



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**



**METABOLISMO LIPÍDICO DE OÓCITOS E EMBRIÕES
BOVINOS - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO E DA
CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO**

CHRISTOPHER JÚNIOR TAVARES CARDOSO

Campo Grande – MS
2020

CHRISTOPHER JUNIOR TAVARES CARDOSO

**METABOLISMO LIPÍDICO DE OÓCITOS E EMBRIÕES
BOVINOS - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO E DA
CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO**

***LIPID METABOLISM OF BOVINE OOCYTES AND EMBRYOS -
EFFECTS OF SUPPLEMENTATION AND DEVELOPMENT KINETICS***

CHRISTOPHER JUNIOR TAVARES CARDOSO

Orientador: Fabiana de Andrade Melo-Sterza

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS
2020

Sumário

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
CAPÍTULO 1: METABOLISMO LIPÍDICO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO E DA CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO .	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. OBJETIVO GERAL.....	12
2.1. Objetivos específicos.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1. Produção in vitro de embriões.....	13
3.2. Cinética de desenvolvimento embrionário.....	15
3.3. Criopreservação de embriões	17
3.4. Metabolismo lipídico em oócitos e embriões	20
3.5. Efeitos da suplementação lipídica sobre atividade reprodutiva de fêmeas bovinas, viabilidade oocitária e qualidade embrionária.....	23
3.6. Metabolismo dos ácidos graxos nos ruminantes	25
3.7. Consumo e digestibilidade aparente de linhaça	28
4. Referências bibliográficas	31
CAPÍTULO 2: ALTERNATIVAS PARA INCREMENTO DA VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS DA RAÇA PANTANEIRA PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> E SUBMETIDOS A CRIOPRESERVAÇÃO.	41
1. Introdução	42
2. Material e métodos	43
3. Resultados.....	49
4. Discussão	52
5. Referências bibliográficas.....	56
CAPÍTULO 3: METABOLISMO LIPÍDICO E ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> COM DIFERENTES CINÉTICAS DE DESENVOLVIMENTO	63
1 Introdução.....	64

2	Material e métodos	66
3	Resultados.....	73
4	Discussão	77
5	Referências bibliográficas.....	82
6	ANEXOS:.....	87

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à pessoa que possibilitou a realização desse doutorado, minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Sterza. Muito obrigado por acreditar em mim desde o primeiro dia desta jornada, que se iniciou desde o período de iniciação científica na graduação. Acredito que muitas vezes se superou no trabalho e mais do que orientadora, foi companheira de laboratório, que lutou junto a mim na realização dos experimentos, sempre buscando respostas às todas as perguntas.

Agradeço também a quem sempre me orientou, ensinou e colaborou: ao professor Ériklis Nogueira, que possibilitou a realização de parte deste doutorado sempre estando presente nos experimentos, incentivando, cobrando e sempre tornando tudo mais fácil e prático. Sem duvidas foi uma honra conviver com esse grande professor, pesquisador e amigo.

À toda equipe do Departamento de Biologia Reprodutiva do Leibniz Intitute – For farm animal, em especial ao meu supervisor do estágio doutoral Ralf Poehland e a Bianka Drawert, que possibilitaram a realização dos experimentos na Alemanha, sempre ensinando, orientando e buscando fazer sempre o melhor em tudo.

Ao programa de Pós-graduação em Ciencias Veterinárias da UFMS. Agradeço a cada um dos professores do programa, pelo incentivo e apoio nas pesquisas realizadas.

Aos integrantes do grupo GENTRA. Ana Caroline Bini, Mirela Brochado, Mariane Gabriela, Wilian Leite, Daniela Morais pelo companheirismo de sempre e auxilio nos experimentos, direta ou indiretamente, proporcionando com que cada atividade fosse feita sem perder o humor.

Aos colegas acadêmicos de pós graduação: Nathalia Anache, Karine Casanova, que participaram colaborando tanto nas disciplinas quantos nos experimentos realizados e hoje como colegas de trabalho.

29 Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius de Oliveira Moraes pela orientação, e apoio nas
30 análises bromatológicas e nutricionais.

31 À Prof. Dra. Alda Izabel de Souza da Universidade Federal de Mato Grosso
32 do Sul – UFMS pela possibilidade da realização das análises dos metabólitos
33 sanguíneos.

34 Ao laboratório Embriosul, que deu suporte nos experimentos de produção de
35 embriões.

36 À UEMS e ao laboratório de biotecnologias da reprodução, por possibilitar a
37 realização dos experimentos na unidade.

38 À CAPES, FUNDECT e ao CNPq pela concessão das bolsas de estudo e
39 financiamento das pesquisas realizadas.

40 A todos que de uma maneira ou outra participaram da minha formação e
41 ajudaram na realização desse trabalho, o meu: Muito Obrigado!

42

RESUMO

CARDOSO, C.J.T. **Metabolismo lipídico de oócitos e embriões bovinos - efeitos da suplementação e da cinética de desenvolvimento**. 95p. Tese de Doutorado –Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

Os mecanismos pelos quais a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos gera embriões com excessivo acúmulo lipídico, diferenças metabólicas e padrões epigenéticos não estão totalmente elucidados. Também permanece desconhecido quando essas alterações acontecem, se acontecem desde a maturação oocitária ou após início da clivagem embrionária. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos suplementação lipídica e da cinética de desenvolvimento em oócitos e embriões produzidos *in vitro*. Para isso o trabalho foi dividido em 2 estudos: No estudo 1, intitulado “Suplementação lipídica para doadoras altera a qualidade de embriões submetidos a vitrificação” foram avaliados os efeitos da adição de linhaça na dieta de vacas Pantaneira sobre parâmetros digestivos e na produção *in vitro* de embriões submetidos a vitrificação. Foram analisados coeficientes de digestibilidade, perfil de metabolitos séricos, viabilidade oocitária, produção de embriões e criotolerância embrionária. A partir dos dados obtidos neste estudo, concluímos que a suplementação de 0,800 Kg/animal/dia de linhaça em grão, uma fonte rica em ácido linolênico, para fêmeas da raça Pantaneira incrementou a qualidade e criotolerância dos embriões produzidos *in vitro*. No estudo 2 intitulado “Metabolismo lipídico e atividade mitocondrial em oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* com diferentes cinéticas de desenvolvimento” analisou-se o conteúdo lipídico, atividade mitocondrial e a tri-metilação da H3K4 em oócitos e embriões bovinos em diferentes fases de desenvolvimento e concluímos que o acúmulo de lipídeos ocorre nas primeiras 4 horas da maturação *in vitro* de COCs de *Bos taurus*. Blastocistos rápidos apresentam maior conteúdo lipídico que os embriões lentos, sem interferência da atividade mitocondrial nessa fase. A H3K4me3 parece ser essencial para o desenvolvimento embrionário,

74 especialmente no que diz respeito as células do embrioblasto mas isso não parece
75 mediar a velocidade de desenvolvimento e metabolismo lipídico.
76 **Palavras-chave:** biotecnologia, criopreservação, lipidômica, metabolismo lipídico,
77 reprodução

ABSTRACT

CARDOSO, C.J.T. **Lipid metabolism of bovine oocytes and embryos - effects of supplementation and development kinetics.** 95p. Thesis - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

The mechanisms by which in vitro bovine embryo production (IVEP) generates embryos with excessive lipid accumulation, metabolic differences and epigenetic patterns are not fully understood. It also remains unknown when these changes occur, whether they occur since oocyte maturation or after embryonic cleavage begins. The present study aimed to evaluate the effects of lipid supplementation and developmental kinetics in oocytes and embryos produced in vitro. For this, the research was divided into 2 studies: in paper 1, entitled "Lipid supplementation for donors alters the quality of embryos submitted to vitrification", we evaluated the effects of adding flaxseed to the diet of Pantaneira cows on digestive parameters and in vitro production of embryos submitted to vitrification. We analyzed the digestibility coefficients, serum metabolite profile, oocyte viability, embryo production and embryonic cryotolerance. From the data obtained in this study, we conclude that the supplementation of 0.800 kg/animal/day of grain flaxseed, a rich source of linolenic acid, for females of the Pantaneira breed increased the quality and cryotolerance of embryos produced in vitro. In paper 2 entitled "Lipid metabolism and mitochondrial activity in bovine oocytes and embryos produced in vitro with different developmental kinetics", the lipid content, mitochondrial activity and H3K4 tri-methylation in bovine oocytes and embryos at different stages of development were analyzed and we conclude that the accumulation of lipids occurs in the first 4 hours of maturation in vitro of *Bos taurus* COCs. Fast blastocysts have a higher lipid content than the slow ones, without interference from mitochondrial activity in this stage. H3K4me3 appears to be essential for embryonic development, especially in regards to embryoblast cells, but this does not appear to mediate the speed of development and lipid metabolism.

108 Keywords: biotechnology, cryopreservation, lipidomic, lipid metabolism,
109 reproduction

CAPÍTULO 1: METABOLISMO LIPÍDICO DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS - EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO E DA CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção in vitro de embriões (PIV) é uma biotécnica muito bem estabelecida e que vem sendo aplicada com sucesso em nível comercial, principalmente no Brasil (MAPLETOFT, 2013). A utilização da PIVE tem se tornado cada vez mais comum, sendo utilizada não apenas para a multiplicação de material genético de alto valor, mas também com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva de rebanhos comerciais de leite e corte (comunicação pessoal).

Nesse sentido, já há alguns anos o Brasil ocupa o primeiro lugar no ranking mundial de produção de embriões, sendo responsável pela produção de 60% dos embriões PIV do mundo (VIANA et al., 2018). No entanto, a indústria de embriões PIV ainda apresenta alguns desafios a serem superados, sendo um deles, a criopreservação eficiente de embriões produzidos in vitro (VAJTA et al., 1998).

Os embriões PIV apresentam reduzida criotolerância quando comparado aos produzidos in vivo. Tal fato se deve, principalmente, ao seu excessivo conteúdo lipídico (SEIDEL, 2006; HORVATH et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; LAPA et al., 2011). Embora esse acúmulo lipídico intracitoplasmático seja prejudicial à criotolerância, tem um papel fisiológico importante, pois funciona como um reservatório potencial de energia para o desenvolvimento embrionário inicial, antes da ativação de seu próprio genoma (KIM et al., 2001; ZERON et al., 2001; STURMEY et al., 2009), e também atua na biossíntese da membrana plasmática (AARDEMA et al., 2011).

Outra possível explicação para o excessivo conteúdo lipídico é a ocorrência de anormalidades no metabolismo energético do embrião PIV, que afetam a função mitocondrial, levando ao decréscimo tanto na qualidade quanto na sobrevivência embrionária pós-criopreservação (SUDANO et al., 2011).

No entanto, o acúmulo de lipídios em oócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser alterados com a utilização de algumas estratégias, como por exemplo: o uso de agnetes delipidantes ao meio de cultivo do embrião (PASCHOAL et al, 2012; MOAWAD et al, 2013), redução da concentração de soro fetal bovino no meio de cultivo (SUDANO et al, 2011) e a alimentação das doadoras com dietas a base de ácidos graxos insaturados (FOULADI-NASHTA, 2007 e 2009; ZACHUT et al., 2010).

De toda forma, ainda não está claro o motivo e como ocorre esse acúmulo excessivo de lipídios em oócitos cultivados *in vitro*. Sabe-se que pode ser influenciado pelas condições e suplementos utilizados no meio de maturação *in vitro* (MIV), no qual os oócitos absorvem lipídios que serão esterificados em triacilgliceróis e ésteres de colesterol os quais são armazenados em gotas de lipídios citoplasmáticas na forma de lipídios neutros (KIM et al., 2001). Todavia, há uma grande necessidade em se compreender os mecanismos envolvidos na transferência e utilização dos lipídios por parte dos oócitos e embriões (BILBY et al., 2006).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos suplementação lipídica e da cinética de desenvolvimento na maturação oocitária e PIV de embriões produzidos *in vitro*.

2.1. Objetivos específicos

- 1- Identificar o efeito da suplementação lipídica de doadoras sobre a PIVE frescos e criopreservados.
- 2- Mensurar conteúdo lipídico, atividade mitocondrial e padrão da tri-metilação da H3K4 de oócitos bovinos submetidos à diferentes tempos de maturação *in vitro*.
- 3- Mensurar conteúdo lipídico, atividade mitocondrial e padrão da tri-metilação da H3K4 de embriões com diferentes cinéticas de desenvolvimento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção in vitro de embriões

A PIVE é compreendida por três etapas desenvolvidas em laboratório: maturação oocitária in vitro (MIV), fecundação in vitro (FIV) e o cultivo in vitro (CIV). A MIV de oócitos bovinos tem duração de 24 horas. Ao longo desse período os oócitos passam por diversas alterações nucleares e citoplasmáticas para que sejam capazes de ser fecundados e, subsequentemente venham a desenvolver-se até o estágio de blastocisto (LONERGAN et al., 2003). Durante seu desenvolvimento, o oócito encontra-se no estágio de diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa, até pouco antes da ovulação. O reinício da meiose in vivo pode ser observado por um estímulo hormonal (BILODEAU-GOESEELS, 2006). Nos processos in vitro os oócitos retomam à meiose após sua retirada dos folículos.

O reinício da meiose caracteriza-se pela quebra da vesícula germinativa, condensação da cromatina e formação do fuso da segunda divisão meiótica, seguindo pela extrusão do primeiro corpúsculo polar e a progressão da prófase I para a metáfase da segunda divisão meiótica (MII). Então, ocorre a segunda parada da meiose permanecendo até a fecundação (EPPIG, 2001). Esse processo ocorre tanto in vivo como in vitro, porém muitos oócitos maturados in vitro e que alcançam a metáfase II não possuem a mesma competência para se desenvolver em comparação aos oócitos maturados in vivo, pois não sofrem adequadamente o processo de capacitação (AVERY et al., 2002).

Acredita-se que a etapa de maturação seja crucial para que se tenha uma adequada aquisição da competência oocitária. É neste estágio que os oócitos adquirem sua competência para serem fecundados, mostrando sua capacidade máxima durante o desenvolvimento embrionário inicial, até que ocorra a transição materno-zigótica pela ativação do genoma embrionário. A maturação oocitária mostra-se essencial para produzir blastocistos de boa qualidade (RUSSELL et al., 2006).

A maioria dos laboratórios utiliza como meio de maturação in vitro para oócitos bovinos o Tissue Culture Medium (TCM). Existem poucos relatos sugerindo que outro meio possa ser mais adequado (GONÇALVES et al., 2002). Este meio

base geralmente é suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17 β , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (LONERGAN et al., 1994). A maturação deve ser realizada em uma incubadora que mantenha uma atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007).

A maioria dos laboratórios utiliza sêmen congelado para a etapa de fecundação in vitro. Após o descongelamento é preciso selecionar os espermatozoides vivos e capacitá-los in vitro. Esta seleção pode ser realizada por dois métodos diferentes: gradiente descontínuo Percoll (GALLI & LAZZARI, 1996) e swim-up (PARRISH et al., 1995). O método de gradiente descontínuo Percoll é o mais antigo e utilizado, onde o sêmen é depositado sobre duas camadas de densidades diferentes (45% e 90%) e submetido a centrifugação (GARCÍA-HERREROS & LEAL, 2014), proporcionando maior recuperação de espermatozoides moveis com maior qualidade (SOMFAI et al., 2002), além de ser considerado rápido é um dos métodos mais eficazes para remover o plasma seminal e diluentes crioprotetores (LEE et al., 2009). Já o método Swim-up consiste na separação dos espermatozoides através da natação, proporcionando taxas de recuperação menores de espermatozoides móveis, devido às muitas camadas de sêmen nos níveis mais baixos do sedimento que podem bloquear as possibilidades de alcançar o meio (CESARI et al., 2009).

Segundo alguns autores, o meio mais utilizado para a fecundação in vitro é o Fert-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), o qual contém agentes que promovem a capacitação espermática, como a heparina. Já o meio Sperm-TALP é uma solução eletrolítica e frequentemente usada como um meio para induzir a capacitação dos espermatozoides (BURANAAMNUAY 2013). Há outros fatores significativos para a motilidade progressiva e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina. O tempo de co-incubação dos oócitos e espermatozoides pode variar por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 39 °C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Para isso, os espermatozoides são acrescentados nas gotas de meio de fecundação contendo

os oócitos maduros. A dose inseminante possui uma concentração final que pode variar de 1 a 5×10^6 espermatozoides vivos/mL (IRITANI & NIWA, 1977).

Após a fecundação os prováveis zigotos são transferidos para o cultivo embrionário. São utilizados nessa fase os meios semi-definidos como CR-1, CR-2, KSOM e Synthetic Oviductal Fluid (SOF), meio de cultivo celular 199 (TCM-199) e meio Ham's F-10 TCM 199.

O meio mais utilizado nos laboratórios é o SOF, suplementado com proteínas, substâncias energéticas, aminoácidos essenciais e não essenciais. Em geral, os meios utilizados para o cultivo embrionário são suplementados com uma fonte proteica tal como soro fetal bovino, soro sintético quimicamente definido, e albumina sérica bovina (HOLM et al., 1999).

Os prováveis zigotos permanecem em ambiente controlado por sete dias, ou até atingirem o estágio de blastocisto, período em que estão aptos a serem transferidos para receptoras, ou serem criopreservados em temperatura de 38,8 °C com atmosfera controlada em baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) ou alta tensão de oxigênio (5% de CO₂, em ar (20% de O₂)), e umidade saturada (HOLM et al., 1999).

3.2. Cinética de desenvolvimento embrionário

A embriocinética conhecida como a cinética de desenvolvimento embrionário, pode ser uma ferramenta de fácil aplicação para aumentar a acurácia na seleção. Essa análise já é utilizada como marcador não invasivo para humanos. Sistemas de incubadoras com time-lapse têm sido utilizados em algumas clínicas para registrar o desenvolvimento embrionário, sem tirar o embrião do ambiente controlado, e fazer a melhor seleção com base nos parâmetros morfo-cinéticos (GARDNER & KELLEY, 2018). A maioria desses sistemas funciona com uma câmera programada para fazer um registro fotográfico dos embriões em cultivo em intervalos de horários pré-determinados, permitindo avaliar precisamente cada etapa do desenvolvimento embrionário.

Ainda com a ausência de uma câmera de time-lapse, observações em determinados momentos podem auxiliar a classificar os embriões de acordo com a

261 velocidade de clivagem e morfologia, permitindo a criação de parâmetros e modelos
262 capazes de correlacionar a velocidade dos primeiros ciclos celulares com taxa de
263 implantação e prenhez (BANG et al., 2013).

264 O tempo de divisão celular, o intervalo do ciclo celular e a sincronia do ciclo
265 celular são sugeridos como marcadores da qualidade do embrião humano
266 (HERRERO et al., 2013). A correlação entre morfocinética e grau morfológico do
267 embrião é observada quando se examina o tempo necessário para atingir o estágio
268 de 2 células, o desaparecimento dos pronúcleos nos dias 2 e 3 e a sincronia do
269 estágio de 2 a 4 células. De fato, o tempo para atingir o estágio de 4 células é o
270 preditor mais significativo de formação de blastocisto e boa morfologia (CRUZ et
271 al., 2012). Por outro lado, a formação de blastocisto não é necessariamente a
272 melhor métrica para implantação: Imagens de time-lapse revelaram que uma faixa
273 intermediária, ótima de divisão celular para o estágio de 5 células se correlacionou
274 melhor com a capacidade de um embrião de implantar e resultar em prehez
275 (MESEGUER et al., 2011). Da mesma forma, os embriões com maior probabilidade
276 de implantação estavam no estágio de 4 células entre 33,1 e 57,2 horas após
277 injeção intracitoplasmática de espermatozóides (CHAMAYOU et al., 2013).

278 Em bovinos, a avaliação não invasiva pelo time-lapse já obteve resultados
279 positivos no aumento da taxa de prenhez (SUGIMURA et al., 2012), mas ainda sem
280 conseguir atingir escala comercial. Foi observado que blastocistos oriundos de
281 clivagens iniciais rápidas tinham taxa de apoptose celular inferior aos de clivagens
282 lentas (VANDAELE et al., 2006). Em contrapartida, maior taxa de bloqueio
283 embrionário (GARCIA et al., 2015), maior número de anormalidades
284 cromossômicas (PERS-KAMCZYC et al., 2012), padrões de expressão gênica
285 irregulares (LONERGAN et al., 2000; GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2004), foram
286 observados em embriões com clivagens tardias.

287 Entretanto, estudos mais recentes relatam que embriões que clivam mais
288 rápido não necessariamente são os melhores para transferência (MILAZZOTTO et
289 al., 2016). Os aspectos negativos das clivagens rápidas podem estar ligados, por
290 exemplo, à perda de imprinting genômico (VELKER et al., 2012).

Em outro estudo, foi observado que a morfocinética correlaciona-se com maior atividade da enzima caspase em embriões de clivagem lenta (2-4 células às 45 horas pós-inseminação) em comparação com os de clivagem mais rápida (5-8 células às 45 horas pós-inseminação), sugerindo que um processo de seleção de células mais rigoroso ocorre em embriões lentos (VANDAELE et al., 2007).

Há relatos de que a velocidade com que os zigotos passam por seus ciclos mitóticos durante a clivagem também influencia fortemente o desenvolvimento futuro (GARCIA et al., 2015).

A morfocinética também tem sido sugerida como marcador metabólico em diversas espécies como em camundongos, búfalos e bovinos (ISOM et al., 2012; LEESE, 2012). Um embrião metabolicamente mais ativo pode ser um sinal de danos no DNA que levam a ativação prematura do genoma e diminuição de qualidade do embrião (BAUMMANN et al., 2007). Além disso, foi observado que os embriões mais viáveis são os que apresentam menor metabolismo, menor índice glicolítico, menor turnover de aminoácidos e altos níveis de enzimas antioxidantes (LEESE et al., 2002).

Estas características são sugeridas como sendo derivadas do oócito, uma vez que durante as primeiras divisões (usadas para a classificação da cinética) o embrião utiliza principalmente o estoque materno de mRNAs e proteínas (ZENG & SCHULTZ, 2005).

3.3. Criopreservação de embriões

O processo de criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos em baixas temperaturas por tempo indeterminado. Para alcançar isto, é necessário eliminar duas causas principais de morte celular associada com a criopreservação – a formação de cristais e as concentrações letais de solutos, enquanto se mantém a capacidade funcional das organelas intracelulares (EDGAR E GOOK, 2012).

Embrião congelado representa a maneira mais simples, eficiente, segura e de baixo custo para o transporte de material genético. A criopreservação de embriões produzidos in vivo já está bem estabelecida e apresenta taxa de prenhez

semelhante às obtidas com embriões frescos, mas esse método não é eficiente para embriões PIVE (SUDANO et al., 2013).

Todos os embriões sofrem consideráveis injúrias morfológicas e funcionais durante a criopreservação, mas a extensão dos danos assim como as diferenças nas taxas de sobrevivência e desenvolvimento pós-criopreservação podem variar de acordo com fatores como a espécie, o tipo de embrião, o método de congelamento, a idade e o estágio de desenvolvimento, o ambiente de cultivo, o sexo, dentre outros (LEME, 2017).

As injúrias causadas aos embriões, durante os processos de criopreservação e reaquecimento ocorrem principalmente devido à formação de cristais de gelo intracelulares, concentração de soluto resultante do processo de desidratação e choque osmótico (PEREIRA & MARQUES, 2008).

Atualmente, duas técnicas de criopreservação para oócitos e embriões são utilizadas: congelação e vitrificação. Independentemente da técnica, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores que possuem a função de proteger as células e tecidos durante a congelação e a descongelação (NIEMANN, 1991). Porém, a toxicidade e o choque osmótico estão associados com a utilização dos crioprotetores, mas quando se utilizam baixas concentrações, a prevenção da formação de cristais de gelo é limitada (PEREIRA & MARQUES, 2008).

O congelamento clássico é utilizado em bovinos, principalmente, para a criopreservação de embriões produzidos in vivo. Esse método tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, mas isso permite a formação de cristais de gelo, que em maior ou menor escala resultarão em lesões às membranas e organelas (EDGAR & GOOK, 2012).

Na vitrificação se utilizam altas concentrações de crioprotetores, que formam uma solução viscosa, e durante o resfriamento fazem com que a água da célula se solidifique em estado vítreo, sem se expandir, inibindo a formação de cristais de gelo (VAJTA E NAGY, 2006). Entretanto, a toxicidade dos crioprotetores é tão elevada, que as células só podem ser expostas a essa solução por um período muito curto de tempo e/ou um volume mínimo de solução (EDGAR E GOOK, 2012).

Essa técnica tem sido empregada principalmente para embriões produzidos in vitro, pois estes são mais sensíveis a diminuição de temperaturas do que os produzidos in vivo. Alguns estudos demonstram que esta técnica de criopreservação pode ser utilizada com sucesso para embriões bovinos sem a redução significativa das taxas de prenhez (DOBRINSKY, 2002).

Alguns autores, relatam que o principal sítio de injúria é a membrana citoplasmática (particularmente sua porção lipídica), e o estresse osmótico é o principal responsável. Isso ocorre, pois as células e seus compartimentos são submetidos a mudanças bruscas de volume devido à movimentação de água e crioprotetores intracelulares. Portanto, células com membranas plasmáticas mais flexíveis e também mais permeáveis irão usualmente sofrer menos danos nesse sítio (SEIDEL, 2006).

No entanto, acredita-se que a baixa criotolerância do embrião PIVE seja de caráter multifatorial, estando relacionada com o seu conteúdo e composição lipídica, o metabolismo do embrião, o padrão global de expressão gênica e a apoptose (revisado por Sudano et al. 2013). Estudos têm sido realizados buscando a redução da quantidade de lipídios citoplasmáticos e a consequente melhora da criotolerância. Entre as metodologias estudadas pode-se citar: uso de suplementos ao meio de cultivo do embrião (PASCHOAL et al, 2012; MOAWAD et al, 2013), redução da concentração de soro fetal bovino no meio de cultivo (SUDANO et al, 2011) e a alimentação das doadoras com dietas a base de ácidos graxos insaturados (FOULADI-NASHTA, 2007 e 2009; ZACHUT et al., 2010).

Tendo em vista aumentar a fluidez de membrana dos embriões, diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de aumentar o grau de insaturação dos lipídeos da membrana celular através da incorporação de ácidos graxos polinsaturados. Uma das abordagens seria a suplementação dos ácidos graxos polinsaturados diretamente no meio de cultivo embrionário, como no caso do uso do ácido linoléico conjugado (PEREIRA et al., 2008) de embriões bovinos PIV. Outra abordagem seria através do manejo nutricional das doadoras fornecendo uma dieta rica em ácidos graxos polinsaturados visando a incorporação do mesmo

na membrana celular de oócitos (ZERON et al., 2002) e embriões (KOJIMA et al., 1996).

Por outro lado, outros autores afirmam que a principal característica dos embriões PIV possuírem maior sensibilidade à criopreservação esta relacionada à qualidade do embrião e pela quantidade de lipídio existente em seu citoplasma. ABE et al (1999) concluíram que o lipídio existente num embrião é, em grande parte, derivado do triglicerídeo contido nas lipoproteínas séricas. Em função disso, alterações morfológicas, ultraestruturais e metabólicas ocorrem entre os embriões produzidos em sistemas definidos e indefinidos (ABE et al., 2002). Desta forma, embriões cultivados in vitro na ausência de SFB aparentemente são mais criotolerantes que aqueles cultivados em meio contendo SFB (RIZOS et al., 2003).

Vários compostos como a norepinefrina, o dibutiril cAMP, o isoproterenol, o etosulfato de fenazina (PES), l-carnitina (CHANKITISAKUL et al., 2013) e o forskolin (PASCHOAL et al., 2016) são capazes de reduzir o conteúdo lipídico de embriões. Men et al. (2006) & Seidel Jr. (2006) demonstraram que a redução do conteúdo lipídico citoplasmático dos embriões utilizando tanto o PES, como o forskolin, aumentou a criotolerância de embriões bovinos cultivados na presença de soro.

Com o uso do forskolin a atividade lipolítica dos embriões PIVE foi significativamente aumentada. Este fato indica que o uso do forskolin durante o cultivo de embriões PIV poderia resultar na produção de embriões com conteúdo lipídico semelhante ao observado em embriões produzidos in vivo, o que melhoraria sua resistência a criopreservação (MEN et al., 2006).

Ao encontrar alternativas que incrementem a eficiência da criopreservação de embriões produzidos in vitro, será possível tornar mais eficaz os programas de multiplicação do material genético, já que além de aumentar as taxas de prenhez, permitirá um uso mais racional das receptoras de embriões.

3.4. Metabolismo lipídico em oócitos e embriões

Em nível celular, os lipídios funcionam como fonte de energia e são componentes críticos para sua estrutura física e funcional. O conteúdo e a

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

Os lipídios presentes em maior quantidade nos oócitos e embriões são os triacilgliceróis (TAG), frequentemente localizados em gotas lipídicas no citoplasma (FERGUSON & LEESE, 1999). A gota lipídica é composta por um núcleo hidrofóbico de lipídios neutros, tais como TAG e ésteres, rodeados por uma parte anfipática formada por uma monocamada de fosfolipídios, colesterol e proteínas (MARTIN et al., 2006). Os TAG são formados na membrana microssomal do retículo endoplasmático (RE), local onde ocorre a formação das gotas, e são compostos por um glicerol que tem seus três grupos hidroxilas esterificados por três ácidos graxos, saturados ou insaturados.

Quando ocorre demanda energética, os ácidos graxos são metabolizados na mitocôndria mediante oxidação (DUNNING et al., 2010; DUNNING et al., 2014). O ácido graxo que irá se oxidar pode ser proveniente da quebra da gota lipídica mediante lipases ou da biossíntese celular. O precursor da síntese de ácidos graxos é o acetil-CoA que, mediante a enzima acetil-CoA descarboxilase (ACACA), é convertido em Malonil-CoA e este por sua vez em ácido graxo mediante a ação da ácido graxo sintase (FASN).

Em caso de requerimento energético, o ácido graxo sofre ação enzimática mediada pela acil-CoA sintetase gerando as acil-CoA. Nessa forma, são transportados para dentro das mitocôndrias pela carnitina palmitoil transferase 1B (CPT1B), processo esse facilitado pela ligação da molécula de acil-CoA com a L-carnitina (NELSON e COX, 2002).

Uma vez no interior das mitocôndrias, a enzima CPT2 desliga a L-car da molécula de acil-CoA, a qual entra para a via da β -oxidação e é convertida em acetil-CoA para ser metabolizada no ciclo do ácido carboxílico e fosforilação

oxidativa, gerando ATP. Portanto, a enzima CPT1B limita a taxa de β -oxidação e requer a L- car como cofator (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), já que sua ligação com a molécula de acil-CoA torna-se necessária para o transporte do complexo acil-carnitina-CoA até o interior da mitocôndria.

É bem conhecido que o complexo cumulus-oócito é um complexo dinâmico onde existem diversas vias de comunicação celular. Por ser assim, pouco se sabe acerca das necessidades metabólicas do oócito na maturação, ou do papel das células do cumulus no metabolismo energético (DEL COLLADO et al., 2015).

Por exemplo, sabe-se que o oócito é incapaz de metabolizar a glicose, e que são as células do cumulus que realizam a função glicolítica (KHURANA & NIEMANN, 2000; THOMPSON et al., 2000; CETICA et al., 2002) e que só ira se estabelecer no embrião a partir da compactação. Nessa via, enzimas como a fosfofrutoquinase (PFK) e a glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) tem maior atividade nas células do cumulus comparado ao oócito (CETICA et al., 2002). Assim, o modelo de entendimento atual propõe que as células do cumulus fornecem produtos do metabolismo da glicólise, como piruvato e lactato, ao oócito para metabolização mediante a fosforilação oxidativa.

Vale ainda ressaltar a importância de outra via do metabolismo energético durante a maturação, a beta-oxidação. A beta-oxidação dos ácidos graxos é um processo oxidativo cerca de três vezes mais eficiente em gerar ATP do que a glicólise (DUNNING et al., 2010).

Como mencionado, é claro o fato de que na PIVE bovinos existe um maior acúmulo de lipídico pelo embrião quando comparado ao processo *in vivo* (RIZOS et al., 2002). O aumento de lipídeos neutros durante a PIVE é normalmente relacionado com a utilização do SFB nos meios de cultivo, provocando a baixa criotolerância desses embriões (ABE et al., 2002). Os ácidos graxos intracitoplasmáticos penetram nas membranas dos blastocelos, mudando sua composição e as fazendo menos resistentes a esta técnica (MUCCI et al., 2006). Autores apontam que esses lipídeos danificam os mecanismos celulares responsáveis por reparar as membranas plasmáticas depois da criopreservação (MUCCI et al., 2006; GOMEZ et al., 2008).

3.5.Efeitos da suplementação lipídica sobre atividade reprodutiva de fêmeas bovinas, viabilidade oocitária e qualidade embrionária

Uma melhora aparente na fertilidade tem sido associada a suplementação lipídica (ADAMIAK et al., 2006). Atualmente, tem-se destacado a importância da inclusão de duas famílias de ácidos graxos essenciais na alimentação: Ômega 3 (n-3) e Ômega 6 (n-6), também conhecido por ácido linolênico e linoléico, respectivamente. Esses ácidos são denominados essenciais, pois devem ser fornecidos a partir da alimentação, já que o organismo não é capaz de produzi-los (WATHES et al., 2007).

A suplementação de PUFAs na dieta de bovinos têm influência no crescimento folicular e na ovulação, incluindo efeitos sobre liberação de GnRH, na síntese e liberação de FSH, LH e GH, além de promoverem também alterações no metabolismo dos esteróides (ABAYASEKARA e WATHES, 1999; WEBB et al., 2004).

Aumento da concentração de progesterona (LOPES et al., 2009), melhora da qualidade embrionária (CERRI et al., 2004) e supressão de sinais luteolíticos nas proximidades do reconhecimento materno da gestação (MATTOS et al., 2000), foi observado quando se suplementou os animais com PUFAs.

Aumento no número de folículos de tamanho médio e aumento do tamanho do folículo dominante foram observados quando se adicionou gordura na dieta (De FRIES et al., 1998), o que torna favorável à realização da OPU-PIVE. Por outro lado, pode-se verificar que a alteração na dinâmica folicular com a utilização na dieta de ácidos graxos poli-insaturados é acompanhada de mudanças nas concentrações sanguíneas de insulina, colesterol, GH e nas concentrações intrafoliculares de IGF-I e HDL-colesterol (THOMAS e WILLIAMS, 1996).

Os oócitos utilizam-se dos ácidos graxos como fonte de energia durante a maturação e ao longo do período de desenvolvimento embrionário, porém, alterações na composição de ácidos graxos nos oócitos podem melhorar tais eventos (KIM et al., 2001).

Os oócitos de fêmeas bovinas possuem grande quantidade de lipídios, aproximadamente 20 vezes maior que a quantidade encontrada em oócitos de ratas e, sua distribuição encontra-se da seguinte maneira: aproximadamente 50% de triglicerídios, 20% de fosfolipídios, 20% de colesterol e 10% de ácidos graxos livres. Dentre a fração fosfolipídica, os ácidos graxos saturados (C16:0 = 25% e C18:0 = 16%) estão em maior quantidade do que os PUFA (C18:2; 5-8% e C20:4; 1-3%) (McEVOY et al., 2000).

O perfil lipídico dos oócitos de bovinos já é bem estabelecido, porém, pouco se sabe sobre como os folículos e os oócitos absorvem esses AG. Outro desafio, é saber como nutrição com esses AGs modificam esses compartimentos reprodutivos e como alteram o desenvolvimento após a fertilização (ADAMIAK et al., 2006).

O efeito dos PUFA sobre o desenvolvimento dos complexos cumulus-oócito pode ser parcialmente mediado a partir de alterações na composição do fluido folicular, que consiste no microambiente que cerca os oócitos durante seu crescimento e maturação (FOULADI-NASHTA et al., 2009). Isto porque o perfil de ácidos graxos do fluido folicular pode ser correlacionado com o tipo e quantidade de PUFA fornecidos na alimentação (CHILDS et al., 2008).

Alguns estudos apontam para que a qualidade do oócito esteja relacionada à composição de ácidos graxos, especialmente da fração fosfolipídica (McEVOY et al., 2000). Os fosfolipídios são os principais componentes das membranas celulares, sendo que estas recebem influência do número, posição da dupla ligação e do comprimento da cadeia dos ácidos graxos interferindo diretamente nas suas propriedades (STUBBS & SMITH, 1984), contribuindo para a fluidez da mesma e melhorando o processo de criopreservação.

Já foi observado que a adição de ácidos graxos poli-insaturados na dieta de doadoras, favorecem a criopreservação dos embriões (LEÃO et al., 2015), pois a maior quantidade desses ácidos na membrana plasmática eleva a fluidez da mesma (STUBBS & SMITH, 1984). E, de acordo com (ZERON et al., 2002), a maior fluidez aumenta a eficiência de troca da água intracelular pelo crioprotetor, favorecendo a proteção do embrião.

3.6. Metabolismo dos ácidos graxos nos ruminantes

Na dieta dos ruminantes, os lipídios encontram-se principalmente na forma esterificada como mono e diglicerídeos em forragens, e como triglicerídeos nos alimentos concentrados (VAN SOEST, 1994). Plantas forrageiras geralmente contêm pequena quantidade de lipídios, com valores de 3,0 a 6,0% para a maioria das espécies. Já as sementes oleaginosas e os óleos vegetais possuem maiores teores de lipídios, com valores de 18 a 50% e 80 a 95%, respectivamente (MILINSK, 2007).

O ambiente ruminal é responsável por algumas transformações nos lipídios da dieta, alterando a composição e o perfil de ácidos graxos que chega ao duodeno devido aos processos bioquímicos (FRANCO, 2007). No rúmen, a degradação lipídica envolve dois processos: lipólise e biohidrogenação, ambos realizados por microrganismos tornando a digestão dos lipídios mais complexa, e fazendo com que boa parte dela ocorra antes que a digesta atinja o intestino delgado (VAN SOEST, 1994).

O processo de lipólise consiste na quebra das ligações éster encontradas nos lipídios dos alimentos da dieta seguida pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (AGI), a qual reduz o número de duplas ligações de AGI advindos das fontes de gordura (JENKINS, 1993). A hidrólise é predominantemente realizada pelas bactérias ruminais, sendo geralmente alta (>85%) e podendo ser influenciada por alguns fatores, como o nível de gordura na ração, pH ruminal e a utilização de ionóforos, que podem inibir a atividade e crescimento de bactérias (DOREAU & CHILLIARD, 1997) e os produtos gerados são ácidos graxos e glicerol, sendo o último fermentado a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Os AGCC são produzidos em grandes quantidades pelos ruminantes e são formados por cadeias de um a sete átomos de carbono, sendo os principais o acético, o propiônico e o butírico (BERGMAN, 1990).

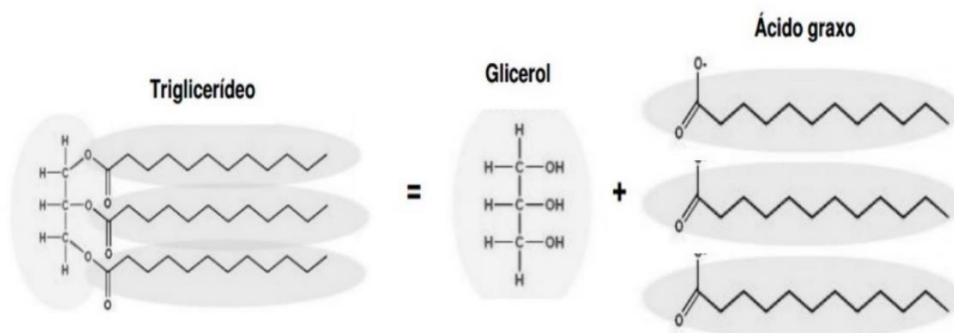


Figura 1: Esquema da lipólise em triacilglicerídeos (Adaptado de ROSA, 2014).

A velocidade da lipólise é rápida e este pode ser um fator limitante que, possivelmente, evite a formação de excessivas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados livres, que normalmente interferem na digestão das fibras e inibem a biohidrogenação (ROSA, 2014).

A biohidrogenação é a inserção de átomos de hidrogênio nas ligações insaturadas (duplas), tornando-as saturadas (CHURCH, 1993), e tem como teoria o papel de proteger os microrganismos ruminais do efeito deletério dos ácidos graxos insaturados. Esses ácidos têm a capacidade de se incorporar nas membranas celulares dos microrganismos interferindo na sua permeabilidade e fluidez, e/ou de recobrir as partículas dos alimentos formando uma barreira física a ação dos microrganismos. Portanto, a inclusão de altas quantidades de lipídios na dieta (acima de 7,0% da MS) pode comprometer o desempenho animal e a digestibilidade da fibra pelos efeitos deletérios citados acima (JENKINS, 1993; KOZLOSKI, 2011).

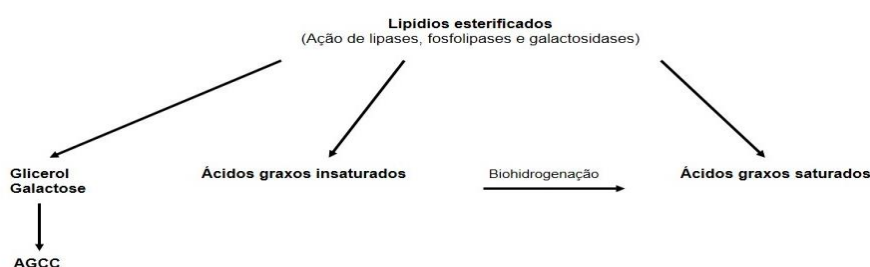


Figura 2: Esquema do metabolismo de lipídios em ruminantes (Adaptado de Kosloski, 2011)

Após a hidrólise os ácidos graxos poli-insaturados tornam-se então, disponíveis à ação microbiana para o processo de biohidrogenação, que se inicia

pela isomerização da ligação *cis*-12 dos ácidos linoleico e linolênico à ligação *trans*-11, que quando resultando do ácido linolênico, formam AG *cis*-9, *trans*-11, ou ácido linoleico conjugado (CLA). Em seguida, a dupla ligação *cis*-9 é hidrogenada, produzindo C18:1 *trans*-11 e C18:2 *trans*-11, *cis*-15 para os ácidos linoleico e linolênico, respectivamente. O C18:2 *trans*-11, *cis*-15 sofre uma hidrogenação na dupla ligação *cis*-15, produzindo também C18:1*trans*-11, o qual é também é hidrogenado na C18:1 *trans*-11, resultando em ácido esteárico C18:0. No entanto, a bio-hidrogenação não é completa, resultando em alta concentração de CLA (PENNINGTON & DAVIS, 1975).

As bactérias envolvidas na biohidrogenação têm sido classificadas em dois grupos A e B, de acordo com o padrão metabólico (KEMP & LANDER, 1984). O grupo A hidrogena os ácidos linoleico e linolênico somente a C18:1 *trans*-11, e o grupo B é capaz de hidrogenar ácidos graxos monoinsaturados a ácido esteárico. Quando ocorre biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen, os ácidos graxos da dieta sofrem mudanças em sua estrutura química, e o perfil de ácidos graxos que passam pro abomaso é alterado, sendo que para comprovar a biohidrogenação completa de AG, maiores concentrações de ácido esteárico (C18:0) teriam que ser encontradas na digesta abomasal comprovando tal condição (HAVERTINE & ALLEN, 2006).

Nesse caso, a biohidrogenação pode ser menos dependente da concentração de hidrogênio (H) no rúmen, onde somente 1 a 2% do H metabólico é usado para este processo (CZERKAWSK, 1984). Por outro lado, esse processo contribui para a retirada de ions H⁺ do ambiente ruminal, evitando seu acúmulo, e para a redução da produção de metano (CH₄) pelas bactérias metanogênicas, uma vez que estas consomem H, aumentando dessa forma a eficiência energética da dieta de todas as duplas ligações são completamente convertidas em ligações simples, e os ácidos graxos são saturados. Enquanto a maioria dos ácidos graxos são modificados através do metabolismo ruminal, a hidrogenação não é normalmente completa, e ampla variedade de ácidos graxos são resultantes de uma biohidrogenação incompleta (BYERS & SCHEHING, 1993).

Aproximadamente 10% dos ácidos graxos poli-insaturados escapam da biohidrogenação ruminal, chegando ao duodeno, basicamente, pequenas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, ácidos graxos saturados, e lipídios microbianos. Essa pequena quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que passa pelo rúmen parece ser suficiente para atender às exigências dos ruminantes, pois os mesmos parecem não apresentar deficiências desses ácidos graxos (CAVALIERI et al., 2005). Todavia, sabe-se que as membranas das células animais necessitam de ácidos graxos insaturados para manter sua estrutura, fluidez e função

Para reduzir a biohidrogenação e assim, aumentar a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que chegam ao intestino delgado é necessário fornecer dietas ricas nestes ácidos, mas também, dietas que elevem o pH ruminal (OLIVEIRA et al., 2004).

Os microrganismos responsáveis pela biohidrogenação são as bactérias celulolíticas, por serem as mais afetadas pela suplementação com gordura e diminuição do pH (PALMQUIST E JENKINS, 1980). Da mesma forma, estudos realizados por Harfoot e Hazlewood (1997), substituindo fibra por carboidrato de rápida degradação ruminal na dieta, verificaram redução nas taxas de lipólise de biohidrogenação, reafirmando a hipótese de ação dos microrganismos celulolíticos sobre o processo de biohidrogenação.

Os ácidos graxos poli-insaturados podem ser oferecidos na dieta com o uso de sementes de oleaginosas como soja, canola, girassol e linhaça. Essas sementes são bastante interessantes pelas altas concentrações de lipídios e por apresentarem taxa de liberação desejáveis de óleo, que ocorre quando o animal tritura o alimento pela mastigação (COPPOCK & WILKS, 1991).

3.7. Consumo e digestibilidade aparente de linhaça

A linhaça é uma excelente fonte de ácidos graxos ômega-3, que são conhecido por ser anti-carcinogênico, por evitar doenças cardiovasculares, e por aumentar a atividade visual (WRIGHT et al., 1998). No entanto, diversos estudos

vêm sendo realizados para determinar o consumo de linhaça para ruminantes e seus efeitos sobre o consumo de digestibilidade de outros nutrientes

Alimentando com até 15% da MS total com linhaça, não foi observado nenhum efeito sobre a ingestão de matéria seca de vacas leiteiras em lactação (KENNELLY & KHORASANI, 1992). Além disso, vacas leiteiras suplementadas com sementes de linhaça tratadas com formaldeído a 10% na matéria seca, tiveram ausência de efeitos no consumo de matéria seca em comparação com sais de cálcio de ácido palmítico, porém, foi observado aumento nas concentrações de proteína e ácido linolênico no leite (PETIT et al., 2002), o que sugere uma melhor utilização do nitrogênio na dieta de linhaça.

Enriquecendo a dieta com linhaça inteira, vacas leiteiras apresentaram menor digestibilidade de MS e fibra do que aquelas alimentadas com soja micronizada ou Megalac. Os autores sugeriram que a soja micronizadas e Megalac pode ser completamente substituído por linhaça como fonte de gordura na dieta de vacas em início de lactação sem qualquer efeito adverso na produção e que a linhaça aumenta o percentual de proteína de leite e a sua relação de ácidos linolênico:linoleico (PETIT et al., 2003).

Em outro estudo, observaram que o fornecimento de 10% de semente de linhaça na dieta para vacas primíparas em lactação causou aumento na digestibilidade do extrato etéreo, sem haver alteração na digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro (OBA et al. 2009).

De maneira semelhante, Silva et al. (2007), suplementaram vacas leiteiras no início da lactação com dietas contendo 12% de semente de linhaça e verificaram aumento na digestibilidade da proteína bruta e do extrato etéreo, com diminuição da digestibilidade da fibra em detergente ácido.

No entanto, a digestibilidade dos nutrientes depende de diversos fatores. A digestibilidade da fibra está associada aos processamentos físicos que a semente de linhaça sofre, como a moagem, que facilita o acesso dos microrganismos ruminais às partículas do suplemento fornecido, diferentemente quando fornecida na forma de grão. Para Doreau et al., (2009) o efeito da semente de linhaça é

dependente da quantidade fornecida, devido à alteração na taxa de passagem e baixa ingestão de matéria seca.

Os processos digestivos nos ruminantes sofrem influência do tamanho de partícula do alimento e de seu fluxo pelo rúmen. A redução do tamanho de partícula dos grãos aumenta efetivamente a área de contato superficial tornando as frações mais susceptíveis à digestão. No entanto, o conhecimento da degradabilidade ruminal de sementes de oleaginosas ainda é restrito.

Outra maneira de fornecer a linhaça aos animais é na forma de óleo. Porém, a adição de óleos vegetais na forma in natura na dieta de bovinos pode causar alterações na atividade ruminal, pois a alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados afeta alguns microrganismos, principalmente bactérias Gram (+), metanogênicas e protozoários (PALMQUIST e MATTOS, 2011), causando prejuízos no desempenho dos animais.

Além disso, o óleo presente nas dietas pode reduzir a digestibilidade da fibra, pois, o recobrimento das partículas dos alimentos pelo óleo impede que os microrganismos degradem a fração fibrosa, reduzindo a taxa de passagem dos alimentos e diminuindo o consumo de matéria seca; o que também prejudica o desempenho (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

A utilização de óleos protegidos da degradação ruminal, através da adição de sais de cálcio ou na forma de grãos de oleaginosas, pode evitar esses efeitos deletérios sobre a atividade ruminal. Os óleos protegidos passam pelo rúmen quase de forma inerte, sendo pouco dissociados dentro dele, e não prejudicam a atividade dos microrganismos ruminais (PALMQUIST e MATTOS, 2011). Outro benefício dos óleos protegidos é que, por se tornarem sólidos, facilitam a sua utilização em fábricas de ração e aumentam a homogeneização com outros ingredientes do concentrado.

703 **4. Referências bibliográficas**

- 704 AARDEMA, H.; VOS, P.L.A.M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B.A.J.; KNIJN, H.M.;
705 VAANDRAGER, A.B.; HELMS, J.B.; GADELLA, B.M. Oleic acid prevents
706 detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental
707 competence. **Biology of Reproduction**, v.85, p.62–69, 2011.
- 708 ABAYASEKARA, D.R.; WATHES, D.C. Effects of altering dietary fatty acid
709 composition on prostaglandin synthesis and fertility. **Prostaglandins Leukot.**
710 **Essent. Fatty Acids**, v.61, p.275-287, 1999.
- 711 ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid
712 droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different
713 culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol. Reprod. Dev.**,
714 v. 61, p. 57-66, 2002.
- 715 ADAMIAK, S.J.; POWELL, K.; ROOKE, J.A. et al. Body composition, dietary
716 carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine
717 oocytes in vitro. **Reproduction**, v.131, p.247-258, 2006.
- 718 AVERY, B.; FÆERGE, I.; HOLM, P. Confocal microscopy of bovine OPU oocytes and
719 of Roscovitine treated abattoir oocytes with emphasis on mitochondria distribution
720 and nuclear stage. **International Embryo Transfer Society**, 2002.
- 721 BANG, J. II; LEE, H. S.; DEB, G. K.; HA, A. N.; KWON, Y. S.; CHO, S. K.; KIM, B.
722 W.; CHO, K. W.; KONG, I. K. Proteomic identification of abnormally expressed
723 proteins in early-stage placenta derived from cloned cat embryos. **Theriogenology**,
724 v. 79, n. 2, p. 358–366, 2013.
- 725 BAUMANN, C. G.; MORRIS, D. G.; SREENAN, J. M.; LEESE, H. J. The Quiet
726 Embryo Hypothesis: Molecular Characteristics Favoring Viability. **Molecular**
727 **reproduction and development**, v. 74, n. 10, p. 1345–1353, out. 2007.
- 728 BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the
729 gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70,
730 n. 2, p. 567-590, 1990.
- 731 BILBY, T.R.; BLOCK, J.; do AMARAL, B.C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F.T.;
732 HANSEN, P.J.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary unsaturated
733 fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in
734 summer. **J. Dairy Science**, v.89, p.3891-3903, 2006.
- 735 BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of culture media and energy sources on the
736 inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p.
737 297-306, 2006.

- 738 BURANAAMNUAY, Kakanang. Sperm-TALP: An Alternative Extender for
739 Retrieving and Diluting Epididymal Sperm in the Domestic Cat. **Reproduction in**
740 **Domestic Animals**, v. 48, n. 6, p. 912-917, 2013.
- 741 BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T. Los lípidos en la nutrición de los rumiantes. In:
742 CHURCH, C. D. **El rumiante: fisiología y nutrición**. Zaragoza: Acribia, p.339-356,
743 1993.
- 744 CAVALIERI, F. B.; SANTOS, G. T.; MATSUSHITA, M.; PETIT, H. V.; RIGOLON, L.
745 P.; SILVA, D. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or
746 whole flaxseed. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 85, p. 413-6, 2005.
- 747 CERRI, R.L.A; BRUNO, R.G.S.; CHEBEL, R.C. et al. Effect of fat sources differing
748 in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating dairy cows. **J.**
749 **Dairy Sci.**, v. 87, p. 297, 2004.
- 750 CESARI, A.; KAISER, G. G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNÉS, M.;
751 ALBERIO, R. H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for
752 sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 66, n. 5,
753 p. 1185-1193, 2006.
- 754 CETICA, P. et al. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride
755 catabolism during bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction**, v. 124, n. 5, p.
756 675-81, Nov 2002.
- 757 CHAMAYOU, S., PATRIZIO, P., STORACI, G., TOMASELLI, V., ALECCI, C.,
758 RAGOLIA, C., CRESCENZO, C., GUGLIELMINO, A. The use of morphokinetic
759 parameters to select all embryos with full capacity to implant. **Journal of Assisted**
760 **Reproduction Genetics**; 30: 703–710. 2013.
- 761 CHILDS, S.; CARTER, S.; LYNCH, C.O.; SREENAN, J.M.; LONERGAN, P.;
762 HENNESSY, A.A.; KENNY, D.A. Embryo yield and quality following dietary
763 supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA).
764 **Theriogenology**, v.70, p.992–1003, 2008.
- 765 CHURCH, D. C. **El Rumiente. Fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Editora
766 Acribia, 1993. 641 p.
- 767 COPPOCK, C.E., WILKS, D.L. Supplemental Fat in High-Energy Rations for
768 Lactating Cows: Effects on Intake, Digestion, Milk Yield, and Composition. **Journal**
769 **of Animal Science**, v. 69, p.3826-3837, 1991.
- 770 CRUZ, M., GARRIDO, N., HERRERO, J., PÉREZ-CANO, I., MUÑOZ, M.,
771 MESEGUER, M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked
772 with blastocyst formation and quality. **Reprod Biomed Online**; 25:371-81, 2012.
- 773 CZERKAWSKI, J. W. Microbial fermentation in the rumen. **Proceedings Nutrition**
774 **Society**, v.43, p.101-180, 1984.

775 DE FRIES, C.A.; NEUENDORFF, D.A.; RANDEL, R.D. Fat supplementation
776 influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. **J. Anim. Sci.**,
777 v.76, p.864-870, 1998.

778 DEL COLLADO, M. et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum
779 supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in
780 oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reprod Fertil Dev**, 28, 1721-
781 1732. 2015.

782 DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos.
783 **Theriogenology.**, v.57, p.285-302, 2002.

784 DOREAU, M. & CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm
785 animals. **British Journal of Nutrition**, v.78, p.15-35, 1997.

786 DOREAU, M.; AUROUSSEAU, E.; MARTIN, C. Effects of linseed lipids fed as rolled
787 seeds, extruded seeds or oil on organic matter and crude protein digestion in cows.
788 **Animal Feed Science Technology** v.150: 187-196. 2009.

789 DUNNING, K. R. et al. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental
790 competence and early embryo development. **Biol Reprod**, v. 83, n. 6, p. 909-18,
791 Dec 2010.

792 DUNNING, K. R. et al. Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte
793 complexes during maturation and modulation by PPAR agonists. **PLoS One**, v. 9,
794 n. 2, p. e87327, 2014

795 EDGAR, D. H.; GOOK, D. A. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling
796 versus vitrification) of human oocytes and embryos. **Hum Reprod Update**, v. 18, n.
797 5, p. 536-54, SepOct 2012.

798 EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in
799 mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001. ISSN 1470-1626.

800 FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early
801 embryos. **J Reprod Fertil**, v. 116, n. 2, p. 373-8, Jul 1999.

802 FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J.; A potencial role for triglyceride as an energy
803 source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Mol.**
804 **Reprod. Dev.**, v.73, p.1195-1201, 2006.

805 FOULADI-NASHTA, A.A.; WONNACOTT, K.E.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.;
806 SINCLAIR, K.D.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating
807 dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, v.138,
808 p.771–781, 2009.

809 FRANCO, G.L.; DAVY, F.C.A. Interação entre nutrição e reprodução em vacas de
810 corte. In: OLIVEIRA, R.L.; BARBOSA, M.A.A. **Bovinocultura de corte: desafios e**

811 **tecnologias**. Salvador: EDUFBA, 2007. Cap.2, p.82-112.FUNSTON, R. N. Fat
812 supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**,
813 v.82, p.154-161, 2004.

814 GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Anim Reprod Sci**,
815 v. 42, n. 1-4, p. 371-379, 1996. ISSN 0378-4320.

816 GARCIA, S. M.; MARINHO, L. S. R.; LUNARDELLI, P. A.; SENEDA, M. M.;
817 MEIRELLES, F. V. Developmental block and programmed cell death in bos indicus
818 embryos: Effects of protein supplementation source and developmental kinetics.
819 **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

820 GARCÍA-HERREROS, M.; LEAL, C. L. V. Comparative study of sperm washing and
821 selection methods after cryopreservation and its influence on sperm
822 subpopulational structure in a bovine model. **Systems biology in reproductive**
823 **medicine**, v. 60, n. 6, p. 338-347, 2014.

824 GARDNER, D. K.; KELLEY, R. L. Impact of the IVF laboratory environment on
825 human preimplantation embryo phenotype. **Journal of developmental origins of**
826 **health and disease**, v. 8, n. 2017, p. 418–435, 2018.

827 GOMEZ, E. et al. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of
828 bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 1013-1021, May
829 2008.

830 GONÇALVES, P.; BARRETA, M.; SANDRI, L.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.
831 Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de**
832 **Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

833 GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J.; FREITAS, V. **Biotécnicas Aplicadas à**
834 **Reprodução Animal-2ª Edição**. Roca, 2002.

835 GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; FAIR, T.; MOREIRA, P. N.; PINTADO, B.; DE
836 LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of speed of development
837 on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro.
838 **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, n. 4, p. 441–448, 2004.

839 HAVERTINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and
840 energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1081-
841 1091, 2006.

842 HERRERO, J., TEJERA, A., ALBERT, C., VIDAL, C., SANTOS, M.J., MESEGUER,
843 M. A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo
844 development. **Fertility and Sterility**; 6: 1602-09, 2013.

845 HOLM P.; BOOTH P. J.; SCHMIDT M. H.; GREVE T.; CALLESEN H. High bovine
846 blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium

847 supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins.
848 **Theriogenology**. 52:683–700, 1999.

849 HORVATH, G.; SEIDEL Jr., G.E. Vittrification of bovine oocytes after treatment with
850 cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. **Theriogenology**, v.66, p.1026-1033,
851 2006.

852 IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of
853 cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of reproduction and fertility**,
854 v. 50, n. 1, p. 119-121, 1977. ISSN 1470-1626.

855 ISOM, S. C. et al. Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in
856 vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization,
857 somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. **Molecular reproduction and**
858 **development**, v. 79, n. 3, p. 197–207, mar. 2012.

859 JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76,
860 p.3851-3863, 1993.

861 KEMP, P.; LANDER, D. J. Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid
862 by mixed cultures of pure strains om rumen bacterial. **Journal of General**
863 **Mocrobiol**, v.130, p.527-533, 1984.

864 KENNELLY, J. J.; KHORASANI, R. G. Influence of flaxseed feeding on the fatty acid
865 composition of cow's milk. **Proceedings of the 54th Flax Inst. Conf. J. F. Carter**,
866 ed. North Dakota State University, Fargo, ND. p.99-105, 1992.

867 KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine
868 embryos derived in vitro or in vivo. **Biol Reprod**, v. 62, n. 4, p. 847-56, Apr 2000.

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

872 KOJIMA, T.; IWASAKI, T.; ZENIYA, Y.; YOSHINO, J.; TOTSUKAWA, K. Effect of
873 dietary administration with linoleic acid and α -tocopherol on freezing tolerance
874 in porcine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 42, p. 67-72,
875 1996.

876 LAPA, M.; MARQUES, C.C.; ALVES, S.P.; VASQUES, M.I.; BAPTISTA, M.C.;
877 CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A.E.M.; BESSA, R.J.B; PEREIRA,
878 R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence
879 and fatty acid composition. **Reprod Dom Anim**, doi: 10.1111, 2011.

880 LEE, H.-L.; KIM, S.-H.; JI, D.-B.; KIM, Y.-J.A comparative study of Sephadex, glass
881 wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for
882 cryopreserved bovine semen. **Journal of veterinary science**, v. 10, n. 3, p. 249-
883 255, 2009.

884 LEESE, H. J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on.
885 **Reproduction**, v. 143, n. 4, p. 417–27, abr. 2012.

886 LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of in vitro-
887 derived bovine embryos cultured in 5% de CO₂ in air or in 5% O₂, 5% de CO₂ and
888 90% N₂. **Hum. Reprod.**, v.14, n.2, p.458-464, 1999.

889 LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Development of bovine embryos
890 in vitro following oocyte maturation under defined conditions. **Reproduction**
891 **Nutrition Development**, v. 34, n. 4, p. 329-339, 1994.

892 LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; PINTADO, B.; DE LA
893 FUENTE, J.; BOLAND, M. P. Relative messenger RNA abundance in bovine
894 oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing
895 hormone surge. **Mol Reprod Dev**, v. 66, n. 3, p. 297-305, Nov 2003.

896 LONERGAN, P.; GUTIRREZ-ADAN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; DE LA
897 FUENTE, J.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the
898 expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in
899 bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular**
900 **Reproduction and Development**, v. 57, n. 2, p. 146–152, 2000.

901 LOPES, C.N.; SCARPA, A.B.; CAPPELLOZZA, B.I. et al. Effects of rumen-protected
902 polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of Bos
903 indicus beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.87, p.3935-3943, 2009.

904 MATTOS, R., STAPLES, C.R., THACTHER, W.W. Effects of dietary on reproduction
905 in ruminants. **Rev. reprod.**, v. 5, p. 38-45, 2000.

906 McEVOY, T.G.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE J.A.; SINCLAIR, K.D. Consequences
907 of manipulating gametes and embryos of ruminant species. **Reproduction**, v.61,
908 p.167-182, 2003.

909 MESEGUER, M., HERRERO, J., TEJERA, A., HILLIGSØE, K.M., RAMSING, N.B.,
910 REMOHÍ, J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. **Hum**
911 **Reprod.** (10):2658-71, 2011.

912 MILAZZOTTO, M. P.; GOISSIS, M. D.; CHITWOOD, J. L.; ANNES, K.; SOARES,
913 C. A.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. Á.; ROSS, P. J. Early cleavages
914 influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine
915 blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 4, p. 324–336,
916 2016.

917 MILINSK, M. C. **Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na**
918 **determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal**. 2007. 92 f. Tese
919 (Doutorado em Ciências) – Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de
920 Maringá, Maringá, 2007.

- 921 MOAWAD, A.R., TAN, S.L., XU, B., CHEN, H.Y., TAKETO, T. L-carnitine
922 supplementation during vitrification of mouse oocytes at the germinal vesicle stage
923 improves pre-implantation development following maturation and fertilization in
924 vitro. **Biol Reprod**, 88:104. 2013
- 925 MUCCI, N. et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on
926 blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification.
927 **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551-62, May 2006.
- 928 NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 2ed., RR
929 Donnelley: São Paulo, cap. 17, 975p., 2002.
- 930 NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status
931 and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.
- 932 OBA, M.; THANGAVELU, G.; DEGHAN, B. M.; AMBROSE, D. J. Unprocessed
933 whole flaxseed is as effective as dry-rolled at increasing (-linolenic acid
934 concentration in milk of dairy cows. **Livestock Science** v.122: 73-76. 2009.
- 935 OLIVEIRA, S.G.; SIMAS, J.M.C.; SANTOS, F.A.P. Main aspects related to changes
936 in the profile of fatty acids in ruminant milk fat. **Archives of Veterinary Science**, .9,
937 n.1, p.73-80, 2004.
- 938 PALMQUIST, D.L.; JENKIS, T.C. Fat in lactation rations. **Journal of Dairy Science**,
939 v.63, p.1-14, 1980.
- 940 PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI,
941 T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (2Eds.) **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal:
942 FUNEP, p.299-322, 2011.
- 943 PASCHOAL, D.M., SUDANO, M.J., GUASTALI, M.D., DIAS MAZIERO, R.R,
944 CROCOMO, L.F., OÑA MAGALHÃES, L.C.; SILVA RASCADO, T., MARTINS, A.,
945 LANDIM-ALVARENGA, F.D. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced
946 bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, 18:1-12.
947 2012.
- 948 PENNINGTON, J. A.; DAVIS, C. L. Effects of intraruminal and intra-abomasal
949 additions of cod-liver oil in milk fat production in the cow. **Journal of Dairy Science**,
950 v.58, p.49-55, 1975.
- 951 PEREIRA, M.R; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell**
952 **Tissue Banking**., Review paper, 2008.
- 953 PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL,
954 P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C.
955 Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12
956 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). **Animal Reproduction Science**, v.98,
957 p.293-301, 2007.

- 958 PERS-KAMCZYC, E.; PAWLAK, P.; RUBES, J.; LECHNIAK, D. Early Cleaved
959 Bovine Embryos Show Reduced Incidence of Chromosomal Aberrations and Higher
960 Developmental Potential on Day 4.5 Post-Insemination. **Reproduction in domestic**
961 **animals**, v. 47, n. 6, p. 899–906, dez. 2012.
- 962 PETIT, H. V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of
963 dairy cows fed whole flaxseed. **Journal Dairy Science**. v.85: 1482-1490. 2002.
- 964 PETIT, H. V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of
965 dairy cows fed formaldehyde treated flaxseed or sunflower seed. **Journal Dairy**
966 **Science**. v.86: 2637-2646. 2003.
- 967 RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early
968 embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and
969 blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 2, p. 234-48, Feb 2002.
- 970 ROSA, B. L. **Óleo de linhaça na dieta de fêmeas e machos castrados Nelore x**
971 **Canchim, terminados em confinamento**. 72 f. Dissertação (Mestrado) –
972 Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2014.
- 973 RUSSELL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte
974 maturation media on early bovine embryonic development. **Mol Reprod Dev**, v. 73,
975 n. 10, p. 1255-1270, 2006.
- 976 SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the
977 donor cow. **Theriogenology**, v.69, p.88-97, 2008.
- 978 SEIDEL Jr., G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation.
979 **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.
- 980 SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; PAPP, A.; IVANCSICS, J.; BARANYAI, B.;
981 GOCZA, E; KOVACS, A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and
982 acrosome integrity of frozen–thawed bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic**
983 **Animals**, v. 37, n. 5, p. 285-290, 2002.
- 984 STUBBS, C.D; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane
985 polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function.
986 **Biochim. Biophys. Acta**, v.779, p.89-137, 1984.
- 987 STURMEY, R.G.; REIS, A.; LEESE, H.J.; MCEVOY, T.G. Role of fatty acids in
988 energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reprod**
989 **Dom Anim**, v.44, p.50–58, 2009.
- 990 SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; MAZIERO, R.R.D.; RASCADO, T.S.;
991 GUASTALI, M.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHAES, L.C.O.; MONTEIRO, B.A.;
992 MARTINS JR, A.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Melhorando a
993 capacidade de sobrevivência após a criopreservação: uma abordagem

- 994 embrionária. **Anais da XXVII Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de**
995 **Embrões**, Praia do Forte, 2013.
- 996 SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.O.;
997 CROCOMO, L.F.; LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Lipid content and
998 apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to
999 vitrification. **Theriogenology**, v.75, p.1211-1220, 2011.
- 1000 SUGIMURA, S.; AKAI, T.; HASHIYADA, Y.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; HIRAYAMA,
1001 M.; YAMANOUCHI, T.; MATSUDA, H.; KOBAYASHI, S.; AIKAWA, Y.; OHTAKE,
1002 M.; KOBAYASHI, E.; KONISHI, K.; IMAI, K. Promising system for selecting healthy
1003 in vitro-fertilized embryos in cattle. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- 1004 SUTTON-MCDOWALL, M.L.; FEIL, D.; ROBKER, R.L.; THOMPSON, J.G.;
1005 DUNNING, K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in
1006 bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v.77, p.1632-1641, 2012.
- 1007 THOMAS, M.G.; WILLIAMS, G.L. Metabolic hormone secretion and FSH induced
1008 superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing
1009 predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. **Theriogenology**, v.45,
1010 p.451-458, 1996.
- 1011 THOMPSON, J. G. et al. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative
1012 phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in
1013 vitro. **J Reprod Fertil**, v. 118, n. 1, p. 47-55, Jan 2000.
- 1014 VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo
1015 laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v. 12, n. 6, p. 779-96,
1016 2006.
- 1017 VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell
1018 University Press. p. 325-336, 1994.
- 1019 VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Is
1020 apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental
1021 kinetics and in vivo bull fertility? **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1691–1703, 2006.
- 1022 VELKER, B. A. M.; DENOMME, M. M.; MANN, M. R. W. Loss of genomic imprinting
1023 in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture.
1024 **Biology of reproduction**, v. 86, n. September 2011, p. 1–16, 2012.
- 1025 WATHES, D.C.; ROBERT, D.; ABAYASEKARA, E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated
1026 fatty acids in male and female reproduction. **Biol. Reprod.**, v.77, p.190-201, 2007.
- 1027 WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of
1028 follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.** v.82,
1029 p.63-74, 2004.

- 1030 WRIGHT, T., B. MCBRIDE, AND B. HOLUB. Docosahexaenoic acid enriched milk.
1031 **World Rev. Nutr. Diet.** 83:160–165.1998.
- 1032 ZACHUT, M.; DEKEL, L.; LEHER, H.; ARIELLI, A.; ARAV, A.; LIVSHITZ, L.;
1033 YAKOBY, S.; MOALLEM, U. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to
1034 high-yelding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular
1035 status, and oocyte quality. **J. Dairy Science**, 93: 529-545. 2010.
- 1036 ZENG, F.; SCHULTZ, R. M. RNA transcript profiling during zygotic gene activation
1037 in the preimplantation mouse embryo. **Developmental biology**, v. 283, n. 1, p. 40–
1038 57, 1 jul. 2005.
- 1039 ZERON Y, TOMCZAK M, CROWE J, ARAV A. The effect of liposomes on
1040 thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes:
1041 implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**. v.45, p.143-52, 2002.
- 1042 ZERON, Y.A.; OCHERETNY, O.; KEDAR, A.; BOROCHOV, D.; SKLAN, D.; ARAV,
1043 A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of
1044 oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles.
1045 **Reproduction**, v.121, p.447-454, 2001.

CAPÍTULO 2: ALTERNATIVAS PARA INCREMENTO DA VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS CRIOPRESERVADOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Artigo formatado nas normas do periódico: *Animal Reproduction Science*

Suplementação lipídica para doadoras (*Bos taurus*) melhora a qualidade de embriões submetidos a vitrificação

Christopher Junior Tavares Cardoso^a; Ana Caroline Bini de Lima^b; Mirela Brochado Souza-Cáceres^c; Marcus Vinicius Moraes de Oliveira^b; Ériklis Nogueira^d; Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{a,b}

^a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Senador Felinto Muller 2443, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: christopherjtc@hotmail.com

^b Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rodovia Aquidauana-UEMS, km 12, 79200-000, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: carolinebini@hotmail.com
fabiana.sterza@uems.br, marcusvmo@uems.br

^c Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. E-mail: mirela.mbs@gmail.com

^d Embrapa – Pantanal, Rua 21 de Setembro, 1880 - Bairro Nossa Senhora de Fátima, Caixa Postal 109 - Corumbá, MS, Brasil - 79320-900. E-mail: eriklis.nogueira@embrapa.br

Resumo: Embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis ao processo de criopreservação. Tal fato tem sido associado com o seu conteúdo e composição lipídica e consequentemente sobre o metabolismo do embrião. No presente estudo objetivou-se avaliar o efeito da adição de linhaça na dieta de vacas Pantaneira sobre parâmetros digestivos e na produção *in vitro* de embriões submetidos a vitrificação. Para isso, utilizou-se seis fêmeas bovinas distribuídas em 2 grupos experimentais: grupo controle (CONTR, n=3) e grupo linhaça (LINH, n=3), diferindo apenas pelo fornecimento de 0,800kg/animal/dia de linhaça na dieta do grupo LINH. Foram realizadas análises de consumo de matéria seca e digestibilidades aparente dos nutrientes. Um total de 3 sessões de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) foram feitas para a realização da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Os embriões considerados viáveis em D7 foram submetidos à vitrificação e posterior aquecimento para avaliação das taxas de reexpansão às 3 e 24 horas. Animais alimentados com linhaça tiveram redução no consumo e digestibilidade de matéria seca ($P < 0,05$). Por outro lado, não houve efeito ($P > 0,05$) do tratamento nos coeficientes de digestibilidade da PB, FDN, FDA e NDT. A taxa de viabilidade oocitária e taxa de blastocisto (D7) não diferiram entre os grupos LINH e CONTR. Por outro lado, com a linhaça aumentou-se a taxa de embriões vitrificáveis (62,5 % vs 96,3 % para grupo controle e linhaça, respectivamente). De forma semelhante a taxa de reexpansão após 24 horas foi superior no grupo linhaça (CONTR: 70% e LINH: 86,3 %). Em conclusão, a suplementação de 0,800

Kg/animal/dia de linhaça em grão, uma fonte rica em ácido linolênico, para fêmeas da raça Pantaneira incrementou a qualidade e criotolerância dos embriões produzidos *in vitro*.

Palavras chaves: reprodução; metabolismo lipídico; criopreservação.

1. Introdução

O Brasil apresenta destaque mundial na produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, sendo o maior produtor na América do Sul (Sanches et al., 2019). Esse alto número de embriões produzidos se dá pela enorme demanda, se dá pela possibilidade de criopreservação do embrião e busca dos produtores por melhor material genético.

Além de atender a demanda comercial da pecuária, a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (PIVE) pode contribuir de forma mais efetiva para a conservação do material genético de raças domésticas em risco de extinção. Pode-se citar a raça Pantaneira, naturalizada de rusticidade notável e cujo rebanho efetivo apresenta menos de 1000 animais no país inteiro (Ferreira et al., 2017).

Contudo, a sensibilidade do embrião bovino produzido *in vitro* para congelamento ou vitrificação é o principal obstáculo para a expansão da tecnologia da criopreservação (Saragusty & Arav, 2011). Independente da raça, os embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis ao processo de criopreservação quando comparados aos produzidos *in vivo* (Sudano et al., 2014).

Acredita-se que a baixa criotolerância do embrião PIV seja de caráter multifatorial, estando relacionada com o seu conteúdo e composição lipídica e consequentemente sobre o metabolismo do embrião (Sudano et al., 2013). Nesse sentido a busca por alternativas de modulação do conteúdo lipídico com vistas à melhoria da criotolerância tem sido realizada por vários grupos de pesquisa, os quais têm estudado, por exemplo, alimentação das doadoras com dietas a base de ácidos graxos insaturados (Fouladi-Nashta et al., 2007; Fouladi-Nashta et al., 2009; Zachut et al., 2010), suplementação do meio de cultivo *in vitro* (Moawad et al., 2013; Paschoal et al., 2014; Paschoal et al., 2017) e redução da concentração de soro fetal bovino no meio de cultivo (Sudano et al., 2011).

Atualmente, a suplementação lipídica na dieta tem sido usada não somente para aumentar a sua densidade energética, mas também para melhorar o desempenho reprodutivo nas vacas (Staples et al., 1998; Santos et al., 2008). Oócitos e embriões podem incorporar esses ácidos graxos de cadeia longa do meio de cultivo e da dieta da doadora (Sturmey et al., 2009). Alguns estudos demonstraram (Fouladi-Nashta et al., 2007; Thangavelu et al., 2007; Cerri et al., 2009) uma melhora no desenvolvimento embrionário e na qualidade morfológica dos embriões quando as doadoras foram suplementadas com uma fonte rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Os PUFAs são conhecidos por alterar a composição lipídica da membrana e o metabolismo celular (Leão et al., 2015; Leão et al., 2017).

Já foi observado que os ácidos graxos poli-insaturados, favorecem a criopreservação dos embriões (Leão et al., 2015), pois a maior quantidade desses ácidos na membrana plasmática eleva a fluidez da mesma (Stubbs and Smith, 1984). De acordo com (Zeron et al., 2002), a maior fluidez aumenta a eficiência de troca da água intracelular pelo crioprotetor, favorecendo a proteção do embrião. Nesse contexto, faz-se necessário avaliar o tipo de fonte desses ácidos e o aproveitamento destes pelos animais.

A linhaça (*Linum usitatissimum*) é um alimento interessante para o fornecimento em dietas destinadas a bovinos, pois os ácidos graxos poli-insaturados compõem cerca de 70% do óleo da semente (Cardoso et al., 2018) e por estar na forma de grão, o óleo da linhaça pode ter liberação mais lenta, diminuindo, assim, a bio-hidrogenação ruminal (Cavalieri et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de linhaça na dieta de vacas Pantaneira sobre parâmetros digestivos e na produção *in vitro* de embriões submetidos a vitrificação.

2. Material e métodos

Animais

Todas as manipulações envolvendo os animais foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição (Protocolo nº 012/2014).

O experimento foi desenvolvido no NUBOPAN - Núcleo de Bovinos Pantaneiros de Aquidauana, pertencente à Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, situada no município de Aquidauana, MS (20°27' S, 54°37' O, e 530 m de altitude), na faixa de transição entre o clima mesotérmico úmido sem estiagem e o tropical úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno. O período chuvoso vai de outubro a março. A precipitação anual é em média de 1225mm.

Foram utilizadas doadoras da raça Pantaneira (n = 6), não gestantes e não lactantes, com condição corporal entre 3 e 4 (escala de 1 a 5), idade entre 2 e 4 anos. Todos os animais foram previamente submetidos a avaliação ginecológica mediante auxílio da ultrassonográfica transretal.

O controle de doenças reprodutivas foi realizado por meio de vacinação contra IBR, BVD e Leptospirose 30 dias antes da primeira OPU.

Todos os animais experimentais foram submetidos a regime de pastejo rotacionado cultivado com capim-mombaça (*Panicum maximum*) e receberam suplementação mineral *ad libitum*. Cada animal recebeu diariamente 2 kg de ração concentrada, sendo esta elaborada com farelo de milho e farelo de soja.

Os animais foram distribuídos em dois tratamentos, em um delineamento experimental inteiramente ao acaso. Sendo CONTR= grupo controle, sem suplementação com linhaça (n=3) e LINS = suplementação com linhaça (n=3). Esses animais permaneceram juntos na mesma pastagem, sendo conduzidos ao curral de manejo uma vez ao dia. No curral, os animais receberam respectivamente ração concentrada (controle) ou ração concentra juntamente com 0,800 Kg/animal/dia de linhaça (LINS).

As análises bromatológicas da composição da dieta ofertada foram descritas por (Cardoso et al., 2018). O perfil lipídico da linhaça foi realizado de acordo com a metodologia de (Nunes et al., 2015) pelo método de cromatografia gasosa (Agilent 6890N, Ramsey - MN, USA) para obter os picos individuais dos ésteres de ácidos

graxos. As análises foram realizadas no laboratório de Nutrição da Universidade Católica Dom Bosco.

Tabela 1: Composição química, expressa na matéria seca, do capim potencialmente ingerido e dos suplementos fornecidos

Variáveis *	Capim-mombaça	Concentrado	Linhaça
Matéria Seca - MS (%)	29,42	94,96	92,99
Proteína Bruta - PB (%)	8,37	22,15	22
Extrato Etéreo - EE (%)	1,48	3,51	27,32
Fibra em Detergente Neutro - FDN (%)	59,61	13,8	40,09
Fibra em Detergente Ácido - FDA (%)	27,94	3,62	20,59
Carboidratos Totais - CT (%)	78,49	72,18	43,66
Carboidratos Não Fibrosos - CNF (%)	18,88	58,38	3,57
Matéria Mineral - MM (%)	11,66	2,16	7,03
Linhaça			
Ácidos Graxos	Média±DP		
C12:0 - Ácido láurico	0,12 ± 0,01		
C14:0 - Ácido mirístico	0,24 ± 0,01		
C16:0 - Ácido palmítico	6,20 ± 0,12		
C16:1 - Ácido palmitoleico	0,11		
C18:0 - Ácido esteárico	3,21 ± 0,03		
C18:1 (trans) - Ácido elaídico	0,25 ± 0,02		
C18:1 - Ácido oleico	16,32 ± 0,05		
C18:2 - Ácido linoleico	15,68 ± 0,01		
C18:3n3 - Ácido linolênico (ômega 3)	51,89 ± 0,14		
C20:0 - Ácido araquídico	0,10		
C20:1 - Ácido cis-11-eicosênico	0,16 ± 0,04		
C22:0 - Ácido behênico	0,13 ± 0,01		
Ácidos graxos poli-insaturados	69,95 ± 5,68		
Ácidos graxos mono-insaturados	16,85 ± 0,09		
Ácidos graxos saturados	10,00 ± 0,07		

* Média das amostras coletadas durante o experimento.

Delineamento experimental

Foi adotado um período de 30 dias para adaptação da dieta para os animais. O fornecimento dos suplementos foi realizado durante 62 dias a partir do período de adaptação. Nesse período foram realizadas 3 sessões de aspiração folicular com o intervalo médio de 31 ± 5 dias entre si. Na figura 1 é demonstrado o design experimental utilizado.

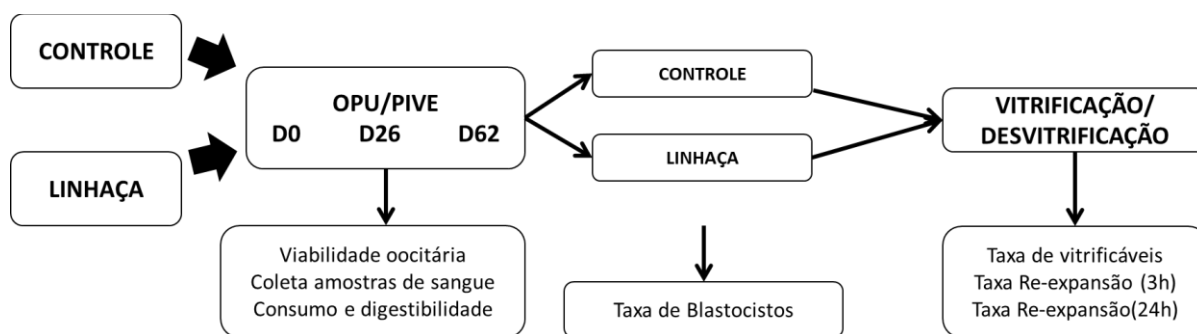


Figura 3: Representação esquemática do período de suplementação, aspiração folicular, produção *in vitro* e criopreservação de embriões de fêmeas bovinas Pantaneiras.

Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes

O consumo de forragem pelos animais foi determinado indiretamente através da Fibra em Detergente Ácido Insolúvel (FDAi) como marcador interno, segundo o método descrito por (Cochran et al., 1986). Para as análises de digestibilidade, foram coletadas amostras de capim em períodos distintos ao longo do experimento, as quais foram feitas pela técnica do pastejo simulado. As amostras das fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, sempre na data das OPUs. A produção fecal total dos animais foi determinada realizando-se a coleta total de fezes num período de 24 horas, sendo esta realizada no último dia de arraçãoamento.

As amostras de pasto e fezes foram pré-secas em estufa de ventilação forçada (65°C, 48 horas) e, posteriormente, trituradas a 2 mm em moinho tipo Willey, colocadas em potes plásticos, identificadas e armazenadas para posteriores determinações de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) segundo metodologia proposta(Silva and Queiroz, 1981). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de acordo com (Vansoest et al., 1991), e os teores de extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM) segundo (Silva and Queiroz, 2002).

Análise de parâmetros séricos

Foram realizadas três coletas de sangue em todos os animais, para quantificação de glicose, colesterol total, HDL e LDL ao longo do período de suplementação. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa caudal e depositadas em tubos de ensaio. Após a coleta, o sangue era centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos para separação do soro e em seguida essa fração foi congelada a -20°C até posterior análise.

No soro sanguíneo foram quantificados o colesterol total, HDL e LDL (método enzimático colorimétrico) e glicose (método enzimático-hexoquinase com kits comerciais, através de procedimentos de espectrofotometria automatizados COBAS® (Roche-Hitachi)). As análises dos metabólitos sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU)

Para redução dos movimentos peristálticos e o menor desconforto do animal, foram injetados 5 mL de lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet LTDA Laboratory, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) no espaço epidural. Os procedimentos de aspiração folicular transvaginal foram realizados com ultrassom e transdutor setorial micro-convexo de 8 MHz acoplado em suporte próprio para utilização transvaginal. Para a aspiração dos folículos foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis 20 G (50mm x 9mm; Terumo®, Bio Brazil, São Paulo, Brazil) e mangueira de silicone com 2 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento. A pressão de vácuo foi de 65 a 75 mm de Hg, mantida com uma bomba de aspiração (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brazil). O meio de aspiração foi constituído por DPBS (Gibco BRL) acrescido de 20 UI/mL de heparina sódica (Hepamax®, Blau Pharmaceuticals, Cotia, SP, Brazil) mantido à 37 °C durante a aspiração. Os COCs (complexo oócitos-cumulus) recuperados foram classificados, e transferidos para criotubos de 2 mL durante o transporte que foi realizado em incubadoras de transporte à 38 °C até o Laboratório de Biotecnologias da Reprodução da UEMS.

Produção in vitro de embriões

Os COCs recuperados de cada animal do grupo CONTR e LINH foram quantificados e classificados como viáveis ou inviáveis, com base nas características do citoplasma do oócito e no número de camadas de células do cúmulus, usando os seguintes critérios: Grau I, três ou mais camadas de células do cúmulus e ooplasma homogêneo de tamanho, cor e textura uniformes; Grau II, uma a três camadas de células cúmulus com ooplasma homogêneo ou levemente degenerado; e Grau III, ooplasma completamente degenerado e células do cumulus expandidas, sendo os COCs grau 1 e 2 considerados viáveis.

A maturação dos COCs selecionados foi realizada durante 24 horas em incubadoras com atmosfera controlada (38,5 °C, 5% CO₂; umidade máxima) em TCM 199 acrescido de 5% de SFB.

Após esse período foi realizada a fecundação *in vitro* (FIV). O sêmen utilizado foi de um único touro da raça Pantaneira, previamente testado e avaliado segundo critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). As palhetas de sêmen foram descongeladas por 30 segundos em água aquecida à 37 °C, e tratadas pelo método de gradiente de Percoll. Os COCs foram acondicionados em gotas de 100µL de meio FIV e co-incubados com os espermatozóides, por 22 horas em incubadora à 38,5°C, 5% CO₂ e umidade máxima.

Após a fecundação *in vitro*, os prováveis zigotos foram cultivados em meio SOF (Vajta et al., 1999) com 5% Soro Fetal Bovino, em incubadora à 38,5°C, com 5% de CO₂ e umidade máxima. Os embriões permaneceram em meio CIV por 7 dias em incubadora à 38,5°C, 5% CO₂ e umidade máxima. No D7 os embriões foram avaliados para determinação da taxa de blastocisto.

Vitrificação dos embriões

Os blastocistos, classificados em graus I e II, segundo a International Embryo Transfer Society (IETS) (Stringfellow and Seidel, 1998), foram lavados em solução de TCM Hanks acrescida de 5% SFB (Holding Medium – HM) e, então, desidratados por um minuto em solução a 10% de etilenoglicol e 10% de DMSO (Vajta et al., 1999).

Posteriormente, os embriões foram desidratados novamente em 20% de etilenoglicol e 20% de DMSO por 20 segundos, e envasados em Criotop (Vajta et al., 1999). Após a vitrificação os embriões foram armazenados segundo o tratamento (CONTR: n=28; LINH: n=45).

Os embriões ficaram estocados em nitrogênio líquido em média 20 dias após a vitrificação, e então foram aquecidos por meio da passagem em solução de sacarose (0,3M) em TCM Hanks (5 minutos) e, posteriormente em solução 0,15M de sacarose em TCM Hanks pelo mesmo período (Vajta et al., 1999).

Análise estatística

Todos os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Os dados de taxas de viabilidade oocitária, blastocisto, vitrificáveis e reexpansão foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Os dados de parâmetros sanguíneos, ganho de peso, consumo e digestibilidade apresentaram distribuição normal e foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey, quando eram observadas diferenças. Para todos os dados foram consideradas significativas diferenças inferiores à 5% de probabilidade, utilizando o programa R (versão 3.4.0).

3. Resultados

Animais alimentados com linhaça apresentaram redução no consumo e digestibilidade de matéria seca ($P < 0,05$). Por outro lado, não houve efeito ($P > 0,05$) do tratamento nos coeficientes de digestibilidade da PB, FDN, FDA e NDT (Tabela 2).

Tabela 2: Consumo diário de MS e coeficientes de digestibilidade de fêmeas bovinas mantidas sob pastejo e suplementadas com linhaça.

Parâmetros	Controle	Linhaça	Valor P
Consumo MS - kg/dia	11,75±0,58	10,29±1,09	0,0028
DMS (%)	68,73±2,92	64,25±1,36	0,007
DPB (%)	73,89±10,7	67,16±7,6	0,1466
DFDN (%)	75,31±6,8	74,99±3,1	0,96
DFDA (%)	69,09±9,3	67,61±2,2	0,65
DEE (%)	52,76±1,4	63,57±9,7	0,0814
DNDT (%)	61,84±5,22	60,74±1,97	0,5641

Consumo diário de matéria seca (CMS), digestibilidade da matéria seca (DMS), expressa em %; digestibilidade da proteína bruta (DPB); digestibilidade da fibra em detergente neutro (DFDN); digestibilidade da fibra em detergente ácido (DFDA); digestibilidade do extrato etéreo (DEE) e nutrientes digestíveis totais (NDT).

Como não foi detectada interação entre as datas das coletas e tratamento, uma média entre as coletas foi feita e agrupada por tratamento. Não houve efeito ($P > 0,05$) da suplementação lipídica nas concentrações plasmáticas de colesterol (121,66 mg/dL e 137,3 mg/dL para CONTROLE e LINHAÇA respectivamente), HDL (90,81 mg/dL e 93,2 mg/dL para CONTROLE e LINHAÇA respectivamente) e LDL (1,09 mmol/L e 1,22 mmol/L para CONTROLE e LINHAÇA respectivamente). No entanto, animais suplementados com linhaça apresentaram valores menores ($P < 0,05$) de glicose (73,07 mg/dL e 58,04 mg/dL para CONTROLE e LINHAÇA respectivamente).

Tabela 3: Quantificação de parâmetros sanguíneos de vacas Pantaneiras (*Bos taurus*) suplementadas com linhaça e submetidas a produção in vitro de embriões.

	Colesterol total mg/dL	Glicose mg/dL	HDL mg/dL	LDL mmol/ L
CONTROLE	121,66 a	73,07 a	90,81 a	1,09 a
LINHAÇA	137,00 a	58,04 b	93,2 a	1,22 a

* Letras iguais não diferem na mesma coluna.

As taxas de viabilidade oocitária não variaram entre as sessões de OPU realizadas ao longo do experimento ($P > 0,05$), eliminando a influência do dia da coleta sobre a viabilidade oocitária. Da mesma forma, não houve efeito da suplementação com linhaça sobre essa variável (Tabela 4).

Tabela 4: Taxa de viabilidade oocitária de vacas da raça Pantaneira suplementadas ou não com linhaça em cada sessão de OPU realizada no período experimental.

OPU	Tratamento	Viabilidade oocitária (%)
1	CONTROLE	82,91 a
	LINHAÇA	58,57 a
2	CONTROLE	69,20 a
	LINHAÇA	55,35 a
3	CONTROLE	82,71 a
	LINHAÇA	57,65 a
Total	CONTROLE	78,27 a

* Letras iguais não diferem na mesma coluna.

Não houve efeito ($P>0,05$) da suplementação com linhaça das doadoras sobre as taxas de blastocisto em D7. Os embriões do grupo LINH apresentaram maior ($P<0,05$) taxa de embriões vitrificáveis, em comparação com o grupo CONTR. Considerando que apenas blastocistos grau 1 e 2 foram vitrificados, podemos relacionar a taxa de vitrificáveis diretamente com a qualidade dos embriões. Nesse sentido, podemos afirmar que a qualidade dos embriões foi influenciada pela suplementação com linhaça na dieta.

Tabela 5: Taxa de blastocistos em D7 e taxa de embriões vitrificáveis obtidos de animais tratados com linhaça.

Tratamentos	%BL D7	% Vitrificáveis
CONTR	32,87 (48/146) a	62,5 (30/48) b
LINH	38,84 (54/139) a	96,30 (52/54) a

CONTR= doadoras sem suplementação de linhaça na dieta; LINH=doadoras com suplementação de linhaça na dieta. *Letras diferentes se diferem na mesma coluna.

Durante a vitrificação, o embrião se compacta devido à saída de líquido intracelular. Logo após o aquecimento ocorre a sua re-expansão, sendo retomado o desenvolvimento embrionário. Nesse experimento os embriões foram avaliados 3 e 24 horas após o descongelamento. No entanto, no período de 3 horas após aquecimento foi observado uma taxa de re-expansão maior ($P<0,05$) no grupo LINH, indicando uma maior velocidade de re-expansão, possivelmente devido a uma maior permeabilidade da membrana plasmática das células, pois de acordo com (Leao et al., 2015) a maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática eleva a fluidez da mesma, favorecendo a criopreservação dos embriões (Stubbs and Smith, 1984).

Neste estudo, houve interação ($P>0,05$) entre grupo e tempo de re-expansão. O grupo suplementado com linhaça apresentou a maior parte de seus embriões re-expandidos após 3 horas de aquecimento, sem diferença comparado com 24 horas. No entanto, após 24 de aquecimento, o grupo controle se igualou com embriões obtidos de doadoras suplementadas com linhaça.

Tabela 6: Taxas de re-expansão obtidas 3h e 24h após aquecimento dos embriões obtidos de animais suplementados com linhaça.

Tratamentos	% Re-expansão 3h	% Re-expansão 24h
CONTR	40,0 (4/10) b B	70,0 (7/10) a A
LINH	86,3 (19/22) a A	86,3 (19/22) a A

*Letras minúsculas diferem na coluna e letras maiúsculas diferem na linha (P<0,05).

4. Discussão

Este estudo testou a adição de linhaça como uma fonte de lipídios na dieta de fêmeas da raça Pantaneira. A linhaça é um produto rico em PUFA's da família n-3 (α -linoleico) e em menor quantidade da família n-6 (linoleico) (Cardoso et al., 2018). Quando fornecida na forma em grão, acredita-se que ocorra uma menor liberação do óleo presente no rúmen, diminuindo assim a bio-hidrogenação ruminal (Cavalieri et al., 2005).

O grau de insaturação é, possivelmente a mais importante característica que influencia a digestibilidade, pelo fato de afetar a formação de micelas e o movimento dos ácidos graxos na camada de água adjacente às microvilosidades do intestino delgado (Council, 2001) ou por serem reesterificados mais rapidamente dentro do enterócito, facilitando sua remoção do citosol e aumentando com isso a taxa de absorção (Wu and Palmquist, 1991).

Diferentemente do esperado, o grau de insaturação que em geral promove aumento da digestibilidade da MS, neste experimento, os animais alimentados com linhaça apresentaram menor consumo e digestibilidade da matéria seca que o grupo controle. Esses resultados corroboram com (Wada et al., 2008), que também encontraram menor coeficiente de digestibilidade em vacas tratadas com linhaça, relacionando tal fato ao possível efeito dos lipídios da linhaça terem inibido a atividade dos microrganismos celulolíticos. Esse mecanismo pode envolver a mudança na permeabilidade da membrana celular, que reduz a habilidade da célula regular o pH intracelular e o consumo de nutrientes, dessa forma diminuindo a degradabilidade dos nutrientes, haja vista que os ácidos graxos insaturados são geralmente tóxicos para as bactérias Gram-positivas (Nagaraja et al., 1997).

Resultados similares aos do presente estudo foram encontrados por (Petit et al., 2002), que observaram a redução na digestibilidade aparente da MS, FDN, FDA e EE em vacas de leite suplementadas com linhaça em grão comparado com animais que receberam Megalac ou soja micronizada. Os autores relataram que o acesso pelos microrganismos ou enzimas intestinais, foi maior no grupo Megalac (sais de cálcio de ácidos graxos) e no da soja micronizada que na linhaça, onde os lipídios estariam associados com a matriz fibro-proteica do grão.

Durante esse experimento, amostras de sangue foram coletadas e submetidas à análises bioquímicas, pois através de variações de metabolitos sanguíneos, é possível estimar o processo de adaptação metabólica à nova condição fisiológica e alimentar (Freitas Júnior et al., 2010).

A administração de gordura para fêmeas bovinas estimula a síntese e acúmulo de colesterol e ésteres de colesterol nos tecidos e fluidos corpóreos, incluindo os ovários (Thomas and Williams, 1996; Nogueira et al., 2012). As lipoproteínas predominantemente presentes na circulação sanguínea dos ruminantes são as lipoproteínas de alta densidade (HDL), que parece ser a única lipoproteína com acesso ao compartimento intrafolicular (Hawkins et al., 1995).

Embora os níveis de colesterol, HDL, LDL não tenham diferido estatisticamente entre os tratamentos, efeitos da suplementação foram observados nas concentrações plasmáticas de glicose, que foram menores nos animais suplementados com linhaça. No entanto, em ambos os tratamentos as concentrações séricas de glicose estavam dentro dos níveis esperados para a espécie bovina que é de 45 a 75 mg/dL (Fernandes et al., 2012).

Estes resultados são diferentes de autores que forneceram dietas enriquecidas com PUFA's para fêmeas bovinas (Petit et al., 2002; Bilby et al., 2006; Nogueira et al., 2012). A importância da glicose já foi documentada como fonte de energia para o ovário de fêmeas bovinas e para embriões pré-implantados (Boland et al., 2001). Devido aos mecanismos de economia de glicose dos ruminantes, os efeitos dos tratamentos sobre as concentrações de glicose plasmática normalmente não são esperados, o que explica a manutenção da glicemia (Gagliostro and Chilliard, 1991). Em experimentos realizados com ratos e humanos

suplementados com linhaça também foi observada redução nos níveis séricos de glicose. Atribui-se tal efeito à presença da fibra solúvel, a qual representa um terço da fibra dietética total da linhaça e auxilia na manutenção dos níveis de glicose no sangue (Lemay et al., 2002; Hautrive et al., 2011; Cupersmid et al., 2012).

Já foi demonstrado que embriões *Bos taurus* apresentam maior conteúdo lipídico do que *Bos indicus* (Sudano et al., 2013), portanto acredita-se que a raça Pantaneira (*Bos taurus*) possua grande conteúdo lipídico e seja beneficiada pela intervenção do metabolismo lipídico por meio da dieta.

Para observar efeitos da dieta na qualidade oocitária, um período de 62 dias de suplementação foi usado no presente estudo baseado no tempo necessário para os folículos primários se desenvolverem até o estágio antral, pois a duração desse estágio de desenvolvimento folicular é prolongado nos grandes mamíferos, por volta de dois meses (Campbell et al., 2000; Webb et al., 2004; Scaramuzzi et al., 2011).

Diferente do esperado, a viabilidade oocitária não foi afetada pela suplementação com linhaça. Diversos estudos em humanos e animais tem mostrado que em todos os estágios da maturação e desenvolvimento embrionário podem ser afetados pelo status nutricional das doadoras (Sinclair et al., 2000; Thangavelu et al., 2007; Cerri et al., 2009; Soubry et al., 2013). No entanto, é possível que alterações moleculares, não analisadas nesse estudo, tenham influenciado o desenvolvimento e qualidade embrionária.

Por outro lado, nossos resultados corroboram com pesquisas que não encontraram nenhum efeito nas características oocitárias ou desenvolvimento embrionário in vitro após suplementação na dieta de novilhas holandesas e vacas lactantes enriquecidas com linhaça ou soja em grão (Bilby et al., 2006; Fouladi-Nashta et al., 2009; Ponter et al., 2012). É importante enfatizar que os estudos citados avaliaram apenas características morfológicas e produção de embriões no D7. (Rossi et al., 2013) ao avaliar as taxas de viabilidade oocitária de vacas Holandesas suplementadas com torta de linhaça, observaram que o grupo suplementado não diferiu do grupo controle para esta variável. Deve-se salientar que ao fornecer a linhaça na forma de torta os ácidos graxos poliinsaturados ficam

mais susceptíveis a biohidrogenação ruminal, ainda assim os resultados foram semelhantes ao deste ensaio embora a linhaça tenha sido fornecida em grão. Da mesma forma (Domingues et al., 2014) não observaram diferença estatística sobre a taxa de blastocistos de vacas suplementadas com canola, uma fonte de ácidos graxos poliinsaturados ricos em ácido linoleico n-6.

Similarmente, (Guardieiro et al., 2014) não observaram efeitos na produção de embriões após a superovulação de novilhas Nelores suplementadas com gordura protegida do rúmen rica em ácido linolênico. No entanto, resultados baseados no fornecimento de lipídios específicos como suplemento nutricional para bovinos são contraditórios, pois na maioria das vezes é difícil saber se o efeito da dieta no oócito e qualidade embrionária é devido aos efeitos diretos de certos lipídios que alteram a concentração dos metabólitos no ambiente folicular ou se é por causa das variações nas concentrações plasmáticas de metabólitos e hormônios (Cerri et al., 2009; Leroy et al., 2009; Zachut et al., 2010).

As membranas celulares parecem ser o principal local a ser lesado na criopreservação dos embriões, e a fluidez da membrana determina a concentração de lesão a ser causada na mesma durante o congelamento do embrião (Zeron et al., 2002). Nesse sentido, a taxa de re-expansão funciona como um indicativo de sobrevivência. Neste experimento, a criotolerância dos embriões produzidos in vitro foi avaliada, através da velocidade de re-expansão após aquecimento. Embora 24 horas após aquecimento nenhuma diferença tenha sido observada, os embriões provenientes de oócitos de doadoras suplementadas com dieta enriquecida com ácidos graxos poli-insaturados tiveram uma maior velocidade de re-expansão, visto que 3 horas após aquecimento/desvitrificação o grupo tratado apresentou maior taxa de embriões re-expandidos. Estudos anteriores demonstraram que a taxa de prenhez foi maior nos embriões que re-expandiram mais rapidamente após o aquecimento em comparação com aqueles que demoraram a se re-expandir (Shu et al., 2009), o que nos encoraja a afirmar que a suplementação com linhaça tenha sido benéfica à criotolerância dos embriões.

Possivelmente o aumento da velocidade de expansão pós vitrificação, tenha sido resultado do aumento da permeabilidade e fluidez da membrana fosfolipídica

dos embriões das vacas Pantaneiras suplementadas com uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados, permitindo que as trocas entre os meios intra e extracelular fossem facilitadas levando a otimização das atividades metabólicas essenciais ao desenvolvimento embrionário após vitrificação (Leao et al., 2015). Para dar suporte a essas informações, em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, avaliando a digestibilidade e degradabilidade da linhaça, foi observado baixo potencial de degradabilidade no rúmen pelos microorganismos, em torno de 20.7% (Cardoso et al., 2018) e quando associado ao aumento da digestibilidade do extrato etéreo, especula-se que os animais absorveram os ácidos graxos presentes na linhaça, estando assim, disponíveis na corrente sanguínea e alcançando o microambiente folicular e consequentemente sendo absorvidos pelos COCs e promovendo alteração no seu perfil lipídico.

Em conclusão, a suplementação de 0,800 Kg/animal/dia de linhaça em grão, uma fonte rica em ácido linolênico, para fêmeas da raça Pantaneira incrementou a qualidade e criotolerância dos embriões produzidos *in vitro*.

5. Referências bibliográficas

- Bilby, T.R., Block, J., do Amaral, B.C., Sa Filho, O., Silvestre, F.T., Hansen, P.J., Staples, C.R., Thatcher, W.W., 2006. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *Journal of dairy science* 89, 3891-3903.
- Bilodeau-Goeseels, S., 2006. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology* 66, 297-306.
- Boland, M.P., Lonergan, P., O'Callaghan, D., 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55, 1323-1340.
- Campbell, B.K., Telfer, E.E., Webb, R., Baird, D.T., 2000. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 163, 131-139.
- Cardoso, C.J.T., de Lima, A.C.B., Nogueira, É., de Oliveira, M.V.M., de Andrade Melo-Sterza, F., 2018. Performance and digestive characteristics in dairy cattle maintained under grazing regime and supplemented with linseed. *Semina: Ciências Agrárias* 39, 1805-1818.

- 1521 Cavalieri, F., Santos, G., Matsushita, M., Petit, H.V., Rigolon, L.P., Silva, D., Horst,
1522 J.A., Capovilla, L., Ramos, F., 2005. Milk production and milk composition of dairy
1523 cows fed Lac100® or whole flaxseed. *Canadian journal of animal science* 85, 413-
1524 416.
- 1525 Cerri, R.L., Juchem, S.O., Chebel, R.C., Rutigliano, H.M., Bruno, R.G., Galvao,
1526 K.N., Thatcher, W.W., Santos, J.E., 2009. Effect of fat source differing in fatty acid
1527 profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing
1528 dairy cows. *Journal of dairy science* 92, 1520-1531.
- 1529 Cochran, R., Adams, D., Wallace, J., Galyean, M., 1986. Predicting Digestibility of
1530 Different Diets with Internal Markers: Evaluation of Four Potential Markers 1. *Journal*
1531 *of animal science* 63, 1476-1483.
- 1532 Council, N.R., 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. rev. Natl. Acad. Press,
1533 Washington DC.
- 1534 Cuello, C., Gomis, J., Almiñana, C., Maside, C., Sanchez-Osorio, J., Gil, M.,
1535 Sánchez, A., Parrilla, I., Vazquez, J., Roca, J., 2013. Effect of MEM vitamins and
1536 forskolin on embryo development and vitrification tolerance of in vitro-produced pig
1537 embryos. *Animal reproduction science* 136, 296-302.
- 1538 Cupersmid, L., Fraga, A.P.R., de Abreu, E.S., Pereira, I.R.O., 2012. Linhaça:
1539 Composição química e efeitos biológicos. *e-Scientia* 5, 33-40.
- 1540 Domingues, M., Rigolon, L., Cavalieri, F., Seko, M., Albuquerque, K., Zancheta, C.,
1541 2014. Viabilidade de embriões vitrificados oriundos da fertilização in vitro de oócitos
1542 de vacas suplementadas com canola. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*
1543 *Zootecnia* 66, 145-151.
- 1544 Fernandes, S.R., de Freitas, J.A., de Souza, D.F., Kowalski, L.H., Dittrich, R.L.,
1545 Junior, P.R., da Silva, C.J.A., 2012. Lipidograma como ferramenta na avaliação do
1546 metabolismo energético em ruminantes. *Current Agricultural Science and*
1547 *Technology* 18.
- 1548 Ferreira, M.G.C.R., Cáceres, M.B.S., de Oliveira Brochado, N.C., Junior, J.S.O.,
1549 Oliveira, M.V.M., Sterza, F.D.A.M., 2017. Follicular dynamics of induced estrus of
1550 females from the Pantaneira breed. *Acta Veterinaria Brasilica* 11, 133-136.
- 1551 Fouladi-Nashta, A.A., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Garnsworthy, P.C., Webb, R.,
1552 2007. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating
1553 dairy cows. *Biology of reproduction* 77, 9-17.
- 1554 Fouladi-Nashta, A.A., Wonnacott, K.E., Gutierrez, C.G., Gong, J.G., Sinclair, K.D.,
1555 Garnsworthy, P.C., Webb, R., 2009. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on
1556 high levels of n-3 and n-6 fatty acids. *Reproduction* 138, 771-781.

- 1557 Freitas Júnior, J.E.d., Rennó, F.P., Silva, L.F.P., Gandra, J.R., Maturana Filho, M.,
1558 Foditsch, C., Venturelli, B.C., 2010. Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras
1559 suplementadas com diferentes fontes de gordura. *Ciência Rural* 40, 950-956.
- 1560 Gagliostro, G., Chilliard, Y., 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and
1561 midlactation cows. 4. In vivo and in vitro adipose tissue lipolytic responses. *Journal*
1562 *of dairy science* 74, 1830-1843.
- 1563 Guardieiro, M.M., Machado, G.M., Bastos, M.R., Mourão, G.B., Carrijo, L.H., Dode,
1564 M.A., Leroy, J.L., Sartori, R., 2014. A diet enriched in linoleic acid compromises the
1565 cryotolerance of embryos from superovulated beef heifers. *Reproduction, Fertility*
1566 *and Development* 26, 511-520.
- 1567 Hautrive, T.P., de Moura, G.B., Callegaro, M.d.G.K., Hecktheuer, L.H.R., 2011.
1568 Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) sob diferentes formas de preparo na
1569 resposta biológica em ratos Effect of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) prepared by
1570 different methods on the biological response of rats. *Revista de Nutrição* 24, 131-
1571 141.
- 1572 Hawkins, D.E., Niswender, K.D., Oss, G.M., Moeller, C.L., Odde, K.G., Sawyer,
1573 H.R., Niswender, G.D., 1995. An increase in serum lipids increases luteal lipid
1574 content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *Journal of*
1575 *animal science* 73, 541-545.
- 1576 Leao, B.C., Rocha-Frigoni, N.A., Cabral, E.C., Coelho, M.B., Ferreira, C.R., Eberlin,
1577 M.N., Accorsi, M.F., Nogueira, E., Mingoti, G.Z., 2015. Improved embryonic
1578 cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is
1579 related to changes in the membrane lipid profile. *Theriogenology* 84, 127-136.
- 1580 Leao, B.C.S., Rocha-Frigoni, N.A.S., Nogueira, E., Cabral, E.C., Ferreira, C.R.,
1581 Eberlin, M.N., Accorsi, M.F., Neves, T.V., Mingoti, G.Z., 2017. Membrane lipid
1582 profile of in vitro-produced embryos is affected by vitrification but not by long-term
1583 dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids for oocyte donor beef heifers.
1584 *Reproduction, fertility, and development* 29, 1217-1230.
- 1585 Lemay, A., Dodin, S., Kadri, N., Jacques, H., Forest, J.C., 2002. Flaxseed dietary
1586 supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic
1587 menopausal women. *Obstetrics and gynecology* 100, 495-504.
- 1588 Leroy, J., Van Hoeck, V., Clemente, M., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Van Soom,
1589 A., Uytterhoeven, M., Bols, P., 2009. The effect of nutritionally induced
1590 hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality. *Human reproduction* 25, 768-778.
- 1591 Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, M., 2003. Oocyte and
1592 embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns.
1593 *Reproduction in Domestic Animals* 38, 259-267.

- 1594 Men, H., Agca, Y., Riley, L.K., Critser, J.K., 2006. Improved survival of vitrified
1595 porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and
1596 inhibition of apoptosis. *Theriogenology* 66, 2008-2016.
- 1597 Moawad, A.R., Tan, S.L., Xu, B., Chen, H.Y., Taketo, T., 2013. L-carnitine
1598 supplementation during vitrification of mouse oocytes at the germinal vesicle stage
1599 improves preimplantation development following maturation and fertilization in vitro.
1600 *Biology of reproduction* 88, 104.
- 1601 Nagaraja, T., Newbold, C., Van Nevel, C., Demeyer, D., 1997. Manipulation of
1602 ruminal fermentation, *The rumen microbial ecosystem*, Springer, pp. 523-632.
- 1603 Nogueira, É., Silva, A.S.d., Amaral, T.B., Ítavo, L.C.V., Dias, A.M., Mingoti, G.Z.,
1604 2012. Follicular dynamics and production of oocytes in young Nellore heifers with
1605 energetic supplementation. *Revista Brasileira de Zootecnia* 41.
- 1606 Nunes, A.A., Favaro, S.P., Galvani, F., Miranda, C.H.B., 2015. Good practices of
1607 harvest and processing provide high quality Macauba pulp oil. *Eur J Lipid Sci Tech*
1608 117, 2036-2043.
- 1609 Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Guastali, M.D., Dias Maziero, R.R., Crocomo, L.F.,
1610 Ona Magalhaes, L.C., da Silva Rascado, T., Martins, A., da Cruz Landim-Alvarenga,
1611 F., 2014. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in
1612 the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote* 22, 146-157.
- 1613 Paschoal, D.M., Sudano, M.J., Schwarz, K.R.L., Maziero, R.R.D., Guastali, M.D.,
1614 Crocomo, L.F., Magalhaes, L.C.O., Martins, A., Jr., Leal, C.L.V., Landim-Alvarenga,
1615 F.D.C., 2017. Cell apoptosis and lipid content of in vitro-produced, vitrified bovine
1616 embryos treated with forskolin. *Theriogenology* 87, 108-114.
- 1617 Petit, H.V., Dewhurst, R.J., Scollan, N.D., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresign, W.,
1618 Twagiramungu, H., Mann, G.E., 2002. Milk production and composition, ovarian
1619 function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *Journal of*
1620 *dairy science* 85, 889-899.
- 1621 Ponter, A., Guyader-Joly, C., Nuttinck, F., Grimard, B., Humblot, P., 2012. Oocyte
1622 and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying
1623 in their n-6/n-3 fatty acid ratio. *Theriogenology* 78, 632-645.
- 1624 Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M.,
1625 Lonergan, P., 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum:
1626 implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA
1627 expression. *Biology of reproduction* 68, 236-243.
- 1628 Rossi, G., Monteiro, F., Lima, M., Collado, M., Vantini, R., Garcia, J., 2013. Efeitos
1629 da suplementação com fontes de ácidos graxos em doadoras da raça Holandesa
1630 durante o pré e pós-parto sobre o retorno à ciclicidade e produção in vitro de
1631 embriões. *Boletim de Indústria Animal*.

- 1632 Sanches, B., Marinho, L., Pontes, J., Basso, A., Meirinhos, M., Silva-Santos, K.,
1633 Ferreira, C., Seneda, M., 2013. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of
1634 IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. *Theriogenology* 80,
1635 372-377.
- 1636 Santos, J.E., Cerri, R.L., Sartori, R., 2008. Nutritional management of the donor
1637 cow. *Theriogenology* 69, 88-97.
- 1638 Saragusty, J., Arav, A., 2011. Current progress in oocyte and embryo
1639 cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141, 1-19.
- 1640 Scaramuzzi, R., Baird, D., Campbell, B., Driancourt, M.-A., Dupont, J., Fortune, J.,
1641 Gilchrist, R., Martin, G., McNatty, K., McNeilly, A., 2011. Regulation of
1642 folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reproduction*,
1643 *Fertility and Development* 23, 444-467.
- 1644 Seamon, K., Daly, J.W., 1981. Activation of adenylate cyclase by the diterpene
1645 forskolin does not require the guanine nucleotide regulatory protein. *Journal of*
1646 *Biological Chemistry* 256, 9799-9801.
- 1647 Seamon, K.B., Padgett, W., Daly, J.W., 1981. Forskolin: unique diterpene activator
1648 of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proceedings of the National*
1649 *Academy of Sciences* 78, 3363-3367.
- 1650 Seidel, G.E., Jr., 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their
1651 cryopreservation. *Theriogenology* 65, 228-235.
- 1652 Shu, Y., Watt, J., Gebhardt, J., Dasig, J., Appling, J., Behr, B., 2009. The value of
1653 fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for
1654 transfer. *Fertility and sterility* 91, 401-406.
- 1655 Silva, D., Queiroz, A., 2002. Food analysis: Chemical and biological methods.
1656 Viçosa: Federal University of Viçosa.
- 1657 Silva, D., Queiroz, A.d., 1981. Análise de alimentos:(métodos químicos e
1658 biológicos). UFV, Impr. Univ. Viçosa.
- 1659 Sinclair, K., Kuran, M., Gebbie, F., Webb, R., McEvoy, T., 2000. Nitrogen
1660 metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers
1661 offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *Journal of animal*
1662 *science* 78, 2670-2680.
- 1663 Soubry, A., Schildkraut, J.M., Murtha, A., Wang, F., Huang, Z., Bernal, A.,
1664 Kurtzberg, J., Jirtle, R.L., Murphy, S.K., Hoyo, C., 2013. Paternal obesity is
1665 associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn
1666 Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC medicine* 11, 29.

- 1667 Staples, C.R., Burke, J.M., Thatcher, W.W., 1998. Influence of supplemental fats on
1668 reproductive tissues and performance of lactating cows. *Journal of dairy science* 81,
1669 856-871.
- 1670 Stringfellow, D., Seidel, S., 1998. Manual da sociedade internacional de
1671 transferência de embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso
1672 em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários.
1673 Illinois: Savoy.
- 1674 Stubbs, C.D., Smith, A.D., 1984. The modification of mammalian membrane
1675 polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function.
1676 *Biochimica et biophysica acta* 779, 89-137.
- 1677 Sturmey, R.G., Reis, A., Leese, H.J., McEvoy, T.G., 2009. Role of fatty acids in
1678 energy provision during oocyte maturation and early embryo development.
1679 *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 44 Suppl 3, 50-58.
- 1680 Sudano, M., Paschoal, D., Maziero, R., Rascado, T., Guastali, M., Crocomo, L.,
1681 Magalhães, L., Monteiro, B., Martins, A., Machado, R., 2013. Improving
1682 postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. *Animal*
1683 *Reproduction*, 160-167.
- 1684 Sudano, M.J., Caixeta, E.S., Paschoal, D.M., Martins, A., Jr., Machado, R., Buratini,
1685 J., Landim-Alvarenga, F.D., 2014. Cryotolerance and global gene-expression
1686 patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced
1687 blastocysts. *Reproduction, fertility, and development* 26, 1129-1141.
- 1688 Sudano, M.J., Paschoal, D.M., Rascado Tda, S., Magalhaes, L.C., Crocomo, L.F.,
1689 de Lima-Neto, J.F., Landim-Alvarenga Fda, C., 2011. Lipid content and apoptosis
1690 of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification.
1691 *Theriogenology* 75, 1211-1220.
- 1692 Thangavelu, G., Colazo, M.G., Ambrose, D.J., Oba, M., Okine, E.K., Dyck, M.K.,
1693 2007. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic
1694 development in lactating Holstein cows. *Theriogenology* 68, 949-957.
- 1695 Thomas, M.G., Williams, G.L., 1996. Metabolic hormone secretion and FSH-
1696 induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements
1697 containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. *Theriogenology*
1698 45, 451-458.
- 1699 Vajta, G., Rindom, N., Peura, T.T., Holm, P., Greve, T., Callesen, H., 1999. The
1700 effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts
1701 after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 52, 939-948.
- 1702 Vansoest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber,
1703 Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal
1704 Nutrition. *Journal of dairy science* 74, 3583-3597.

1705 Wada, F.Y., do Prado, I.N., Silva, R.R., Moletta, J.L., Visentainer, J.V., Zeoula, L.M.,
1706 2008. Grãos de linhaça e de canola sobre o desempenho, digestibilidade aparente
1707 e características de carcaça de novilhas nelore terminadas em confinamento.
1708 *Ciência Animal Brasileira* 9, 883-895.

1709 Webb, R., Garnsworthy, P., Gong, J.-G., Armstrong, D., 2004. Control of follicular
1710 growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of animal science* 82,
1711 E63-E74.

1712 Wu, Z., Palmquist, D.L., 1991. Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by
1713 ruminal microorganisms in vitro. *Journal of dairy science* 74, 3035-3046.

1714 Zachut, M., Dekel, I., Lehrer, H., Arieli, A., Arav, A., Livshitz, L., Yakoby, S.,
1715 Moallem, U., 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding
1716 dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and
1717 oocyte quality. *Journal of dairy science* 93, 529-545.

1718 Zeron, Y., Tomczak, M., Crowe, J., Arav, A., 2002. The effect of liposomes on
1719 thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes:
1720 implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* 45, 143-152.
1721

CAPÍTULO 3: METABOLISMO LIPÍDICO E ATIVIDADE MITOCONDRIAL DE OÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* COM DIFERENTES CINÉTICAS DE DESENVOLVIMENTO

Artigo formatado nas normas do periódico: *Reproduction*

Metabolismo lipídico e atividade mitocondrial em oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* com diferentes cinéticas de desenvolvimento

Christopher Junior Tavares Cardoso^a; Ralf Poehland^b; Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{a,c}

^a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Senador Felinto Muller 2443, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: christopherjtc@hotmail.com

^b Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Reproductive Biology, Wilhelm Stahl Allee, 2, 18196, Dummerstorf, Alemanha. E-mail: poehland@fhn-dummerstorf.de

^c Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rodovia Aquidauana-UEMS, km 12, 79200-000, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: fabiana.sterza@uems.br

Resumo: O presente trabalho objetivou avaliar o conteúdo lipídico e atividade mitocondrial de oócitos durante a maturação *in vitro* e em embriões com diferentes cinéticas de desenvolvimento e sua relação com a trimetilação da H3K4 em bovinos. No experimento 1, os oócitos foram coletados no tempo 0, 4, 8 e 24 horas e foram quantificados a intensidade de fluorescência de conteúdo lipídico, atividade mitocondrial e tri-metilação da H3K4. No experimento 2, os embriões foram divididos de acordo com a cinética de desenvolvimento. A clivagem embrionária foi avaliada 23 horas após o início da CIV (41hpi). Neste momento foram definidos os embriões dos grupos “rápido” (4 ou mais células) e “lento” (2 ou 3 células) e então reagrupados de acordo com a classificação. Amostras de embriões nos diferentes estágios de desenvolvimento embrionário foram coletadas e avaliadas pelas mesmas análises dos oócitos. Oócitos maduros após 24 horas apresentaram maior atividade mitocondrial ($p < 0,05$) que imaturos, não havendo diferença entre os demais períodos de maturação. Por outro lado, observou-se maior acúmulo lipídico logo após 4 horas de MIV. Oócitos maturados *in vitro* mostraram maior intensidade de fluorescência da H3K4me3 do que em oócitos imaturos. A taxa de blastocistos do grupo rápido foi maior ($P < 0,05$) que no grupo dos lentos. A atividade mitocondrial foi semelhante ($p > 0,05$) entre os estágios embrionários e entre grupos. O impacto da cinética de desenvolvimento foi observado somente no estágio de blastocisto, no qual o conteúdo lipídico foi maior ($p < 0,05$) no grupo dos embriões rápidos em comparação com os lentos. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) da intensidade de fluorescência da H3K4me3 entre as diferentes fases de desenvolvimento, porém na fase de blastocisto, observou-se que as células do embrioblasto tiveram maior ($p < 0,001$) intensidade de fluorescência que as células

do trofoblasto. Conclui-se que o acúmulo de lipídeos ocorre nas primeiras 4 horas da maturação *in vitro* de COCs de *Bos taurus*. Blastocistos rápidos apresentam maior conteúdo lipídico, sem interferência da atividade mitocondrial nessa fase. A H3K4me3 parece ser essencial para o desenvolvimento embrionário, especialmente no que diz respeito as células do embrioblasto mas isso não parece mediar a velocidade de desenvolvimento e metabolismo lipídico.

Palavras chave: epigenética; criopreservação; reprodução

1 Introdução

Oócitos e embriões bovinos cultivados *in vitro* acumulam mais lipídeo comparado aos obtidos *in vivo* (DEL COLLADO et al., 2015). Esse acúmulo já foi relacionado à presença de soro nos meios de maturação/cultivo *in vitro*, no entanto também é observado quando o meio contém reduzida concentração ou ausência de soro fetal bovino (SFB; RIZOS, 2002; ABE et al., 2002). O excessivo conteúdo lipídico tem sido relacionado à baixa criotolerância de oócitos e embriões produzidos *in vitro* - PIV (SEIDEL, 2006; HORVATH et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; LAPA et al., 2011), mas é fato que os embriões PIV de melhor qualidade são os mais tolerantes (ANDRADE et al., 2012), portanto a seleção dos embriões de melhor qualidade tem sido a principal estratégia para obtenção dos melhores resultados de criopreservação e prenhez.

Estudos tem sugerido a morfocinética como marcador metabólico em humanos, ratos, búfalos e bovinos (ISOM et al., 2012; LEESE, 2012) e a avaliação da cinética das primeiras clivagens dos embriões produzidos *in vitro* tem sido sugerida como ferramenta para selecionar os mais viáveis. Já foi demonstrado que blastocistos PIV rápidos e lentos (baseados na velocidade das primeiras clivagens) apresentam diferenças transcricionais, principalmente relacionadas ao metabolismo lipídico (MILAZZOTTO et al., 2016).

Sabe-se que os lipídeos intracelulares têm um papel fisiológico importante no desenvolvimento oocitário e embrionário, pois funcionam como um reservatório potencial de energia para o desenvolvimento embrionário inicial, especialmente antes da ativação de seu próprio genoma (KIM et al., 2001; ZERON et al., 2001; STURMEY et al., 2009), além de atuarem na biossíntese da membrana plasmática (AARDEMA et al., 2011). Os triglicerídeos (TG) são os lipídeos mais frequentes em

células de mamíferos e são armazenados na forma de gotas lipídicas (FERGUSON & LEESE, 1999).

Os TG são metabolizados por beta-oxidação e pelo ciclo de Krebs dentro da matriz mitocondrial, o que justifica o fato de mitocôndria e gotas lipídicas localizarem próximas umas das outras em oócitos de espécies domésticas (HYTTEL et al. 1986, SUN et al. 2001), formando as denominadas unidades metabólicas.

As mitocôndrias oocitárias são necessárias para suportar o desenvolvimento embrionário precoce porque a glicólise é limitada durante a maturação dos oócitos e o estágio inicial de desenvolvimento embrionário. Além disso não ocorre síntese “de novo” de mitocôndrias entre o estágio de metáfase II e blastocisto eclodido (revisado por BABAYEV et al., 2015).

A atividade mitocondrial aumenta no oócito maturado, principalmente nos de melhor qualidade morfológica e competência, nos quais foi observada aglomeração das mitocôndrias em clusters e maior produção de ATP (STOKOVICH et al., 2001; JESETA et al., 2014). Adicionalmente, embriões de melhor qualidade apresentam maior atividade mitocondrial (TARAZONA et al., 2006) e maior produção de ATP (STOKOVICH et al., 2001).

O conceito de que o metabolismo da célula é interligado na regulação da transcrição e da epigenética é reforçado pela habilidade que as células tem de adaptar o status molecular e metabólico em resposta ao ambiente extracelular e a disponibilidade de nutrientes (revisado por VANDER HEIDEN et al., 2009). Fatores ambientais e biotecnologias reprodutivas como cultivo *in vitro*, transferência nuclear e criopreservação podem alterar o perfil epigenético de gametas e embriões (JOUNEAU & RENARD, 2003).

Antes da implantação de embriões mamíferos, a transcrição é controlada pela regulação epigenômica, com modificações de histonas desempenhando papéis importantes. Em geral, a metilação de histonas está associada com o silenciamento transcricional, exceto em alguns casos como a da metilação da H3K4, que está associada principalmente à cromatina transcricionalmente ativa nas formas mono, di e trimetiladas.

A trimetilação da H3K4 (H3K4me3) está associada com eventos críticos tais como a diferenciação e ativação do genoma embrionário, o qual tem sido demonstrado em humanos (ZHANG et al., 2012) e bovinos (ROSS et al., 2008).

Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a cinética de desenvolvimento de oócitos maturados e embriões produzidos *in vitro*, no conteúdo lipídico, na atividade mitocondrial e na trimetilação da H3K4.

2 Material e métodos

O experimento foi realizado no Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN) em Dummerstorf - Alemanha.

Experimento 1: Atividade mitocondrial, conteúdo lipídico e trimetilação da H3K4 em oócitos bovinos submetidos a maturação in vitro

Oócitos bovinos foram coletados 0 (n=29), 4 (n=25), 8 (n=30) e 24 (n=21) horas após maturação *in vitro*, sendo considerado o tempo 0 hora, o momento logo após feita a aspiração do folículo.

Em cada período, os COCs foram desnudados e armazenados de acordo com a análise a ser feita. Para tal, parte dos oócitos foi corada para mensuração do conteúdo lipídico e atividade mitocondrial e outra parte destinada à coloração da H3K4me3, conforme delineamento experimental abaixo (Figura 1).

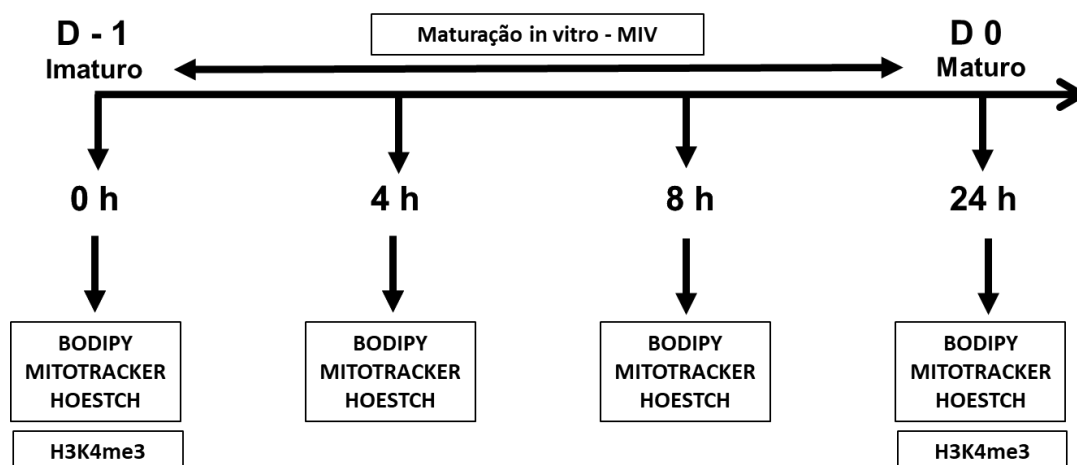


Figura 1-Delineamento experimental: análises e períodos de coleta de oócitos bovinos durante a maturação *in vitro* em meio sem soro fetal bovino.

Experimento 2: Atividade mitocondrial, conteúdo lipídico e trimetilação da H3K4 em embriões produzidos in vitro com diferentes cinéticas de desenvolvimento.

Nesta etapa objetivou-se avaliar o conteúdo lipídico e atividade mitocondrial e sua relação com a trimetilação da H3K4 em embriões com diferentes cinéticas de desenvolvimento. Para a determinação dos grupos, a clivagem embrionária foi avaliada 23 horas após o início da CIV (41hpi). Neste momento foram definidos os embriões dos grupos “rápido” (4 ou mais células) e “lento” (2 ou 3 células) e então reagrupados de acordo com a classificação. Considerando o momento da fertilização *in vitro* o tempo 0, foram coletados embriões de 2 e 4 células no momento da divisão dos grupos, ou seja, 41 horas pós inseminação (hpi), 8 células – 72 hpi, mórulas – 120 hpi e blastocistos – 168 hpi de ambos os grupos para as posteriores análises. Parte dos embriões foi submetida a coloração com bodipy, mitotracker e hoestch e outra parte fixados em PAF 3% + sacarose 2% para investigação da H3K4me3 por imunofluorescência.

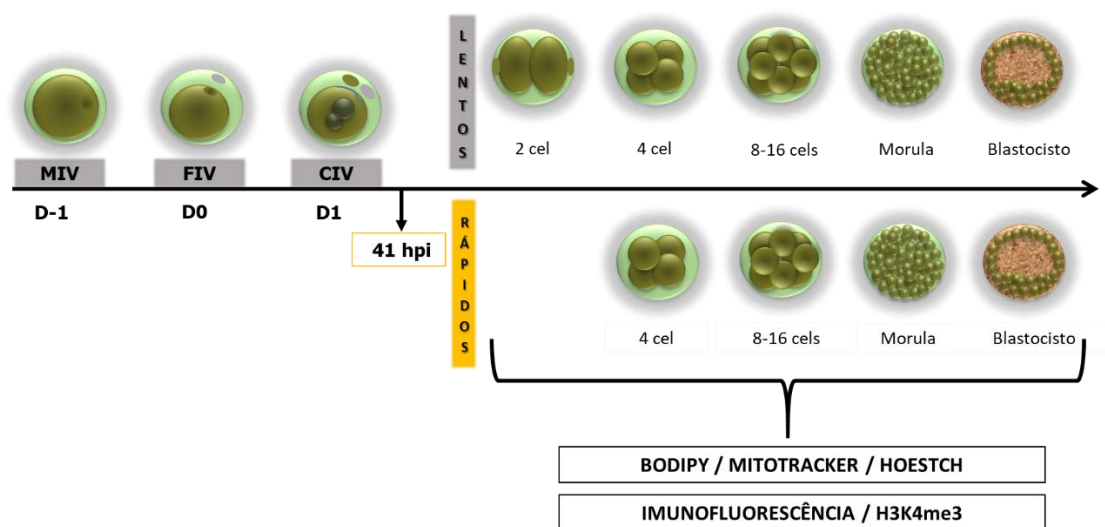


Figura 2: Delineamento experimental: análises e períodos de coletas de embriões bovinos com diferentes cinéticas de desenvolvimento embrionário.

Coleta dos oócitos

Ovários bovinos foram obtidos em um matadouro local, colocados em solução salina (0,9% NaCl) de 29°C a 33°C e transportados para o laboratório em até 2 horas após o abate. Os ovários foram lavados em PBS e os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram recuperados, por aspiração dos folículos antrais entre 2 a 8 mm. Para isto, utilizou-se agulha de 18 G acoplada a uma seringa de 5 mL e alocados em um tubo cônico de 50 mL. Em seguida, os COCs foram lavados em BO-WASH (IVF Bioscience, Falmouth, Cornwall, RU) e subsequentemente lavados com meio IVM (BO-IVM, IVF Bioscience, Falmouth, Cornwall, UK). Apenas COCs com ooplasma homogêneo e circundados por múltiplas camadas compactas de células do cumulus foram submetidos ao procedimento de maturação in vitro.

Maturação in vitro (MIV)

Os oócitos selecionados foram lavados e cultivados em meio IVM (BO-IVM, FIV Bioscience, Falmouth, Cornwall, Reino Unido). O procedimento de MIV foi realizado em placa de 4 poços (NUNC, Thermo Scientific, Rochester, NY, EUA) contendo 500 µl de meio BO-IVM sem óleo mineral, (máximo de 40 oócitos por poço) por 24 horas a 38,8°C, 6% de CO₂ com umidade máxima.

1894 *Fecundação in vitro*

1895 Foi utilizado sêmen de um único touro, previamente testado para FIV. As
1896 palhetas de sêmen foram descongeladas por 30 segundos em água à 37 °C, e o
1897 sêmen foi lavado em BO-SemenPrep 2 vezes. (BO-SemenPrep, FIV Bioscience,
1898 Falmouth, Cornwall, Reino Unido). Os COCs maduros foram transferidos para
1899 placas com 4 poços contendo 400µL de meio BO-IVF (BO-IVF, FIV Bioscience,
1900 Falmouth, Cornwall, Reino Unido) e co-incubados com os espermatozóides, por 18-
1901 22 horas em incubadora à 38,8°C, 6% CO₂ e umidade máxima.

1902

1903 *Cultivo in vitro*

1904 Os prováveis zigotos foram cultivados em placas com 4 poços contendo
1905 500µL meio BO-IVC (BO-IVC, FIV Bioscience, Falmouth, Cornwall, Reino Unido)
1906 sob óleo mineral em incubadora à 38,8°C, com 6% de CO₂, 6% de O₂ e umidade
1907 máxima. Nos dias 7 e 8 de cultivo embrionário era feita a avaliação para determinar
1908 a taxa de blastocistos.

1909

1910 *Atividade mitocondrial, conteúdo lipídico e oócitos e embriões*

1911 Para a coloração dos oócitos em diferentes períodos da maturação, os COCs
1912 eram imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora; n = 23) e após 4 (n =
1913 25), 8 (n = 30) e 24 horas (n = 21) de maturação eram transferidos para placas de
1914 4 poços com solução de tripsina / EDTA (0,05% / 0,02% p/v em PBS sem Ca²⁺ e
1915 Mg²⁺; Biochrom GmbH, Berlim, Alemanha) onde as células do cumulus eram
1916 removidas por sucessivas pipetagens sob estereomicroscópico. Também foram
1917 coletados embriões de 2 células (n = 11); 4 células (n = 25); 8 células (n = 24);
1918 mórulas (n = 18); e blastocistos (n = 35). Em seguida, os oócitos/embriões eram
1919 lavados duas vezes em PBS + BSA (0,3%) antes de serem submetido ao protocolo
1920 de coloração. As estruturas tiveram suas mitocôndrias coradas com o corante ativo
1921 MitoTracker® Orange CMTMRos (Mitotracker Orange; Molecular Probes, Eugene,
1922 OR, EUA) em concentração final de 300nM em PBS + BSA (0,3 %) durante 40 min
1923 a 38,8 em 6% de CO₂. Este corante mostra uma forte sensibilidade ao potencial de
1924 membrana mitocondrial e afinidade para a proteína mitocondrial (grupos tiol) e

1925 exibe alta retenção na organela em devido à alta co-localização com citocromo C
1926 oxidase (POOT et al. 1996).

1927 Após a coloração com Mitotracker, os oócitos e embriões eram transferidos
1928 para para uma solução de PBS + BSA (0,3%) contendo 3 µg / mL-1 do corante
1929 lipídico específico 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno
1930 (Bodipy 493/503; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) para corar gotículas
1931 lipídicas citoplasmáticas, onde permaneciam por 10 min. Em seguida, as estruturas
1932 coradas eram lavadas 2 vezes em PBS isento de Ca²⁺ + e Mg²⁺- e depois fixadas
1933 pelo menos 15 min em paraformaldeído - PAF (3%) e sacarose (2%).

1934 Após a fixação, as estruturas eram lavadas uma vez em PBS +
1935 polivinilpirrolidona - PVA (0,3%) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e duas
1936 vezes em PBS sem Ca²⁺ + e Mg²⁺- e então colocadas em lâminas de vidro com
1937 gotas de 2,5µg / mL-1 Hoechst 33342 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) +
1938 glicerina / PBS. Então as gotas eram sobrepostas pela lamínula de modo a
1939 homogeneizar o conteúdo. Para evitar danos à morfologia de oócitos/embriões
1940 desenhava-se o formato da lamínula com silicone. A lâminas permaneciam
1941 incubadas overnight à temperatura ambiente.

1942 As estruturas coradas foram analisadas com um microscópio confocal de
1943 varredura a laser (LSM 5 Pa) acoplado a um microscópio invertido Axiovert 200M
1944 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Um procedimento multi-canais foi usado para medir
1945 combinações de fluorescência (Mitotracker, Bodipy e Hoechst). As imagens ($\Delta z =$
1946 4 µm, 1024 x 1024 pixels) foram gravadas usando uma lente 40x (imersão em óleo)
1947 e software fornecido pela Carl Zeiss.

1948 A intensidade de fluorescência (IF) foi quantificada usando o programa
1949 ImageJ 1.47 (versão 1.60_65, Wayne Rasband; National Institutes of Health,
1950 Washington DC, USA) e as intensidades dos sinais de fluorescência foram
1951 analisadas por densitometria tridimensional. As regiões de interesse (ROIs) foram
1952 definidas em torno das estruturas coradas e foram quantificadas em pixels.

1953

1954

1955

1956 *Coloração por imunofluorescência de H3K4me3*

1957 Para as análises de imunofluorescência, foram utilizados oócitos imaturos (n
1958 = 15), maduros (n = 13) e embriões nos estágios de 8 células (n = 15), mórulas (n
1959 = 19) e blastocistos (n = 42). Para os grupos de oócitos, as células do cumulus
1960 foram removidas dos COCs selecionados por sucessivas pipetagens sob
1961 estereomicroscópio.

1962 As estruturas foram lavadas em PBS e fixadas em PAF (3%) + sacarose
1963 (2%) armazenadas a 4°C até análise. As estruturas foram então lavadas em
1964 solução tampão (TBS + 0.5% p/v BSA + 0,05% v/v Triton X100) quatro vezes por
1965 10 min à temperatura ambiente e permeabilizadas em solução tampão específica
1966 (HEPES 20 mM, saccharose 300 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 3 mM, 0.5% v/v Triton
1967 X100, pH 7.4, 10 min, 4°C). Após lavagem, a ligação não específica do anticorpo
1968 foi bloqueada por incubação com Roti Immuno-Block® (Carl Roth, Karlsruhe,
1969 Alemanha; 1:50 in H₂O, 2 h à temperatura ambiente).

1970 Após isso, as estruturas foram expostas ao anti-corpo policlonal contra a
1971 H3K4 tri-metilada (Cell Signaling; 1:1000 in Roti Immuno Block 1:100 in PBS +
1972 0.02% Tween 20) overnight à 4°C.

1973 As estruturas foram então, lavadas novamente em solução tampão (4 x 10
1974 min, temperaturam ambiente) e incubadas com o segundo anti-corpo (Alexa-
1975 Fluor® 647, Secondary Antibody Goat Anti-Rabbit, Invitrogen/Thermo Fischer®,
1976 Dreieich, Alemanha) por 5 h em ambiente escuro, à temperatura ambiente.

1977 Efetuou-se uma nova lavagem (4 x 10 min, solução tampão à temperatura
1978 ambiente) e foram coradas com SYBRGREEN® (S-7563, Molecular Probes,
1979 Thermo Fisher, Dreieich, Alemanha) numa diluição de 1:500 em PBS (1 h,
1980 temperatura ambiente). Após lavagem (4 x 10 min, solução tampão à temperatura
1981 ambiente) e a segunda fixação (PAF at 2% v/v in PBS, 4°C, overnight), as estruturas
1982 foram montadas em lâminas com gelatina glicerizada e armazenada a 4°C até
1983 análise microscópica.

1984 As estruturas coradas foram analisadas com um microscópio confocal a laser
1985 scanning (LSM 5 Pa) acoplado ao microscópio invertido Axiovert 200M (Carl Zeiss,
1986 Jena, Alemanha). Um procedimento multi-canal foi usado para medir as

combinações de fluorescência vermelha (AlexaFluor®) e fluorescência verde (SYBR GREEN®). As imagens ($\Delta z = 4 \mu\text{m}$, 1024×1024 pixels) foram gravadas usando lente 40x (imersão em óleo), e software fornecido pela Carl Zeiss.

As imagens de embriões individuais com uma distância de $2 \mu\text{m}$ entre as imagens na direção z foram recuperadas em trilhas duplas (lente de óleo de 40 vezes): Track1: Laser: Argônio 30 mW (458/488/514 nm) 488 nm / 12 %; HFT / NFT: 488/545 nm; Filtro: BP 505 a 530 nm Canal 1 (Canal 2 fechado); Track 2: Laser: HeNe 1 mW (543 nm) 543 nm / 60%; HFT / NFT: 543/545 nm; Filtro: LP 560-nm Channel 2 (Canal 1 fechado); Pinhole: 1 AU, ganho constante, com média: 2; Resolução: 1024×1024 .

Para a localização e quantificação da H3K4, as intensidades dos sinais de fluorescência foram analisadas por densitometria tridimensional (ImageJ) avaliando 10 células por embrião nos estágios de mórula e blastocistos (embrioblasto – forma arredondada e localização centralizada e trofoblasto – forma achatada e localização periférica) e todas as células nos estágios de 2, 4 e 8 células. As regiões de interesse (ROIs) foram definidas em torno dos núcleos relevantes. A intensidade de fluorescência depende da localização na direção z na pilha. No entanto, a intensidade da coloração nuclear (canal verde, faixa 1) foi constante. Portanto, a intensidade incidente da coloração nuclear (canal verde) na direção z foi utilizada para calcular o desvanecimento da fluorescência na direção z. Os dados foram normalizados para os controles (sem o primeiro anticorpo).

Análise estatística

Os dados referentes à produção de embriões intensidade de fluorescência, tanto de conteúdo lipídico, atividade mitocondrial e H3K4me3 de oócitos e embriões foram testados quanto à sua normalidade e então submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando encontrada diferença significativa foram submetidos ao teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As variáveis também foram analisadas pela correlação de Pearson. Todas as análises foram realizadas pelo software Prism® 7 (GraphPad Software, San Diego, CA USA).

3 Resultados

Exp 1: Atividade mitocondrial e conteúdo lipídico em oócitos bovinos submetidos a maturação *in vitro*

Oócitos maturados por 24 horas apresentaram maior atividade mitocondrial ($p < 0,05$) que oócitos imaturos, não havendo diferença entre os demais períodos de maturação (Figura 3A). Por outro lado, observou-se maior acúmulo lipídico logo após 4 horas da MIV (Figura 3B). Interessantemente, não foram observadas diferenças de conteúdo lipídico nos oócitos maturados por 4 e 8 horas comparado com os maturados por 24 horas, sugerindo que o acúmulo ocorre em grande parte logo após a inserção dos COCs em meio de maturação. Adicionalmente avaliamos a correlação dessas duas variáveis, e foi observado correlação positiva ($p > 0.0001$; $r = 0.67$) do conteúdo lipídico com a atividade mitocondrial nos oócitos, indicando participação ativa das mitocôndrias no metabolismo lipídico.

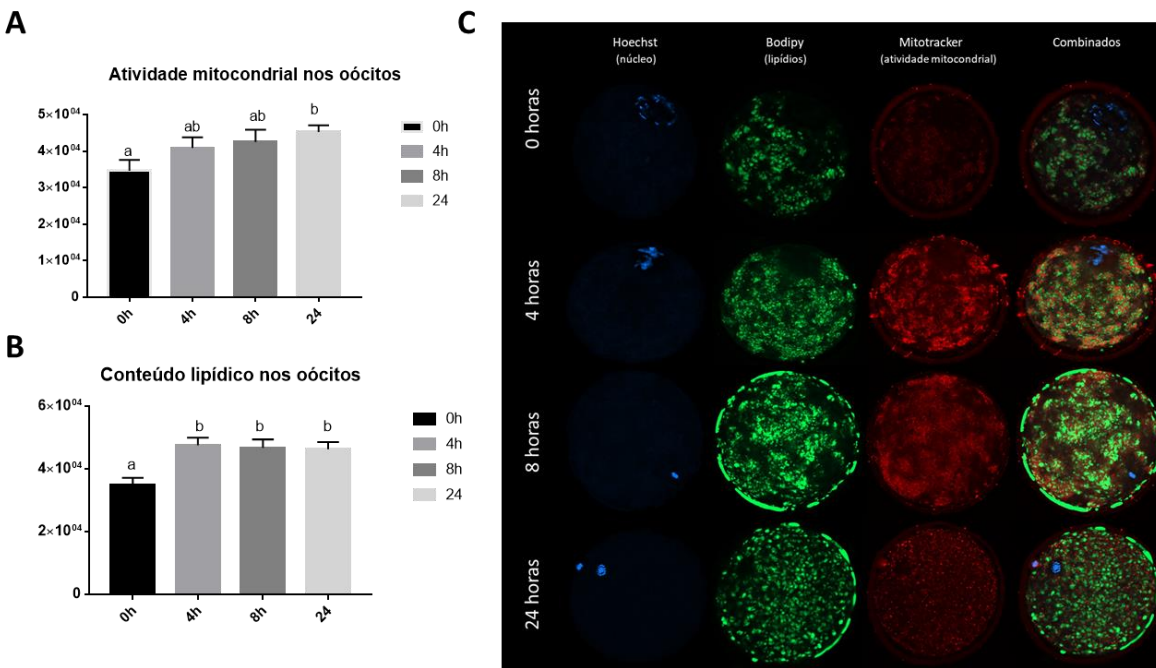


Figura 3: A) Intensidade de fluorescência da atividade mitocondrial (Mitotracker Orange); B) Intensidade de fluorescência do conteúdo lipídico (Bodipy 493/503); e C) imagens ilustrativas oócitos bovinos imaturos e após 4, 8 e 24 horas de maturação *in vitro*

As análises de imunofluorescência revelaram que os oócitos imaturos e maturados *in vitro* foram marcados positivamente para H3K4me3 e mostraram maior intensidade de fluorescência dos oócitos imaturos comparados com os maturados *in vitro* (Figura 4A e 4B).

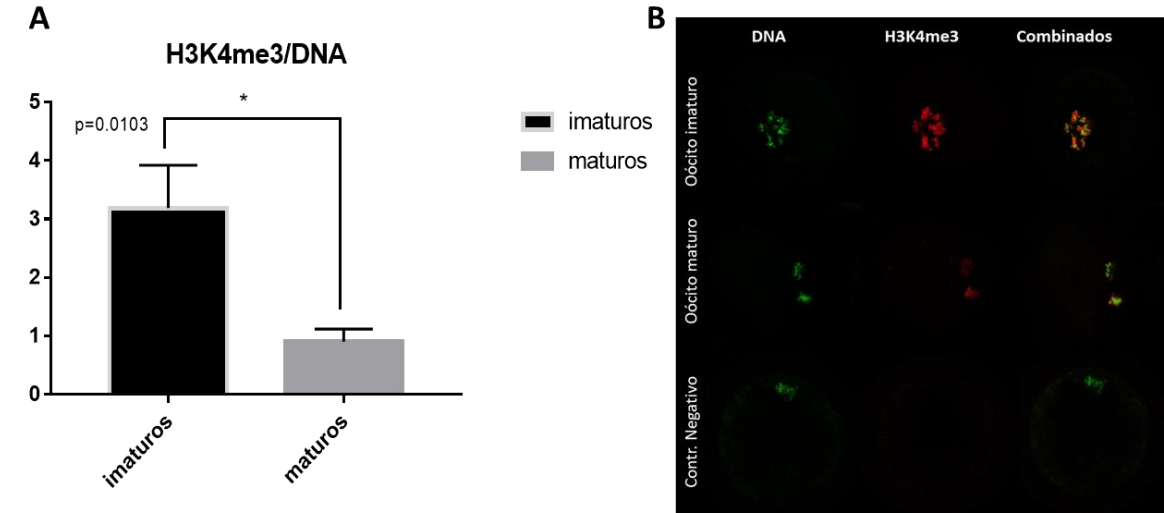


Figura 4: Relação da intensidade de fluorescência da H3K4me3 com a intensidade de DNA em oócitos bovinos imaturos e maturados *in vitro* por 24 horas.

Exp 2: Atividade mitocondrial, conteúdo lipídico e trimetilação da H3K4 em embriões bovinos produzidos *in vitro* com diferentes cinéticas de desenvolvimento.

Os embriões produzidos *in vitro* apresentaram uma taxa de clivagem de 67,7% (302/446) e taxa de blastocistos de 16,29% (44/270). Após 41 horas da inseminação *in vitro*, 34,5% dos embriões clivados estavam no estágio de 4 ou mais células e foram classificados como “rápidos”, enquanto a maioria (65,5%) estavam no estágio de 2-3 células e foram classificados como “lentos” (P<0,0001).

A taxa de blastocistos do grupo rápido foi de 36,5% (34 blastocistos / 93 embriões clivados) e foi superior ao grupo lento (5,65%; 10 blastocistos/177 embriões clivados; Tabela 1).

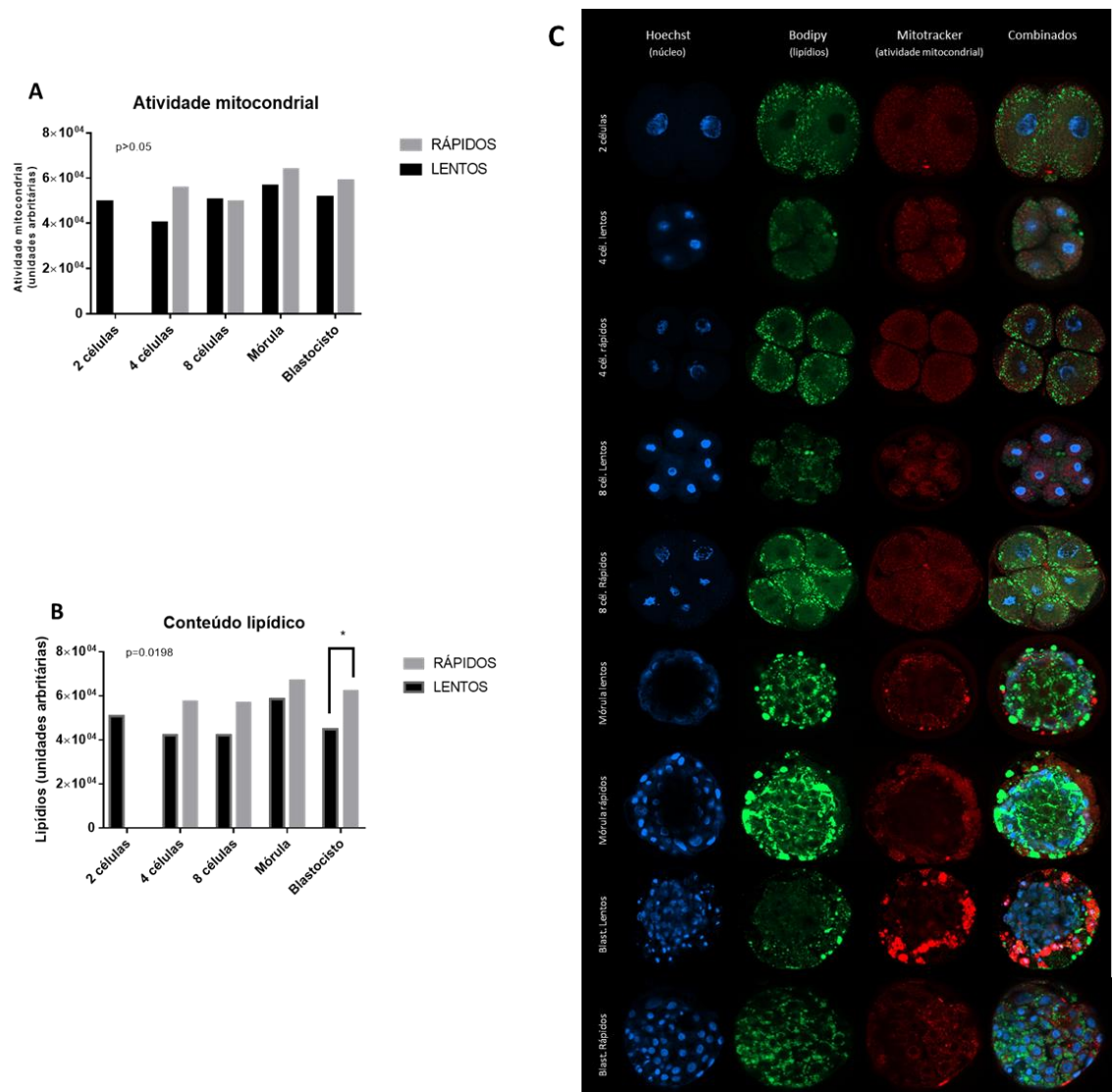
Tabela 1: Tava de clivagem e taxa de blastocistos em embriões rápidos e lentos.

PIV	% de clivagem		% de blastocisto	
	67,7±6,5		16,3±3,29	
Rápidos	34,5±5,01	P=0,0118	Rápidos	36,5±5,77
Lentos	65,5±14,01		Lentos	5,65±3,37
				P= 0,0011

*Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão.

Não houve interação da atividade mitocondrial entre estágios de desenvolvimento embrionário e grupos. No entanto a intensidade de fluorescência da atividade mitocondrial foi semelhante ($p>0,05$) entre os estágios embrionários dentro do mesmo grupo. Também não foi observada diferença quando comparamos a atividade mitocondrial de embriões de mesmo estágio de desenvolvimento entre grupos (Figura 6A). O impacto da cinética de desenvolvimento foi observado somente no estágio de blastocisto, no qual o conteúdo lipídico foi maior ($p<0,05$) no grupo dos embriões rápidos em comparação com os lentos (Figura 6B).

2070



2071

2072 Figura 6: A) Comparação da atividade mitocondrial e B) conteúdo lipídico em
2073 embriões com diferentes cinéticas de desenvolvimento de acordo com a velocidade
2074 das clivagens 41 horas após a fecundação *in vitro*. C) Imagens da atividade
2075 mitocondrial e conteúdo lipídico de embriões bovinos em diferentes fases de
2076 desenvolvimento.

2077

2078 Adicionalmente, analisamos a intensidade de fluorescência da H3K4me3 em
2079 embriões com diferentes cinéticas de desenvolvimento em diferentes estágios. Não
2080 houve interação entre grupo e estágio de desenvolvimento, dessa forma
2081 comparamos os estágios entre os grupos. Não foi observada diferença ($P>0,05$) da
2082 intensidade de fluorescência da H3K4me3 em embriões produzidos *in vitro* entre
os estágios de 8 células, mórula e blastocisto. No entanto, em blastocistos rápidos

e lentos, observou-se que as células do embrioblasto tiveram maior ($p<0.001$) intensidade de fluorescência que as células do trofoblasto.

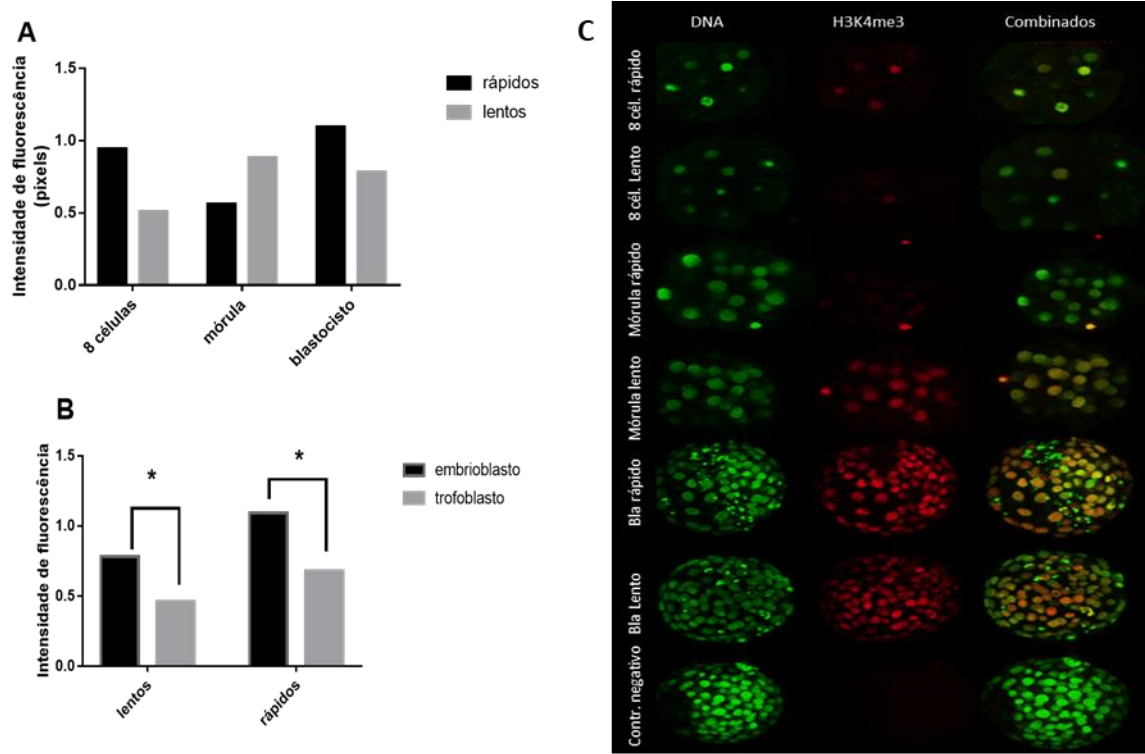


Figura 7: Intensidade de fluorescência da H3K4me3 (pixels) em A) embriões rápidos e lentos em diferentes estágios de desenvolvimento e em blastocistos B) entre células do trofoblasto e embrioblasto. C) Imagens de imunofluorescência da H3K4me3 em embriões rápidos e lentos em diferentes estágios de desenvolvimento.

4 Discussão

O conteúdo lipídico de embriões produzidos *in vitro* tem sido relacionado à baixa criotolerância dos embriões e reduzidas taxas de prenhez (RIZOS et al., 2002; SEIDEL, 2006). Já foi demonstrado que esse acúmulo lipídico é uma das consequências da exposição dos gametas à ambientes não fisiológicos, como a MIV em bovinos (DEL COLLADO et al., 2016).

Neste estudo, hipotetizamos que acúmulo lipídico nos oócitos maturados *in vitro* ocorresse antes de 9 horas de maturação. Mensuramos o conteúdo lipídico após 4 e 8 horas de maturação e observamos que conteúdo lipídico nesses períodos foram semelhantes aos de oócitos maturados por 24 horas. Já foi relatado

que o acúmulo lipídico excessivo em oócitos maturados *in vitro* é mediado pelo transporte desregulado da proteína transportadora de ácidos graxos denominada FABP3 por meio de projeções transzonais (TZPs). As TZPs são canais de comunicação, que permitem o transporte de moléculas grandes, tais como mRNAs (MACAULAY et al., 2014). Acredita-se que as TZPs mantêm o transporte ativo até as 9 horas da maturação e que a partir deste momento, após a retomada da meiose, o transporte diminui, sendo que as TZPs se desfazem gradualmente até as 22 horas da maturação quando não se detectam mais (MACAULAY et al., 2014). Em um estudo feito com oócitos oriundos de *Bos indicus* (Nelore), comparando oócitos imaturos e oócitos maturados por 9 e 18 horas, foi observada a presença da FABP3 dentro das TZPs durante a MIV e o aumento do conteúdo lipídico foi associado ao aumento dos níveis dessa proteína, indicando que nas 9 primeiras horas de maturação os oócitos tiveram conteúdo lipídico semelhante aos maturados por 18 horas (DEL COLLADO et al., 2017). No entanto, neste experimento foram utilizados materiais provenientes de animais *Bos taurus*, e observamos que esse mecanismo de absorção de lipídios ocorre logo nas 4 primeiras horas de maturação, diferentemente do que foi encontrado para *Bos indicus*.

Além disso também foi encontrado uma correlação positiva com a atividade mitocondrial, mostrando a participação das mitocôndrias no metabolismo lipídico dos oócitos. A atividade mitocondrial já foi previamente relacionada ao metabolismo lipídico via ação da enzima carnitina palmitoil transferase I e II que faz a translocação de ácidos graxos para dentro da mitocôndria, onde são metabolizados em acetil-CoA através da β -oxidação, e posteriormente metabolizados no ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa para produção de ATP (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), dessa forma indicando que quanto maior o conteúdo lipídico, consequentemente se tem uma maior atividade mitocondrial. A atividade mitocondrial também foi maior nos oócitos maduros comparados aos imaturos, semelhantemente a resultados já relatados na literatura (GOTTARDI, 2009; MENDEZ et al., 2018), que associaram uma maior atividade mitocondrial com maior competência do oócito (VAN BLERKOM et al., 2002; TARAZONA et al., 2006). Aparentemente, altos níveis de atividade mitocondrial são necessários para

eventos relacionados à maturação que são dependentes da geração de ATP, tais como maturação nuclear e competência meiótica (DE VANTERY ET AL. 1997; PICTON ET AL. 1998), maturação do citoplasma (PICTON et al., 1998), reorganização do citoesqueleto (WANG & LESSMAN, 2002; VAN BLERKOM et al. 2000), bem como acúmulo de mRNAs necessários para o desenvolvimento inicial antes do início da transcrição embrionária (GARY, 2001; TROUSON et al. 2001). Neste experimento, não foi avaliado a taxa de maturação oocitária, porém nos oócitos maturados por 24 horas, observou-se que quase a totalidade dos oócitos a extrusão do corpúsculo polar e células do cumulus expandidas.

Neste estudo, os embriões foram divididos de acordo com o período da segunda clivagem em rápidos e lentos. Após isso, os embriões foram cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto. Corroborando com nossos dados, outros estudos (MILAZZOTTO et al., 2016;) já mostraram que a formação de blastocistos foi reduzida quando a clivagem foi atrasada, especificamente no período da segunda divisão celular. Ainda de forma semelhante, observamos que os embriões classificados como lentos foram capazes de se tornar blastocistos no mesmo tempo dos classificados como rápidos. Neste caso, devemos enfatizar que a maioria dos estudos avaliaram a primeira clivagem para divisão de grupos em rápidos e lentos (LONERGAN ET AL., 1999; FAIR ET AL., 2004; HELD ET AL., 2012), nós avaliamos a segunda clivagem para simular os métodos clínicos que melhor predizem a viabilidade de blastocistos humanos (CRUZ ET AL., 2012; HASHIMOTO ET AL., 2012).

Neste estudo, também analisamos o comportamento do conteúdo lipídico durante o desenvolvimento embrionário inicial em embriões com diferentes cinéticas de desenvolvimento. Interessantemente, observamos que os blastocistos classificados como rápidos tiveram um maior conteúdo lipídico comparado com os lentos, sem alteração na atividade mitocondrial. Esses resultados diferem dos encontrados por SUDANO et al., (2016) que utilizando duas condições ambientais de cultivo *in vitro* para a produção de embriões observaram que independente do meio de cultivo utilizado houve diminuição do conteúdo lipídico até o estágio de 8-16 células, aumento no estágio de mórula e redução no estágio de blastocisto. No

entanto, com o nosso meio de cultivo sendo livre de soro fetal bovino não observamos diferença entre os estágios de desenvolvimento.

Já foi relatado que embriões que clivam mais rapidamente tiveram melhores taxas de criotolerância (DINNYÉS et al., 1999). No entanto, estes embriões foram cultivados em grupos e não tiveram conteúdo lipídico mensurado. As diferenças nos métodos de cultivo e o tempo utilizado para determinar embriões rápidos e lentos dificulta inferir qual dos grupos seria o melhor candidato a criopreservação.

Já foi demonstrado que embriões com menores teores de conteúdo lipídico tiveram melhores taxas de re-expansão após congelamento (HELD-HOELKER et al., 2017; ZOLINI et al., 2019), mas essa característica não influenciou a taxa de prenhez de embriões vitrificados (ZOLINI et al., 2019). Dados controversos também já foram relatados em embriões que tiveram o conteúdo lipídico reduzido posteriormente também tiveram a produção de embriões e taxa de re-expansão após desvitrificação reduzidas (DIAS et al., 2020). Interessantemente, os embriões que tiveram maior criotolerância, não foram aqueles que tiveram menores teores lipídicos (HELD-HOELKER et al., 2017). Nesse sentido nas condições deste experimento acredita-se que a maior quantidade de lipídios esteja relacionada com melhor qualidade do embrião.

Já é conhecido que as técnicas de reprodução assistida como protocolos de superovulação, produção in vitro de embriões e criopreservação podem afetar o padrão epigenético de gametas, embriões e descendentes futuros (URREGO, et al., 2014; SOUZA-CÁCERES et al., 2016). Sabe-se também, que a metilação da H3K4 é crucial para a viabilidade embrionária no período de pré-implantação pois exerce importante papel na regulação de genes pluripotentes (FEIL, 2009; MURATA et al., 2010).

No presente estudo investigamos a distribuição da H3K4me3 em oócitos imaturos e maturados in vitro e foi observado uma queda expressiva na intensidade dessa marca epigenética entre esses estágios. O desenvolvimento do oócito VG até a metáfase II (MII), período denominado maturação oocitária final, é caracterizado pela capacidade de reinício da divisão meiótica (COTICCHIO et al., 2004). No período pré-ovulatório, a transcrição dos oócitos MII praticamente cessa

(WRENZYCKI et al., 2007), fenômeno acompanhado por alteração das MPT's (Transição da permeabilidade mitocondrial; DE LA FUENTE et al., 2004; BOUNIOL-BALY et al., 1999), como a metilação da H3K9 (CHEN et al., 2016) e uma queda considerável no grau de metilação da H3K4 e acetilação de histonas. Outros estudos também já relataram essa diminuição da metilação da H3K4 durante a maturação oocitária sugerindo que as modificações epigenéticas estão associadas com a aquisição da competência do oócito (SCHULTZ et al., 2002; PARK et al., 2011).

Além disso, embora a função da trimetilação da H3K4 no desenvolvimento embrionário não ser bem compreendida, sabe-se que, assim como nos oócitos, são consideradas promotores transcripcionais, ou seja, promovendo a expressão gênica (DADA et al., 2012). Neste estudo, todas as estruturas avaliadas mostraram coloração positiva para a tri-metilação da H3K4, independente da velocidade de clivagem dos embriões, sugerindo que essa marca epigenética é essencial para o desenvolvimento do embrião, assim como já demonstrado em outros estudos (WU et al., 2020; LIU et al., 2016), mas aparentemente não está relacionada ao metabolismo lipídico.

Interessantemente, os blastocistos avaliados mostraram intensa coloração da H3K4me3 em células da massa celular interna, e intensidade menor nas células do trofotoderma. Tais diferenças podem ser facilmente explicadas pelo fato da massa celular interna e do trofotoderma serem as primeiras duas linhagens diferenciação celular (ROSSANT & TAM, 2009), dessa forma, diferenciando-se em padrões epigenéticos. Esses achados são diferentes dos obtidos por Lunardelli et al., (2016), que relataram maior intensidade de fluorescência para a mono-metilação da H3K4 nas células do trofoblasto em relação às células da massa celular interna.

Conclui-se que o acúmulo de lipídeos ocorre nas primeiras 4 horas da maturação in vitro de COCs de *Bos taurus*. Adicionalmente, verificou-se que blastocistos rápidos apresentam maior conteúdo lipídico, sem interferência da atividade mitocondrial nessa fase. A H3K4me3 parece ser essencial para o desenvolvimento embrionário, especialmente no que diz respeito as células do

2227 embrioblasto mas isso não parece mediar a velocidade de desenvolvimento e
2228 metabolismo lipídico. Ainda assim, é preciso realizar mais estudos para esclarecer
2229 melhor a relação do conteúdo lipídico e a fertilidade dos embriões e sua relação
2230 com as marcas epigenéticas.

2231

2232 **5 Referências bibliográficas**

2233 AARDEMA, H.; VOS, P.L.A.M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B.A.J.; KNIJN, H.M.;
2234 VAANDRAGER, A.B.; HELMS, J.B.; GADELLA, B.M. Oleic acid prevents
2235 detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental
2236 competence. **Biology of Reproduction**, v.85, p.62–69, 2011.

2237 ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid
2238 droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different
2239 culture systems using serum-free or serum-containing media. **Mol. Reprod. Dev.**,
2240 v. 61, p. 57-66, 2002.

2241 ANDRADE, G. A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de
2242 embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**,
2243 Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012.

2244 BABAYEV, Elnur; SELI, Emre. Oocyte mitochondrial function and reproduction.
2245 **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 27, n. 3, p. 175, 2015.

2246 CRUZ, M., GARRIDO, N., HERRERO, J., PÉREZ-CANO, I., MUÑOZ, M.,
2247 MESEGUER, M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked
2248 with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*; 25:371-81, 2012.

2249 DADA, R.; KUMAR, M.; JESUDASAN, R.; FERNÁNDEZ, J. L.; GOSÁLVEZ, J.;
2250 AGARWAL, A. Epigenetics and its role in male infertility. **Journal of Assisted
2251 Reproduction and Genetics**, New York, v. 29, n. 3, p. 213-223, 2012.

2252 DEL COLLADO, M. et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum
2253 supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in
2254 oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reprod Fertil Dev**, 28, 1721-
2255 1732. 2015.

2256 DEL COLLADO, Maite et al. Fatty acid binding protein 3 and transzonal projections
2257 are involved in lipid accumulation during in vitro maturation of bovine oocytes.
2258 **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

2259 DE VANTERY C, STUTZ A, VASSALLI JD, SCHORDERET-SLATKINE S.
2260 Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes is controlled at both
2261 translational and posttranslational levels. **Dev Biol** 187, 43–54, 1997.

2262 DIAS, L.R.O., LEME, L.O., SPRÍCIGO, J.F.W., PIVATO, I., DODE, M.A.N. Effect of
2263 delipidant agents during in vitro culture on the development, lipid content, gene
2264 expression and cryotolerance of bovine embryos. **Reprod Domest Anim** 55(1), 11–
2265 20, 2020.

2266 DINNYÉS, A., LONERGAN, P., FAIR, T., BOLAND, M.P., YANG, X. Timing of the
2267 first cleavage post-insemination affects cryosurvival of in vitro-produced bovine
2268 blastocysts. **Mol Reprod Dev.** 53(3):318-24, 1999.

2269 FAIR, T., MURPHY, M., RIZOS, D., MOSS, C., MARTIN, F., BOLAND, M.P.,
2270 LONERGAN, P. Analysis of differential maternal mRNA expression in
2271 developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. **Mol Reprod**
2272 **Dev.**; 67:136-44, 2004.

2273 FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early
2274 embryos. **J Reprod Fertil**, v. 116, n. 2, p. 373-8, Jul 1999.

2275
2276 GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na
2277 aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod**
2278 **Anim**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

2279
2280 HASHIMOTO, S., KATO, N., SAEKI, K., MORIMOTO, Y. Selection of high-potential
2281 embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging.
2282 **Fertil Steril.** 97:332-7, 2012.

2283
2284 HELD, E., SALILEW-WONDIM, D., LINKE, M., ZECHNER, U., RINGS, F.,
2285 TESFAYE, D., SCHELLANDER, K., HOELKER, M. Transcriptome fingerprint of
2286 bovine 2-cell stage blastomeres is directly correlated with the individual
2287 developmental competence of the corresponding sister blastomere. **Biol Reprod.**
2288 87:154, 2012.

2289
2290 HELD-HOELKER, E., KLEIN, S.L., RINGS, F., SALILEW-WONDIM, D., SAEED-
2291 ZIDANE, M., NEUHOF, C., TESFAYE, D., SCHELLANDER, K., HOELKER, M.
2292 Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-carnitine and
2293 concurrent reduction of fatty acids. **Theriogenology** 96, 145–52, 2017.

2294
2295 HYTTTEL P, GREVE T, CALLESEN H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation
2296 and fertilization in cattle. **J Reprod Fertil** 1989; 38(suppl):35–47.

2297
2298 HORVATH, G.; SEIDEL Jr., G.E. Vitriification of bovine oocytes after treatment with
2299 cholesterol-loaded methyl-b-cyclodextrin. **Theriogenology**, v.66, p.1026-1033,
2300 2006.

2301 ISOM, S. C. et al. Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in
2302 vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization,
2303 somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. **Molecular reproduction and**
2304 **development**, v. 79, n. 3, p. 197–207, mar. 2012.

- 2305 JESETA, M. et al. Mitochondrial patterns in bovine oocytes with different meiotic
2306 competence related to their in vitro maturation. **Reproduction in Domestic**
2307 **Animals**, v. 49, n. 3, p. 469-475, 2014.
- 2308 JOUNEAU, Alice; RENARD, Jean-Paul. Reprogramming in nuclear transfer.
2309 **Current opinion in genetics & development**, v. 13, n. 5, p. 486-491, 2003.
- 2310 KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis
2311 of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes.
2312 **Reproduction**, v.122, p.131–138, 2001.
- 2313 LAPA, M.; MARQUES, C.C.; ALVES, S.P.; VASQUES, M.I.; BAPTISTA, M.C.;
2314 CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A.E.M.; BESSA, R.J.B; PEREIRA,
2315 R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence
2316 and fatty acid composition. **Reprod Dom Anim**, doi: 10.1111, 2011.
- 2317 LEESE, H. J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on.
2318 **Reproduction**. v. 143, n. 4, p. 417–27, abr. 2012.
2319
- 2320 LIU, X., WANG, C., LIU, W., LI, J., LI, C., KOU, X., ... GAO, S. Distinct features of
2321 H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in preimplantation embryos. **Nature**,
2322 537(7621), 558–562, 2016.
2323
- 2324 LONERGAN, P., KHATIR, H., PIUMI, F., RIEGER, D., HUMBLLOT, P., BOLAND,
2325 M.P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental
2326 characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos.
2327 **Journal of Reproduction and Fertility**;117: 159-67, 1999.
2328
- 2329 LUNARDELLI, Paula Alvares et al. Effect of follicular diameter, time of first cleavage
2330 and H3K4 methylation on embryo production rates of Bos indicus cattle. **Semina:**
2331 **Ciências Agrárias**, v. 37, n. 5, p. 3189-3200, 2016.
2332
- 2333 MACAULAY, A. D. et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte.
2334 **Biol Reprod**, v. 91, n. 4, p. 90, Oct 2014.
2335
- 2336 MENDEZ, Yoeli et al. Lipid content, mitochondrial activity and early embryo
2337 development in oocyte collected from crossbred cows (bos taurus indicus).
2338 **Veterinaria e Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 120-131, 2018.
- 2339 MILAZZOTTO, M. P.; GOISSIS, M. D.; CHITWOOD, J. L.; ANNES, K.; SOARES,
2340 C. A.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. Á.; ROSS, P. J. Early cleavages
2341 influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine
2342 blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 4, p. 324–336,
2343 2016.

- 2344 PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL,
2345 P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C.
2346 Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12
2347 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). **Animal Reproduction Science**, v.98,
2348 p.293-301, 2007.
- 2349 PICTON H, BRIGGS D, GOSDEN R. The molecular basis of oocyte growth and
2350 development. *Mol Cell Endocrinol* 145, 27–37, 1998.
- 2351 RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early
2352 embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and
2353 blastocyst quality. **Mol Reprod Dev**, v. 61, n. 2, p. 234-48, Feb 2002.
2354
- 2355 ROSSANT, J.; TAM, P. P. Blastocyst lineage formation, early embryonic
2356 asymmetries and axis patterning in the mouse. **Development**, Cambridge, v. 136,
2357 n. 5, p. 701- 713, 2009.
- 2358 ROSS, Pablo J. et al. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27
2359 trimethylation changes during bovine preimplantation development. **Reproduction**,
2360 v. 136, n. 6, p. 777-785, 2008.
- 2361 SEIDEL Jr., G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation.
2362 **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.
- 2363 STOJKOVIC, Miodrag et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate
2364 content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with
2365 morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and
2366 culture. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001.
- 2367 STURMEY, R.G.; REIS, A.; LEESE, H.J.; MCEVOY, T.G. Role of fatty acids in
2368 energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reprod**
2369 **Dom Anim**, v.44, p.50–58, 2009.
- 2370 SUN, Q.Y., WU, G.M., LAI, L., PARK, K.W., CABOT, R., CHEONG, H.T., DAY, B.N.,
2371 PRATHER, R.S. & SCHATTEN H. Translocation of active mitochondria during pig
2372 oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro.
2373 **Reproduction** 122 155–163, 2001.
2374
- 2375 SUTTON-MCDOWALL, M. L.; FEIL, D.; ROBKER, R. L.; THOMPSON, J. G.;
2376 DUNNING, K. R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production
2377 in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1632-1641,
2378 2012.
2379
- 2380 TARAZONA, A. M. et al. Mitochondrial activity, distribution and segregation in
2381 bovine oocytes and in embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic**
2382 **Animals**, v. 41, n. 1, p. 5-11, 2006.
2383

2384 TROUNSON, A., ANDERIESZ, C., JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro
 2385 and their developmental competence. **Reproduction** 121, 51–75, 2001.
 2386
 2387 VAN DER HEIJDEN GW, RAMOS L, BAART EB, VAN DEN BERG IM, DERIJCK
 2388 AA, VAN DER VLAG J, et al. Sperm-derived histones contribute to zygotic
 2389 chromatin in humans. **BMC Dev Biol**; 8:34, 2008.
 2390
 2391 VAN BLERKOM, Jonathan et al. Domains of high-polarized and low-polarized
 2392 mitochondria may occur in mouse and human oocytes and early embryos. **Human**
 2393 **Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 393-406, 2002.
 2394
 2395 WANG, T, LESSMAN, C.A. Isoforms of soluble alpha-tubulin in oocytes and brain
 2396 of the frog (genus Rana): changes during oocyte maturation. **Cell Mol Life Sci** 59,
 2397 2216–2223, 2002.
 2398
 2399 WU X, HU S, WANG L, LI Y, YU H. Dynamic changes of histone acetylation and
 2400 methylation in bovine oocytes, zygotes, and preimplantation embryos. **J Exp Zool**
 2401 **(Mol Dev Evol)**. 2020;1–12.

2402 ZERON, Y.A.; OCHERETNY, O.; KEDAR, A.; BOROCHOV, D.; SKLAN, D.; ARAV,
 2403 A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of
 2404 oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles.
 2405 **Reproduction**, v.121, p.447-454, 2001.

2406 ZOLINI, A.M., CARRASCAL-TRIANA, E., RUIZ DE KING, A., HANSEN, P.J.,
 2407 ALVES TORRES, C.A.; BLOCK, J. Effect of addition of L-carnitine to medium for
 2408 oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine
 2409 embryos produced in vitro. **Theriogenology** 133, 135–43, 2019.

2410



Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictor of antral follicle population in heifers

Christopher Júnior Tavares Cardoso¹, Jair Sábio de Oliveira Junior², Henrique Kischel³, Wilian Aparecido Leite da Silva³, Elielton Dias da Silva Arruda³, Mirela Brochado Souza-Cáceres⁴, Fernanda Amarante Mendes de Oliveira⁵, Ériklis Nogueira⁶, Guilherme de Paula Nogueira⁷, Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{1,3,8}

¹Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

²Veterinary Medicine, Biomedical Sciences Faculty of Cacoal, Cacoal, RO, Brazil.

³Laboratory of Animal Reproduction Biotechnologies, State University of Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brazil.

⁴State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

⁵Federal Institute of Education, Science and Technology of Amazonas, Tabatinga, AM, Brazil.

⁶Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brazil.

⁷State University of São Paulo, Araçatuba, SP, Brazil.

Abstract

Antral follicular population (AFP) and anti-Müllerian hormone (AMH) concentration are strongly associated. Thus, analyzing AMH concentration is a reliable method to predict animals with high AFP, an important feature to select donor cows for embryos and oocytes. However, not much is known about this parameter in heifers, particularly in crossbred animals. The aim of this study was to assess AFP in heifers and cows and its relation to serum AMH levels. *Bos taurus indicus* cows (36–60-months-old; n = 30) and heifers (12–14-months-old; n = 17) of the same breed were evaluated. A single procedure of follicular counting was performed by ultrasound for each animal. Random sampling was performed to analyze serum AMH concentration. Cows showed higher AFP than heifers; nonetheless, plasma AMH concentration did not differ between the categories. A high correlation of AFP with plasma AMH concentration was observed in Girolando heifers. Thus, it is suggested that AMH concentration could be a reliable and less invasive method for selecting heifers with high AFP.

Keywords: bovine, follicles, selection donors.

Introduction

Taking advantage of the rusticity of the Gir breed and the dairy productivity of the Holstein breed, Girolando cows are currently the main breed for milk production in Brazil, comprising around 80% of the dairy cattle in the country (Borges *et al.*, 2012). To improve dairy production, selection of females with high productivity, better reproductive efficiency, and/or better competence to respond to reproduction biotechnologies is essential.

The first calving age is approximately 35 months for ¾ Holstein × ¼ Gir cows, (Silva *et al.*, 2014), however a high variability among herds (lineages) has been observed. Taking that into account, strategies are needed to reduce the age for first calving and to select animals with higher genetic potential to attain the desired traits.

Phenotypic traits linked to infertility are associated with low ovarian antral follicle population

(AFP) in *B. taurus* (Ireland *et al.*, 2011). Nevertheless, the relationship between AFP and fertility has not been observed in *B. indicus* (Nellore) and crossbred beef cows (Baruselli *et al.*, 2015; Morotti *et al.*, 2015; Silva-Santos *et al.*, 2014a). The number of recruited follicles in each follicular wave is highly variable between individuals; however, a high level of individual repeatability is observed (Evans *et al.*, 2010; Oliveira Junior *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2014; Gobikrushanth *et al.*, 2017). High correlation of AFP with *in vivo* and *in vitro* embryo production may be used as an auxiliary tool to select donor cows for embryos and oocytes (Silva-Santos *et al.*, 2014a; Baruselli *et al.*, 2015; Ghanem *et al.*, 2016).

AFP is positively correlated with anti-Müllerian hormone (AMH) (Baldrighi *et al.*, 2014; Guerreiro *et al.*, 2014). The glycoprotein AMH, which belongs to the transforming growth factor (TGF)-β family, is only expressed in the gonads (Cate *et al.*, 1986) and is correlated to ovarian follicular development (Visser *et al.*, 2007). AMH expression is observed in granulosa cells of growing preantral and antral follicles (Rico *et al.*, 2011), and it is described as a premature modulator of follicular growth by controlling premature depletion of the follicular reserve in ovaries (Monniaux *et al.*, 2012; Durlinger *et al.*, 2002). Intrafollicular AMH expression increases until the size of the follicle is 5 mm in cows (Rico *et al.*, 2011) and 4 mm in humans (Weenen *et al.*, 2004) and then starts decreasing in larger antral follicles (Monniaux *et al.*, 2008).

Furthermore, the positive association between AMH and total number of follicles has been described in the ovaries of mice (Durlinger *et al.*, 2002), women (Fanchin *et al.*, 2003), and bovines (*B. taurus* and *B. indicus*) (Guerreiro *et al.*, 2014).

In cows, *B. indicus* is superior to *B. taurus* in terms of AFP and plasma AMH concentration (Batista *et al.*, 2014). Considering the strong association between AFP and plasma AMH concentration, analyzing AMH concentration is a reliable method to predict AFP (Ireland *et al.*, 2011; Rico *et al.*, 2011).

Plasma AMH concentration and ovarian follicular population in heifers has been studied in Nellore and Holstein pubertal heifers (Batista *et al.*, 2014), but not much is known about crossbred prepubertal dairy cattle. Understanding the correlation

⁸Corresponding author: fabiana.sterza@gmail.com

Received: August 1, 2016

Accepted: January 18, 2018

Performance and digestive characteristics in dairy cattle maintained under grazing regime and supplemented with linseed

Desempenho e características digestivas em bovinos leiteiros mantidos em regime de pastoreio suplementados com linhaça

Christopher Junior Tavares Cardoso^{1*}; Ana Caroline Bini de Lima¹; Érikliis Nogueira²; Marcus Vinicius Morais de Oliveira³; Fabiana de Andrade Melo-Sterza³

Abstract

Linseed is characterized by the rich unsaturated fatty acids and slow release of oil in the rumen. The objective of the present study was to evaluate the intake, rumen degradability, and digestibility of dairy cattle maintained under grazing regime and supplemented with linseed. Twelve Girolando ($\frac{3}{4}$ Holstein $\times$ $\frac{1}{4}$ Gir) cows with a mean age of 5.2 ± 1.9 years and body weight of 583.9 ± 67.6 kg were used. The cows were maintained in a rotational grazing system on the mombaça grass (*Panicum maximum*) and divided into 2 experimental groups. The CONTR (n = 6) group received only the base diet (pasture) and the LINS group (n = 6) received pasture plus linseed. Initially, a fifteen-day adaptation period was established to stabilize the desired consumption amount. After this period, the animals received 800 g of linseed for 126 d. The ruminal degradability was evaluated using 2 males with a cannula in the rumen, and they were provided the same experimental diet. The measured dry matter production of pasture did not show differences during the experimental period. The intake of crude protein and ethereal extract was higher, whereas neutral detergent fiber content was lower in the cows supplemented with linseed. However, this did not alter the weight gain and digestibility coefficients, except the digestibility coefficient of the ethereal extract. At the ruminal level, linseed showed low effective and potential degradability with negative effect on grass degradability.

Key words: Protected fat. Linolenic. *Linum usitatissimum*.

Resumo

A linhaça destaca-se pela composição de ácidos graxos ricos em ácidos insaturados e por apresentar lenta liberação do óleo no rúmen. O presente estudo teve como objetivo avaliar o consumo, a degradabilidade ruminal e a digestibilidade em bovinos leiteiros mantidos em regime de pastoreio e suplementados com linhaça em grão. Foram utilizadas 12 vacas da raça Girolando ($\frac{3}{4}$ Holandês $\times$ $\frac{1}{4}$ Gir) com idade média de $5,2 \pm 1,9$ anos com peso médio de $583,9 \pm 67,6$ kg, mantidas em sistema de pastoreio rotacionado de capim-mombaça (*Panicum maximum*) e divididas em 2 grupos experimentais. O grupo CONTR (n=6) recebeu apenas a dieta base (pastagem) e o grupo LINS (n=6) recebeu suplementação com 800 g/animal/dia de linhaça. Inicialmente foi realizado um período de adaptação de quinze dias para estabilização

¹ Discentes, Curso de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: christopher.zootecnista@gmail.com; carolinebini@hotmail.com

² Dr., Pesquisador A, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Pantanal, Corumbá, MS, Brasil. E-mail: eriklis.nogueira@embrapa.br

³ Profs., Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: marcusvmo@uems.br; fabiana.sterza@uems.br

* Author for correspondence

Received: Aug. 01, 2017 - Approved: Jan. 15, 2018

Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 39, n. 4, p. 1805-1818, jul./ago. 2018

1805

Efficiency of mating, artificial insemination or resynchronisation at different times after first timed artificial insemination in postpartum Nellore cows to produce crossbred calves

Walvonvitis Baes Rodrigues^A, Jean do Prado Jara^B, Juliana Correa Borges^A, Luiz Orcirio Fialho de Oliveira^A, Urbano Pinto Gomes de Abreu^A, Natalia Albanese Anache^C, Karine Casanova da Silva^C, Alexandre de Oliveira Bezerra^C, Christopher Junior Tavares Cardoso^C and Erikliis Nogueira^{A,C,D}

^AEmbrapa Pantanal, Rua 21 de Setembro, 1880, 79320-900, Corumbá – MS – Brazil.

^BUniderp Anhangüera, Rua Alexandre Herculano, 1400, 79035-470 Campo Grande – MS – Brazil.

^CPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Felinto Müller, 2443, 79070-900 Campo Grande – MS – Brazil.

^DCorresponding author. Email: eriklis.nogueira@embrapa.br

Abstract. The objective of this trial was to evaluate different post-timed artificial insemination (TAI) reproductive managements in postpartum beef cows to produce crossbred calves from artificial insemination (AI). Nellore cows ($n = 607$), with 45 days postpartum, were inseminated at a fixed time, using a protocol that included an intravaginal progesterone-releasing device along with oestradiol benzoate, prostaglandin, equine chorionic gonadotropin, and oestradiol cypionate, followed TAI 48 h post-device removal. Four post-TAI treatments were evaluated: in CONTROL (T1, $n = 161$), cows were exposed to Nellore clean-up bulls until the end of the breeding season (75 days). In OBSERVATION (T2, $n = 132$), heat detection was performed for 15–25 days post-TAI, followed by AI. In RESYNC22 (T3, $n = 157$) and RESYNC30 (T4, $n = 157$), resynchronisation started after 22 or 30 days, following second TAI at Day 32 or 40 days after first TAI. In T2, T3 and T4, after the second AI, cows were exposed to Nellore clean-up bulls until the end of the breeding season (75 days). The pregnancy rate (PR) for the first TAI did not differ (54.6%, 53.0%, 59.2%, and 51.6% for CONTROL, OBSERVATION, RESYNC 22, and RESYNC 30, respectively; $P = 0.66$), and no difference was observed for the second TAI (RESYNC 22 = 45.31% and RESYNC30 = 46.05%; $P = 0.137$), in the PR at the end of the breeding season (86.33%, 86.36%, 78.98%, and 81.52%, $P = 0.43$), or embryonic losses (4.54%, 2.85%, 6.45% and 7.40%, respectively; $P = 0.61$), but the percentage of crossbred pregnancy was higher in groups with resynchronisation (RESYNC22 and RESYNC30) than CONTROL and OBSERVATION (98.38%, 90.62%, 63.30%, 78.95%, $P < 0.001$). In conclusion, resynchronisation programs of 22 or 30 days are more efficient to produce AI products, and the final pregnancy rate is similar among the treatments, differing only in the amount of calves produced by AI.

Additional keywords: fertility, management, pregnancy.

Received 12 July 2017, accepted 13 November 2017, published online 17 January 2018

Introduction

In Brazil, the Nellore breed is the most commonly raised because it can easily adapt to the environment. However, several authors agree that the use of well-designed crossbreeding can improve the production rates of herds (Perotto *et al.* 2001; Rodrigues *et al.* 2015). In the past decade, crossbreeding of cattle has become an important tool used to increase meat production in various production systems in Brazil. The total production indexes could increase by up to 10–20% with the benefits of crossbreeding *Bos taurus taurus* breeds in favourable environments and up to 30–50% for crossbreeding *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* under unfavourable climate conditions (Teixeira *et al.* 2006). Several studies have shown

the superiority of products obtained by crossbreeding bulls of European breeds and Nellore cows kept on pasture in tropics (Restle *et al.* 2000; Cruz *et al.* 2009; Fialho *et al.* 2015). Based on this, artificial insemination (AI) is the primary tool used to increase production with the use of superior sires. However, this technique, although of great value to modern animal husbandry, became stagnant for various reasons, in particular the need for skilled labour and the difficulties in management and oestrus detection. According Baruselli *et al.* (2007), the average duration of oestrus behaviour in Zebu cattle (Nellore, 12.9 h) was similar to that of crossbred cows (Nellore $\times$ Angus, 12.4 h) and 3.4 h less than *B. taurus* cows (Angus, 16.3 h). In addition to have a shorter oestrus, most zebu females express oestrus



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Oocyte quality and heat shock proteins in oocytes from bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress

M.B. Souza-Cácares^a, A.L.L. Fialho^b, W.A.L. Silva^c, C.J.T. Cardoso^d, R. Pöhland^e,
M.I.M. Martins^a, F.A. Melo-Sterza^{b,d,*}

^a State University of Londrina, Animal Science, Londrina, Paraná, Brazil

^b State University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brazil

^c Federal University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^d Federal University of Mato Grosso do Sul, Veterinary Science, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

^e Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Reproductive Biology, Dummerstorf, Germany



ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2018

Received in revised form

29 January 2019

Accepted 28 February 2019

Available online 7 March 2019

Keywords:

Black globe humidity index

Heat shock protein

Oocyte quality

Respiratory frequency

Bovine

ABSTRACT

In order to evaluate the influence of thermal stress on physiological parameters, and the oocyte quality of Girolando ($n = 12$) and adapted Pantaneira ($n = 12$) cattle, twelve sessions of ultrasound guided follicular aspiration (OPU) were performed, between January and November 2014 (during dry (May–September) and rainy season (October–April) in Brazil). The recovered cumulus-oocyte complexes (COCs) were selected and classified, according to quality, immediately after OPU. The oocytes were then stored in 3% paraformaldehyd before conducting immunofluorescence analysis under confocal microscopy to identify HSP70 and 90 proteins. Before each OPU session, the rectal temperature (RT) and respiratory frequency (RF) of each animal were measured. The black globe humidity index (BGHI) was calculated on the day of the OPU and 90 days before each OPU session, and related to the thermal stress of the animals. The quality of oocytes from Girolando cattle, but not Pantaneira, showed a negative relationship with BGHI of 90 days before OPU. RT of both breeds did not exceed normal values for cattle below BGHI 95. BGHI variation on the day of OPU did not affect RF of the adapted Pantaneira breed ($p = 0.3221$). On the other hand, Girolando cattle showed a positive relationship between RF and BGHI ($p = 0.0103$). With increasing BGHI, the amount of HSP70 increased in Girolando oocytes, however, decreased in the Pantaneira breed. We have not observed a relationship between HSP 90 and BGHI, however Girolando cattle produced a greater amount of this protein in relation to the Pantaneira breed. In conclusion, higher BGHIs, 90 days before OPU session, negatively affect oocyte quality of Girolando cattle and positively affect oocyte quality of the Pantaneira breed. Higher BGHIs on the day of the OPU session negatively affected the respiratory frequency of the Girolando breed, and lead to a higher recruitment of HSP70 to protect oocyte maturation. The opposite pattern was observed for Pantaneira. In addition, Pantaneira cattle produced twice as much as HSP70 as Girolando cattle, suggesting that a natural higher production of this protein could be involved in the mechanisms of adaptation to heat conditions.

© 2019 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Cattle are homeothermic animals, maintaining a constant body temperature through heat flow, determined by processes that

depend on the temperature and humidity of the environment. When animals are in the thermoneutral zone (TZ), physiological imbalances are minimal, and productivity is increased. However, the understanding of the relationship between animals and their interactions with the environment becomes difficult to evaluate, due to the intrinsic characteristics of each animal, such as breed, age and sex [1].

One way to measure environmental parameters (i.e., temperature and humidity), is the black globe humidity index (BGHI). This

* Corresponding author. State University of Mato Grosso do Sul (UEMS), Animal Science, Aquidauana, Rodovia Aquidauana - UEMS, Km 12, Mato Grosso do Sul, Brazil.

E-mail address: fabiana.sterza@uems.br (F.A. Melo-Sterza).

Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone–estradiol-based protocols

E. Nogueira^{1,2†}, M. R. Silva³, J. C. B. Silva¹, U. P. G. Abreu¹, N. A. Anache², K. C. Silva², C. J. T. Cardoso², P. Sutovsky⁴ and W. B. Rodrigues³

¹Embrapa Pantanal, Rua 21 de Setembro 1880, Corumbá, MS 79320-900, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFMS – Av. Senador Filinto Müller, 2443, Campo Grande -MS, 79074-460, Brasil; ³Melhor Animal Consultoria LTDA, Rua Glycia Pedrosa Fenerich, 147 box 06, Jaboticabal- SP, 14871-835, Brasil; ⁴Department of Obstetrics, Gynecology & Women's Health, Division of Animal Sciences, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

(Received 18 April 2018; Accepted 12 February 2019)

Expression of estrus near timed artificial insemination (TAI) is associated with greater fertility, and estrus detection could improve TAI fertility or direct TAI management, although accurate estrus detection can be difficult and time-consuming using traditional methods. The aim of this study is to evaluate influence of estrus on pregnancy (artificial insemination pregnancy rates (P/AI)) and to validate an alternative method to classify estrus/heat expression using tail chalking (HEATSC) in postpartum *Bos indicus* cows subjected to TAI in progesterone–estrogen-based protocols. In experiment 1 (Exp. 1), cows (5491) were subjected to visual observation of estrus after progesterone device removal, before TAI, and P/AI was evaluated according to estrus and body condition score (BCS). Cows received a progesterone device and 2 mg estradiol benzoate (EB). After 8 days, the device was removed and 150 µg of o-cloprostenol and 300 IU equine chorionic gonadotrophin was given. Later, animals in Exp. 1 received 1 mg EB and TAI 44 to 48 h. In the Exp. 2 – 3830 cows using similar protocol, received different ovulation inducers: 1 mg EB (n = 1624) or 1 mg estradiol cypionate (EC; n = 2206) on day 8 (D8). Cows were then marked with chalk, and HEATSC evaluated at TAI on D10 (HEATSC1 – no chalk removal = no estrus expression; HEATSC2 – partial chalk removal = low estrus expression; HEATSC3 – near complete/complete chalk removal = high estrus expression). In Exp. 1, cows showing estrus presented greater P/AI (48.4% v. 40.2%, $P < 0.05$). In Exp. 2, P/AI (HEATSC1 – 40.0%; HEATSC2 – 49.7%; HEATSC3 – 60.9%; $P < 0.001$), and larger follicle timed artificial insemination (LFTAI) (< 0.001) varied according to HEATSC. There was no difference in P/AI ($P = 0.41$) or LFTAI ($P = 0.33$) according to ovulation inducer. Cows with greater BCS showed greater P/AI in both experiments ($P < 0.05$). Estrus presence and greater HEATSC improved P/AI, and EC v. EB used promoted differential estrus manifestation (cows showing HEATSC2 and HEATSC3: 79.5% with EB v. 69.98% with EC use, $P < 0.001$), however, with similar P/AI. The use of HEATSC in *B. indicus* cows subjected to TAI is useful to identify cows with greater estrus expression and consequently improved pregnancy rates in TAI, allowing the cows with low HEATSC to be targeted for additional treatments aimed at improving P/AI.

Keywords: *Bos indicus*, artificial insemination, follicle, reproduction, heat score

Implications

The use of timed artificial insemination (TAI) has been increasing in herds in order to produce higher-quality calves, and we are describing novel approaches to artificial insemination (AI) in cattle, optimized for TAI management in tropical regions. Estrus presence and greater estrus/heat expression scores (HEATSC) improved pregnancy in progesterone TAI-based protocols, so the use of HEATSC in *Bos indicus* cows subjected to TAI is useful to identify cows with

greater estrus expression and consequently improved pregnancy rates in TAI, allowing the cows with low HEATSC to be targeted for additional treatments aimed at improving artificial insemination pregnancy rates (P/AI).

Introduction

In tropical areas of the world, such as the Pantanal wetlands and Cerrado biomes of Brazil, beef production is based on Zebu cattle (*B. indicus*) due to their greater adaptation to the humid tropical climate and to grazing in extensive

[†] E-mail: eriklis.nogueira@embrapa.br

Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol

W. B. Rodrigues¹, A. S. Silva², J. C. B. Silva¹, N. A. Anache³, K. C. Silva³, C. J. T. Cardoso³, W. R. Garcia³, P. Sutovsky⁴ and E. Nogueira^{1,3†}

¹Embrapa Pantanal, Rua 21 de Setembro, 1880, Corumbá, MS 79320-900, Brasil; ²Genesis Tecnologia e Reprodução Animal, Rua Gonçalves Dias, 390, Campo Grande, MS, 79004-210, Brasil; ³Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFMS – Av. Senador Filinto Müller, 2443, Campo Grande -MS, 79074-460, Brasil; ⁴Department of Obstetrics, Gynecology & Women's Health, Division of Animal Sciences, University of Missouri, Columbia, MO 65211, USA

(Received 18 April 2018; Accepted 12 February 2019)

The use of tail chalk and estrus/heat expression scores (HEATSC) evaluation is instrumental in identifying cows with greater estrus expression and greater artificial insemination pregnancy rates (P/AI) in cows submitted to timed artificial insemination (TAI), and cows with low or no estrus expression present lower P/AI. It was intended in this study to improve the pregnancy rates in TAI for *Bos indicus* beef cows, and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) injection was hypothesized to increase pregnancy rates in a TAI program for cows submitted to progesterone–estradiol-based protocols with low or no estrus expression, evaluated by HEATSC. Cows ($n = 2284$) received a progesterone device and 2 mg estradiol benzoate, after 8 days the device was removed and 1 mg estradiol cypionate, 150 µg of o-cloprostenol and 300 IU equine chorionic gonadotropin was administered. All cows were marked with chalk and HEATSC evaluated (scales 1 to 3) at TAI performed on day 10. Animals with HEATSC1 and HEATSC2 ($n = 937$) received 100 µg de gonadorelin (GnRH group; $n = 470$), or 1 ml saline (Control group; $n = 467$), and cows with HEATSC3 (named HEAT group; $n = 1347$) received no additional treatment. The larger dominant follicle, evaluated on day 8 and at TAI (day 10), was greater in HEAT group ($P = 0.0145$ and $P < 0.001$, respectively). Corpus luteum (CL) area and progesterone concentration was evaluated on day 17, and CL area was larger in HEAT group, intermediary in Control and lower in GnRH group (Control = 2.68 cm^2 , GnRH = 2.37 cm^2 , HEAT group = 3.07 cm^2 , $P < 0.001$). Greater progesterone concentrations were found in HEAT group than in Control and GnRH groups (Control = 4.74 ng/ml , GnRH = 4.29 ng/ml , HEAT group = 6.08 ng/ml , $P < 0.001$). There was a difference in ovulation rate, greater in HEAT group than GnRH and Control groups (Control = 72.5% ; GnRH = 81.25% ; HEAT group = 90.71% ; $P = 0.0024$). Artificial insemination pregnancy rates was greater in HEAT group (57.09% ($769/1347$)) than in Control and GnRH groups, with positive effect of GnRH injection at the time of TAI in P/AI (Control = 36.18% ($169/467$), GnRH = 45.95% ($216/470$); $P < 0.0001$). In conclusion, GnRH application in cows with low HEATSC (1 and 2) is a simple strategy, requiring no changes in TAI management to increase pregnancy rates in postpartum beef cows submitted to progesterone–estradiol-based TAI protocols, without reaching, however, the pregnancy rates of cows that demonstrate high estrus expression at the TAI.

Keywords: artificial insemination, fertility, follicle, reproduction, management

Implications

Cows with low or no estrus expression present lower artificial insemination pregnancy rates (P/AI) in timed artificial insemination (TAI) protocols. It was intended in this study to improve the pregnancy rates for *Bos indicus* beef cows, without major managements modifications in TAI protocol. Animals with high estrus, evaluated with chalk aids had large dominant follicle, greater progesterone concentration and pregnancy rates, and the use of Gonadorelin

(gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)) improved pregnancy rates in cows with low or no estrus expression, thus, GnRH injection in cows with low estrus shows a simple strategy to increase pregnancy rates in postpartum beef cows submitted to progesterone–estradiol-based TAI protocols.

Introduction

The combination of progesterone and estradiol (E2) is one of the most common TAI protocols used in Brazil. Its purpose is to promote follicle atresia and consequently induce

[†] E-mail: erikis.nogueira@embrapa.br

Supplementation of cows with linseed: effects on antral follicle count, oocyte quality, and nutritional and plasma metabolite parameters

Suplementação de fêmeas girolando com linhaça: efeitos sobre contagem de folículos antrais, qualidade oocitária, parâmetros nutricionais e metabólitos plasmáticos

Christopher Junior Tavares Cardoso^{1*}; Ana Caroline Bini de Lima¹; Wilian Aparecido Leite da Silva²; Mirela Brochado Souza-Cáceres³; Daniela Moraes Pereira¹; Marcus Vinicius Moraes de Oliveira⁴; Érikis Nogueira⁵; Fabiana de Andrade Melo-Sterza⁴

Abstract

Linseed is distinguished by its composition of fatty acids, which are rich in unsaturated acids, and by the slow release of oil in the rumen, consequently providing a greater amount of lipids of interest for intestinal absorption. The aim of this study was to evaluate the effect of linseed supplementation on the antral follicle count (AFC) and oocyte quality of Girolando cows, as well as their digestive parameters and plasma metabolite. Twelve Girolando cows were used in the study and were randomly distributed in two experimental groups: control (CTL, n = 6) and linseed (LINS, n = 6). During the 126 days of supplementation, seven transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) sessions were performed at intervals of 21 days. AFC was performed in each OPU session. The cows fed with linseed showed no significant difference in the dry matter coefficient of digestibility (63.11 and 62.88), crude protein (62.7 and 55.26), neutral detergent fiber (NDF; 75.36 and 77.15), or acid detergent fiber (ADF; 72.45 and 74.77) for LINS and CTL, respectively. On the contrary, a higher level of ethereal extract was observed for LINS (69.31 vs. 40.7). There was no effect ($p > 0.05$) of lipid supplementation on plasma metabolite between groups and OPU sessions. There was no difference ($p > 0.05$) in the mean number of antral follicles (CTL: 31.14 ± 1.97 ; LINS: 25.52 ± 2.68), cumulus oocyte complexes recovered (CTL: 6.45 ± 1.66 ; LINS: 5.28 ± 1.18), or oocyte quality (CTL: $60.48\% \pm 8.46$; LINS: $64.54\% \pm 7.77$). The supplementation of 800g of linseed in the diet of Girolando cows did not alter the apparent digestibility of nutrients, AFC, or quality of oocytes obtained by OPU.

Key words: Polyunsaturated fatty acid. Reproduction. Digestibility.

¹ Discentes do Curso de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: christopher.zootecnista@gmail.com; carolinebini@hotmail.com; daniela.mrs@hotmail.com

² Discente, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: wilian.leite@live.com

³ Discente, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil. E-mail: mirela.mbs@gmail.com

⁴ Profs., Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: marcusvmo@uems.br; fabiana.sterza@uems.br

⁵ Pesquisador A, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Pantanal, Corumbá, MS, Brasil. E-mail: erikis.nogueira@embrapa.br

* Author for correspondence

Research Article

Cite this article: Pereira DM *et al.* (2020) Production of *in vitro* bovine embryos supplemented with L-carnitine in different oxygen tensions and the relation to nitric oxide. *Zygote*, page 1 of 6. doi: 10.1017/S0967199420000258

Received: 26 November 2019

Revised: 13 February 2020

Accepted: 17 April 2020

Keywords:

Bovine; Embryo development; Nitric Oxide; Reactive nitrogen species

Author for correspondence:

Fabiana de Andrade Melo Sterza. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Aquidauana/MS. 25 Rodovia Graziela Maciel Barrozo, Km 12 Zona Rural, Aquidauana – MS, CEP: 79200-000, Brazil. Tel: +55 67 39042242. E-mail: fabiana.sterza@uemms.br

© The Author(s), 2020. Published by Cambridge University Press.

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

Production of *in vitro* bovine embryos supplemented with L-carnitine in different oxygen tensions and the relation to nitric oxide

Daniela Moraes Pereira¹, Christopher Junior Tavares Cardoso², Wilian Aparecido Leite da Silva³, Mirela Brochado Souza-Cáceres⁴, Mariana Santos¹, Ralf Pöhlend⁴, Allan Motta Couto¹, Iluska Senna Bonfá Moslavess⁶, Mônica Cristina Toffoli Kadri⁶ and Fabiana de Andrade Melo Sterza^{1,2,5}

¹State University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brazil; ²Federal University of Mato Grosso do Sul, Veterinary Science, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil; ³Federal University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil; ⁴State University of Londrina, Animal Science, Londrina, Paraná, Brazil; ⁵Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Reproductive Biology, Dummerstorf, Germany and ⁶Federal University of Mato Grosso do Sul, Pharmacology and Inflammation Laboratory, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Summary

The aim of this study was to evaluate the production of bovine embryos *in vitro* when supplemented with L-carnitine for 24 h beginning on day 5 (d 5) under two different oxygen tensions (20% or 5%) and the relationship of nitric oxide (NO) in *in vitro* culture (IVC) medium to embryo development. Cumulus-oocyte complexes (COC; $n = 837$) were matured *in vitro* for 24 h and fertilization was performed for 18 h. Zygotes were cultured *in vitro* for 9 days after *in vitro* fertilization in synthetic oviductal fluid (SOF) medium with 5% fetal calf serum. At d 5 the plates were assigned to one of four treatment groups: high (20%) or low (5%) O₂ tension either with or without the addition of 3.03 mM L-carnitine (High-Cont, High-Lcar, Low-Cont, Low-Lcar). The concentration of NO in the culture medium was evaluated on d 5, d 6 and d 9. On d 7, parts of the embryos were submitted for evaluation of intracellular lipid droplets. The cleavage rate was similar ($P > 0.05$) between high and low O₂ tension and the blastocyst rate was similar in all conditions evaluated. The hatching rate was higher ($P < 0.05$) for Low-Cont. The NO concentration was higher at d 9 under low O₂ tension ($P < 0.1$). The addition of 3.03 mM L-carnitine between d 5 and d 6 of IVC was not efficient in reducing cytoplasmic lipid content of bovine embryos. Additionally, IVC at a low oxygen tension without L-carnitine promoted better conditions for embryo development. A higher concentration of NO in medium was observed under low O₂ tension.

Introduction

In 2017, about one million (992,289) embryos globally were produced *in vitro*, this is a 48.9% increase compared with 2016 (Viana, 2018). However, embryos produced *in vitro* were more likely to be transferred fresh (66.1%) than those embryos produced *in vivo* (39.9%; Viana, 2018), and likely to result from the lower cryotolerance of *in vitro* produced embryos (IVEP). To improve commercial success, understanding the basic processes of embryo development is essential. Hence, many studies have examined some of these basic processes such as researching embryo metabolism and development under different conditions (Tesfaye *et al.*, 2006; Rocha-Frigoni *et al.*, 2013; Zolini *et al.*, 2019).

Intracellular lipid accumulation has been postulated to be an important factor influencing IVEP cryotolerance. L-Carnitine, a small water-soluble molecule and cofactor of β -oxidation, is crucial for the translocation of fatty acids into the mitochondria, which are subsequently metabolized to acetyl-CoA through β -oxidation and potentially produce ATP through oxidative phosphorylation (Sutton-McDowall *et al.*, 2012). L-Carnitine also has an antioxidant activity that protects cells from DNA damage (Abdelrazik *et al.*, 2009). Several beneficial effects of L-carnitine supplementation to culture medium have been reported previously such as improved embryo development (Sutton-McDowall *et al.*, 2012), lipid metabolism and cryotolerance of bovine embryos (Takahashi *et al.*, 2013).

In vitro conditions cannot mimic *in vivo* conditions, and this can lead to increased levels of reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS; Agarwal *et al.*, 2006), particularly when the culture is conducted under high atmospheric oxygen tension (20%), which is higher than an *in vivo* environment (5–7%). ROS and RNS are free radicals generated as sub-products of oxygen consumption by the electron transport chain during cellular respiration

ORIGINAL ARTICLE

Influence of long-term thermal stress on the *in vitro* maturation on embryo development and Heat Shock Protein abundance in zebu cattle

Ralf Pöhlend^{1*}, Mirela Brochado Souza-Cácares^{2*}, Tirtha Kumar Datta³, Jens Vanselow¹, Maria Isabel Mello Martins², Wilian Aparecido Leite da Silva⁴, Christopher Junior Tavares Cardoso⁵, Fabiana de Andrade Melo-Sterza^{1,5,6**}

¹Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Dummerstorf, Germany

²Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

³National Dairy Research Institute, Animal Biotechnology Centre, Karnal, Haryana, India

⁴Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

⁵Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

⁶Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil

*These authors contributed equally to this work

How to cite: Pöhlend R, Souza-Cácares MB, Datta TK, Vanselow J, Martins MIM, Silva WAL, Cardoso CJT, Melo-Sterza FA. Influence of long-term thermal stress on the *in vitro* maturation on embryo development and Heat Shock Protein abundance in zebu cattle. Anim Reprod. 2020;17(3):e20190085. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2019-0085>

Abstract

The objective of this study was to investigate the influence of long-term temperature stress during the *in vitro* maturation (IVM) of oocytes on the *in vitro* embryo production (IVP) and the abundance of HSP70 and HSP90 in zebu cattle. Viable cumulus-oocyte complexes (COCs) were incubated for 24 h at 37 °C, 38.5 °C, or 40 °C for the low-, physiological, and high-temperature stress treatments, respectively. Thereafter, they were subjected to *in vitro* fertilization and culture. Temperature did not affect the polar body extrusion. However, IVP was adversely affected when IVM took place at 37 °C and 40 °C. The highest abundance of HSP70 was observed in cumulus cells after maturation of COCs at 40 °C. In contrast, HSP70 was more abundant in oocytes at both 37 °C and 40 °C; however, at 40 °C, the difference to the control group (38.5 °C) was not significant. In contrast, the highest abundance of HSP90 was observed in oocytes and cumulus cells at 37 °C. It appears that HSP70 and HSP90 respond to cold and heat stress in different ways. In conclusion, moderately high (40 °C) and low (37 °C) thermal stress for 24 h during IVM is detrimental to the developmental competence of oocyte and is accompanied by changes in the abundances of HSP70 and HSP90, especially in cumulus cells.

Keywords: oocytes, HSP70, HSP90, bovine.

Introduction

The reduced performance of cows subjected to high temperatures is well known. Heat stress (HS) is associated with early embryonic mortality (Edwards et al., 2005), decreased the conception rate (García-Ispuerto et al., 2007), changes in steroid hormone levels (Wolfenson et al., 2000; Jasnic et al., 2010) and follicular wave patterns, and physiological and molecular alterations in oocytes (Zeron et al., 2001; Torres-Junior et al., 2008; Ferreira et al., 2011). Nevertheless, zebu breeds are better able to regulate body temperature and experience less severe impairment of productive and reproductive functions in response to

*Corresponding author: fabiana.sterza@uem.br

Received: June 22, 2019. Accepted: August 7, 2020.

Financial support: This study was funded by the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES - 88881.068117/2014-01) and the Foundation for the Development of Teaching, Science, and Technology in Mato Grosso do Sul (FUNDECT). Ph.D. students received a grant from CAPES (001).

Conflicts of interest: The authors have no conflict of interest to declare.



Copyright © The Author(s). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Anim Reprod. 2020;17(3):e20190085 | <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2019-0085>

1/10