 68, n. 2, p. 113–21, fev. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538075>>.

MTANGO, N. R.; VARISANGA, M. D.; DONG, Y. J.; RAJAMAHENDRAN, R.; SUZUKI, T. Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1393–402, mar. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527085>>.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551–62, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16229883>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

MZIAUT, H.; KORZA, G.; OZOLS, J. The N terminus of microsomal delta 9 stearoyl-CoA desaturase contains the sequence determinant for its rapid degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8883–8888, 2000.

NAGOSHI, E.; IMAMOTO, N.; SATO, R.; YONEDA, Y. Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. **Molecular biology of the cell**, v. 10, n. 7, p. 2221–33, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=25438&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NAGOSHI, E. M. I.; YONEDA, Y. Dimerization of Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 via the Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper Domain Is a Prerequisite for Its Nuclear Localization Mediated by Importin α . v. 21, n. 8, p. 2779–2789, 2001.

NTAMBI, J. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 2, p. 91–104, mar. 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782703000390>>. Acesso em: 16 jul. 2014.

NTAMBI, J. M. **The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD)** **Progress in Lipid Research**, 1995. .

NTAMBI, J. M.; BUHROWSLL, S. A.; KAESTNERSII, K. H.; CHRISTY, R. J.; SIBLEY, E.; KELLY, T. J.; LANE, M. D.; AG, G. T. Differentiation-induced Gene Expression in 3T3-L1 Preadipocytes. v. 263, n. 33, 1988.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. **Current opinion in lipidology**, v. 14, n. 3, p. 255–261, 2003.

NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M.; STOEHR, J. P.; LAN, H.; KENDZIORSKI, C. M.; YANDELL, B. S.; SONG, Y.; COHEN, P.; FRIEDMAN, J. M.; ATTIE, A. D. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11482–11486, 2002.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell and tissue banking**, v. 9, n. 4, p. 267–77, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18496769>>. Acesso em: 28 maio. 2014.

POLGE, C.; WILMUT, I.; ROWSON, L. The low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. **Cryobiology**, p. 560, 1974. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:The+low+temperature+preservation+of+cow,+sheep+and+pig+embryos.#0>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

RAWSON, R. B. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 8, p. 631–640, 2003.

REIS, a; ROOKE, J. a; MCCALLUM, G. J.; STAINES, M. E.; EWEN, M.; LOMAX, M. a; MCEVOY, T. G. 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. **Reproduction, fertility, and development**, v. 15, n. 5, p. 275–84, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14588185>>.

RIEGER, D.; MCGOWAN, L.; COX, S. Effect of 2, 4-dinitrophenol on the energy metabolism of cattle embryos produced by in vitro fertilization and culture. **Reproduction, fertility, and development**, v. 14, p. 339–343, 2002. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD02038>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

RIZOS, D. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 236–243, 14 out. 2003. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.102.007799>>. Acesso em: 16 jul. 2014.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, a. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.4, p. 44–50, 2008.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 62, n. 3, p. 320–7, jul. 2002a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112595>>. Acesso em: 3 jun. 2014.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v. 56, p. 1–16, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01005386>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 2, p. 234–48, fev. 2002b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803560>>. Acesso em: 5 jun. 2014.

ROMÃO, R.; MARQUES, C. C.; BAPTISTA, M. C.; BARBAS, J. P.; HORTA, A. E. M.; CAROLINO, N.; BETTENCOURT, E.; PEREIRA, R. M. Theriogenology Cryopreservation of in vitro – produced sheep embryos: Effects of different protocols of lipid reduction. **Theriogenology**, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.019>>.

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**, v. 75, n. 1, p. 42–54, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833424>>. Acesso em: 11 jun. 2014.

SEIDEL, G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 228–35, 7 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263160>>. Acesso em: 3 jun. 2014.

SHENG, Z.; OTANI, H. Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. February, p. 935–938, 1995. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/92/4/935.short>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

SHIMANO, H.; HORTON, J. D.; HAMMER, R. E.; SHIMOMURA, I.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 7, p. 1575–84, 1 out. 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=507590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SHIMANO, H.; HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I.; HAMMER, R. E.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 5, p. 846–54, 1 mar. 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=507891&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SHIMOMURA, I.; BASHMAKOV, Y.; HORTON, J. D. Increased Levels of Nuclear SREBP-1c Associated with Fatty Livers in Two Mouse Models of Diabetes Mellitus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 42, p. 30028–30032, 15 out. 1999. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.42.30028>>. Acesso em: 17 jul. 2014.

SHIMOMURA, I.; MATSUDA, M.; HAMMER, R. E.; BASHMAKOV, Y.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. **Molecular cell**, v. 6, n. 1, p. 77–86, jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10949029>>.

STEWART, B. M.; BLOCK, J.; MORELLI, P.; NAVARETTE, a E.; AMSTALDEN, M.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J.; BILBY, T. R. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy

cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 7, p. 3437–3445, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-4008>>.

STROUD B. IETS 2012 Statistics and Data Retrieval Committee Report. 2012.

STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal reproduction science**, v. 9, n. 3, p. 210–216, 2012. Disponível em: <[http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v9n3/pag210-216\(AR510\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v9n3/pag210-216(AR510).pdf)>. Acesso em: 13 ago. 2014.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; DA SILVA RASCADO, T.; MAGALHÃES, L. C. O.; CROCOMO, L. F.; DE LIMA-NETO, J. F.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211–1220, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>>.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 1–11, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23053436>>. Acesso em: 12 ago. 2014.

SUDANO, M.; PASCHOAL, D.; MAZIERO, R. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Animal reproduction science**, v. 10, n. 3, p. 160–167, 2013. Disponível em: <[http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p160-167\(AR626\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v10n3/p160-167(AR626).pdf)>. Acesso em: 24 jul. 2014.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; FEIL, D.; ROBKER, R. L.; THOMPSON, J. G.; DUNNING, K. R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1632–41, maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365693>>. Acesso em: 11 jun. 2014.

TABOR, D. E.; KIM, J. B.; SPIEGELMAN, B. M.; EDWARDS, P. a. Transcriptional Activation of the Stearoyl-CoA Desaturase 2 Gene by Sterol Regulatory Element-binding Protein/Adipocyte Determination and Differentiation Factor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 34, p. 22052–22058, 21 ago. 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.34.22052>>. Acesso em: 21 jul. 2014.

TERRY MICHAEL SMITH. **The involvement of the sterol response element binding proteins in lipogenesis in the seb-1 sebaceous model system**. 2006. The Pennsylvania State University, 2006.

THIEDE, M. a.; OZOLS, J.; STRITTMATTER, P. Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 28, p. 13230–13235, 1986.

THOMPSON, J. G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L. T.; TERVIT, H. R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v. 118, n. 1, p. 47–55, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793625>>.

THOMPSON, J. G., PARTRIDGE, R. J., HOUGHTON F. D., C. C. I. and L. H. J. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal of reproduction and Fertility**, v. 106, p. 299–306, 1996. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/106/2/299.short>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

TOMINAGA, K.; SHIMIZU, M.; OYAMA, S.; IZAIKE, Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16-cell embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 1669–1680, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X0000306X>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

USHIJIMA, H.; YAMAKAWA, H.; NAGASHIMA, H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 2, p. 534–9, fev. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916025>>.

USHIJIMA, H.; YOSHIOKA, H.; ESAKI, R.; TAKAHASHI, K.; KUWAYAMA, M.; NAKANE, T.; NAGASHIMA, H. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. **The Journal of reproduction and development**, v. 50, n. 4, p. 481–6, ago. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15329481>>.

VIANA, J. H. M.; DE ALMEIDA CAMARGO, L. S.; DE MORAES FERREIRA, A.; DE SA, W. F.; DE CARVALHO FERNANDES, C. A.; DE PINHO MARQUES JUNIOR, A. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal reproduction science**, v. 84, p. 1–12, ago. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15302383>>. Acesso em: 13 ago. 2014.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. de A. Use of in vitro fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. SUPPL. 2, p. 661–674, 2010. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/38-suple-2/23_SBTE_JHENRIQUE.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2014.

VIUFF, D.; RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T.; OLSAKER, I.; WILLIAMS, J. L.; CALLESEN, H.; THOMSEN, P. D. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. **Biology of reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1273–8, jun. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330080>>.

WALES, R. G.; HUNTER, J. Participation of glucose in the synthesis of glycoproteins in preimplantation mouse embryos. **Reproduction, fertility, and development**, v. 2, n. 1, p. 35–50, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2333387>>.

WORGALL, T. S.; STURLEY, S. L.; SEO, T.; OSBORNE, T. F.; DECKELBAUM, R. J. Polyunsaturated Fatty Acids Decrease Expression of Promoters with Sterol Regulatory Elements by Decreasing Levels of Mature Sterol Regulatory Element-binding Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25537–25540, 2 out. 1998. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.40.25537>>. Acesso em: 21 jul. 2014.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 1, p. 8–18, 1999.

XU, J.; NAKAMURA, M. T.; HYEKYUNG, P.; CLARKE, S. D.; CHO, H. P. CARBOHYDRATES , LIPIDS , AND OTHER NATURAL PRODUCTS : Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 Expression Is Suppressed by Dietary Polyunsaturated Fatty Acids : A MECHANISM FOR THE COORDINATE SUPPRESSION OF LIPOGENIC GENES BY POLYUNSATURATED FATS Stero. 1999.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155–63, set. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829550>>.

ZHENG, Y.; PROUTY, S. M.; HARMON, a; SUNDBERG, J. P.; STENN, K. S.; PARIMOO, S. Scd3--a novel gene of the stearyl-CoA desaturase family with restricted expression in skin. **Genomics**, v. 71, n. 2, p. 182–191, 2001.