



**JESÚS ALFONSO SÁNCHEZ VIAFARA**

**MELHORIA DO DESENVOLVIMENTO E  
CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS  
PRODUZIDOS *in vitro* COM ADIÇÃO DE MODULADORES  
DA APOPTOSE CELULAR E DA SÍNTESE LIPÍDICA**

**LAVRAS-MG  
2019**

**JESÚS ALFONSO SÁNCHEZ VIAFARA**

**MELHORIA DO DESENVOLVIMENTO E CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES  
BOVINOS PRODUZIDOS *in vitro* COM ADIÇÃO DE MODULADORES DA  
APOPTOSE CELULAR E DA SÍNTESE LIPÍDICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do Título de Doutor.

Prof. PhD José Camisão de Souza  
Orientador

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves  
Prof. Dr. Jose Nelio de Sousa Sales  
Coorientadores

**LAVRAS-MG  
2019**

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

Viafara, Jesús Alfonso Sánchez.

Melhoria do desenvolvimento e da crioresistência de embriões bovinos produzidos *in vitro* com adição de moduladores da apoptose celular e da síntese lipídica / Jesús Alfonso Sánchez Viafara. – 2019. 117 p. : il.

Orientador: José Camisão de Souza.

Coorientadores: Nadja Gomes Alves; Jose Nelio de Sousa Sales.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. PPARD. 2. Embrião. 3. Bovinos. I. Souza, José Camisão de. II. Alves, Nadja Gomes. III. Sales, Jose Nelio de Sousa. IV. Título.

**JESÚS ALFONSO SÁNCHEZ VIAFARA**

**MELHORIA DO DESENVOLVIMENTO E CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *in vitro* COM ADIÇÃO DE MODULADORES DA APOPTOSE CELULAR E DA SÍNTESE LIPÍDICA**

**IMPROVEMENT IN DEVELOPMENT AND CRYORESISTANCE OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED *in vitro* WITH ADDITION OF CELL APOPTOSIS AND LIPID SYNTHESIS MODULATORS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do Título de Doutor.

APROVADA em 14 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA
Prof. Dr. Mateus Jose Sudano	Universidade Federal do ABC - UFABC
Profa. Dra. Marcella Pecora Milazzotto	Universidade Federal do ABC - UFABC
Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira	EPAMIG

Prof. PhD. José Camisão de Souza  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2019**

*Ao Deus da vida, por me dar as forças necessárias cada dia para correr atrás de meus propósitos e por ser o amigo fiel que nunca falha, a minha família, por ser o motor que me movimenta a não desistir por mais fortes que sejam os ventos.*

***DEDICO.***

## AGRADECIMENTOS

Ao Cristo Salvador que guia meus passos e me carrega nos momentos mais difíceis sem me deixar desistir.

Ao grandioso Brasil que me acolheu quando eu mais dele necessitava, me dando a oportunidade de crescer academicamente.

Ao programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de vida que me deu, em especial, ao professor Marcio Gilberto Zangeronimo, pelo primeiro voto de confiança.

Ao meu orientador, o professor Jose Camisão de Souza, pela paciência, por seus conselhos e por acreditar no meu potencial e me permitir criar a proposta de pesquisa, dando o apoio em todo o necessário.

A minha coorientadora a professora Nadja, pela paciência e orientações oportunas. Por segurar a barra e me dar todo o seu apoio. Gratidão eterna.

Ao meu caro amigo, o Dr. Marcos Brandao, por me acompanhar e apoiar nos momentos justos da minha pesquisa.

À empresa Cenatte Embriões, pelo patrocínio na produção dos embriões no seu laboratório de pesquisa, em especial ao biólogo Roberti Drumons, por abrir as portas da empresa para mim.

Ao caro professor e amigo Mateus Sudano, pela atenção que me ofereceu quando tinha dúvidas sob como conduzir minha pesquisa. Por todo seu respaldo para poder realizar a técnica de MALDI-MS na UNICAMP.

À Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, em nome do professor Alan, pela colaboração no fornecimento dos meios de produção de embriões *in vitro* do experimento.

À Universidade Federal de Rio de Janeiro – UFRJ, em nome da professora Jasmin, pela colaboração na realização da técnica TUNEL.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, em nome do professor Marcos Nogueira Eberlin e a sua orientada Fernanda Negrão, pela colaboração na realização da técnica MALDI-MS no seu Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas.

À Universidade Estadual Paulista –UNESP, em nome da professora Gisele Zoccal Mingoti e a sua orientada Giovana Barros Nunes, pela colaboração na realização da técnica Sudan Black.

Ao Laboratório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz/Pernambuco, em nome da Dra. Mary Donato, pela colaboração na realização da técnica de Microscopia eletrônica de transmissão.

Aos membros da banca de doutorado, por aceitarem contribuir no aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos meus caros pais, Alfonso Sánchez e Luz Daris Viafara pelo apoio infinito. Por estarem sempre dispostos a escutar meus problemas e me dar forças dia a dia.

Às minhas queridas irmãs: Yajahira e Mileydi Sanchez Viafara, pelos conselhos, por alegrarem os meus dias com suas conversas e por esses lindos sobrinhos Valentina, Alejandro, Sebastian, Dana e Juan Jose.

As minhas caras colegas Gisvani Lopez de Vasconcelos e Renata Maculan, por haver me recebido no primeiro dia, na sala de meu orientador, com um sorriso e uma disposição de trabalho enorme.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**MUITO OBRIGADO!**

*“Por isso não tema, pois estou com você;  
não tenha medo, pois sou o seu Deus.  
Eu o fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei  
com a minha mão direita vitoriosa.”  
(Isaías 41:10)*

## RESUMO GERAL

A produção de embriões bovinos *in vitro* é deficiente devido a aspectos tais como as condições subótimas onde se desenvolvem, as quais induzem a apoptose conduzindo a uma baixa criotolerância. Objetivou-se modular a ativação da apoptose e a síntese lipídica via ativação dos receptores proliferadores para diminuir a apoptose celular e aumentar a criotolerância. No experimento 1 foram colocados aleatoriamente para cultivo embrionário (dia 1) presumíveis zigotos (grupo controle n=609; grupo DHA n=611; e grupo L-165041 n=608). A taxa de clivagem foi avaliada no dia 2 (D2) e a produção de blastocistos no dia 7 (D7). Para avaliar a taxa de apoptose pré vitrificação foram fixados embriões no D7 para o ensaio de TUNEL. O acúmulo lipídico foi analisado pela técnica de Sudan Black em embriões fixados no D7. No experimento 2 foram vitrificados e desvitrificados (grupo controle n=98; grupo DHA= 76; L- 165041= 111) para avaliar a taxa de eclosão. Aqueles embriões que eclodiram foram congelados para analisar o perfil lipídico pela técnica de espectrometria de massa (MALDI- MS). A taxa de apoptose pós vitrificação foi analisada pelo ensaio de TUNEL. No experimento 1 a produção de blastocistos em D7 foi menor no grupo DHA quando comparada com a produção dos grupos controle e L-165041 ( $P < 0.05$ ). Por outro lado, a proporção de células da MCI foi maior, e as taxas de apoptose total e da MCI foram menores no grupo L- 165041 quando comparadas às dos grupos controle e DHA ( $P < 0,05$ ). Por sua vez, o grupo DHA teve a menor proporção de MCI e as maiores taxas de apoptose total e da MCI quando comparado com os grupos controle e L-165041 ( $P < 0,05$ ). No grupo DHA, as mitocôndrias exibiam sinais de estresse celular, assim como várias células apresentaram vacuolização intensa. A taxa de apoptose total e da massa celular interna foi reduzida ( $P < 0,05$ ) no grupo L- 165041, quando comparada às dos grupos DHA e controle. No experimento 2 as taxas de eclosão das 36h às 72h após desvitrificação foram maiores ( $P < 0.05$ ) no grupo L-165041 comparadas às do grupo controle, e a partir das 48h com o grupo DHA. Foi encontrada uma abundância relativa das fosfatidilcolina (PC) protonada (34:2) + H<sup>+</sup> e PC oxidado [PC (36:1) + H]<sup>+</sup> no grupo L-165041 comparado com o grupo controle. O grupo DHA teve uma maior abundância relativa ( $P < 0.05$ ) da PC protonada (32:0) comparado com o grupo controle. Em conclusão, a adição de L-165041 no cultivo embrionário diminui a apoptose pré e pós vitrificação. O estudo indica que a adição de 1 $\mu$ M de L-165041 no meio de cultivo aumenta a proliferação celular pré vitrificação e diminui a apoptose pré e pós vitrificação, além de aumentar a criotolerância. Por outro lado, a adição de DHA diminui o desenvolvimento embrionário não sendo aconselhável seu uso na PIVE nas condições deste estudo.

**Palavras-chave:** PPARD. Embrião. Bovinos. L-165041. DHA.

## GENERAL ABSTRACT

The production of bovine embryos *in vitro* is deficient, due to aspects such as suboptimal conditions where they develop, which induces apoptosis, leading to low cryotolerance. The aim of this study was to modulate the activation of apoptosis and lipid synthesis through activation of proliferation receptors (*PPARs*) to diminish cell apoptosis and increase cryotolerance. In experiment 1, day 1 presumptive zygotes were allocated at random for embryo culture (control group n = 609, DHA group n = 611, and L-165041 (selective agonist of *PPARD*) group n = 608). The cleavage rate was evaluated on day 2 (D2) and blastocyst production on day 7 (D7). To evaluate the pre-vitrification apoptosis rate, embryos were fixed in D7 for TUNEL assay. Lipid accumulation was analyzed by the Sudan Black technique in embryos fixed in D7. In experiment 2, blastocysts were vitrified and devitrified (control group n = 98, DHA group = 76, L-165041 group = 111) to evaluate the eclosion rate. The embryos that eclosed were frozen to analyze the lipid profile by the mass spectrometry technique (MALDI-MS). The post-vitrification apoptosis rate was analyzed by TUNEL assay. In experiment 1, blastocyst production in D7 was less in the DHA group than production in the control and L-165041 groups ( $P < 0.05$ ). However, the proportion of MCI cells was greater, and the total apoptosis and MCI rates were lower in the L-165041 group compared to the control and DHA groups ( $P < 0.05$ ). The DHA group had a lower proportion of MCI and higher total apoptosis and MCI rates compared to the control and L-165041 groups ( $P < 0.05$ ). In the DHA group, the mitochondria exhibited signs of cell stress, just as various cells exhibited intense vacuolization. The total apoptosis rate and inner cell mass was reduced ( $P < 0.05$ ) in the L-165041 group compared to the DHA and control group. In experiment 2, the eclosion rates from 36 h to 72 h after devitrification were greater ( $P < 0.05$ ) in the L-165041 group compared to the control group, and from 48 h on compared to the DHA group. A relative abundance of protonated phosphatidylcholine [PC (34:2) + H]<sup>+</sup> and oxidized PC [PC (36:1) + H]<sup>+</sup> in the L-165041 group was found compared to the control group. The DHA group had relative abundance ( $P < 0.05$ ) of protonated PC (32:0) compared to the control group. In conclusion, the addition of L-165041 in the embryonic culture decreases pre- and post-vitrification apoptosis. Our study indicates that the addition of 1  $\mu$ M of L-165041 in the culture medium increases pre-vitrification cell proliferation and decreases pre- and post-vitrification apoptosis, and also increases cryotolerance. In contrast, addition of DHA decreases embryonic development, and its use in *in vitro* production of bovine embryos under the conditions of this study is not recommended.

**Keywords:** PPARD. Embryo. Bovines. L-165041. DHA.

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1

- Fig. 1. Representative embryos of each group in which the number of TUNEL-positive cells was determined. Green nuclei fluorescence (TUNEL) was considered with fragmented DNA. DAPI stained all healthy and apoptotic cells with the blue nuclei fluorescence. SOX-2 stained of red the cell of the internal cell mass. The green and red was used for determined the apoptotic cells of the internal cell mass. At 200X magnification. Observations: control, DHA and L-165041group..... 81
- Fig. 2. Light micrographs of control, DHA and L-165041 embryos stained with Sudan black B. Black areas indicate sudanophilic cytoplasmic lipid droplets. 40 x magnification. Images converted to gray scale. Original magnification 3600; bar =50  $\mu\text{m}$ . ..... 83

#### ARTIGO 2

- Fig. 1. Effects of DHA and L-165041 on blastocyst survival following vitrification and thawing. Hatched blastocyst rate at different times after thawing. Different superscripts indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments at a given time point..... 110
- Fig. 2. Representative embryos of vitrified bovine blastocysts submitted to the TUNEL reaction. Green nuclei fluorescence (TUNEL) was considered with fragmented DNA. DAPI stained all healthy and apoptotic cells with the blue nuclei fluorescence. SOX-2 stained of red the cell of the internal cell mass. The green and red was used for determined the apoptotic cells of the internal cell mass. At 200X magnification. Observations: Control, DHA and L-165041group..... 113
- Fig. 3. Two-dimensional PCA plots for MALDI-MS data of treatments Control (n = 6), DHA (n = 5) and L-165041 (n = 9)..... 114
- Fig. 4. Three-dimensional principal-component analysis (PCA) plot of treatments Control (n = 6), DHA (n = 5) and L-165041 (n = 9)..... 115
- Fig. 5. Bar chart, where the intensity of DHA group ions compared to the control group and L-165041 compared to the control group..... 116

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

#### ARTIGO 1

- Table 1. Effect of 1  $\mu\text{M}$  of L-165041 and 1  $\mu\text{M}$  of DHA supplementation during *in vitro* culture on embryo development..... 79
- Table 2. Effect of 1  $\mu\text{M}$  L-165041 and 1  $\mu\text{M}$  of DHA supplementation during *in vitro* culture on embryo development on d 7, total number of cells, percentage of apoptotic cells and percentage of inner cell mass (ICM) in bovine blastocysts..... 79
- Table 3. Effect of 1  $\mu\text{M}$  L-165041 and 1  $\mu\text{M}$  of DHA supplementation during *in vitro* culture on cytoplasmic lipid content expressed by gray intensity, gray intensity per area (gray intensity  $\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$ ), and gray intensity per area divided by the mean of the calibrator group (relative lipid content)..... 82

#### ARTIGO 2

- Table 1. Effect of 1  $\mu\text{M}$  DHA and 1  $\mu\text{M}$  L-165041 supplementation during *in vitro* embryo development on d 7 embryo yield and on *in vitro* embryo on total number of cells and the percentage of apoptotic cells and percentage of inner cell mass (ICM) in vitrified bovine blastocysts..... 118
- Table 2. Significant PC indicated in PCA via MALDI-MS of individual Controle and L-165041. Overview of MALDI-base selection of prospective lipid markers for cryopreservation survival based in the treatment Control and L-165041..... 124
- Table 3. Significant PC indicated in PCA via MALDI-MS of individual Controle and DHA. Overview of MALDI-base selection of prospective lipid markers for cryopreservation survival based in the treatment Control and DHA. .... 117

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

-/-	deletado
[PC (34:2) + H] <sup>+</sup>	fosfatidilcolina 34:2 protonada
[PC (36:1) + H] <sup>+</sup>	fosfatidilcolina 36:1 oxidado
[PC (32:0) + H] <sup>+</sup>	fosfatidilcolina 32:0 protonada
+/+	preservado
μM	Micromolar
AA	ácido araquidônico
AKT	Protein kinase B
ALA	ácido alpha linolenico
APAF1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
ATP	Adenosin trifosfato
BCL-2	B cell Lymphoma
BSA	albumina sérica bovina
C18:2, C18:3	ácido linoleico, ácido linolênico
CIV	cultivo <i>in vitro</i>
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
COCs	complexos cumulus-oócitos
CRE-LOXP	Sistema de recombinação Cre-loxP
Cx43	Connexina 43
DAPI	4'-6-diaminidino-2- phenylindole
DHA	docosahexaenóico
DHB	ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DMRs	regiões diferencialmente metiladas
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNP	2,4-dinitrophenol
DV1	solução de desvitrificação 1
DV2	solução de desvitrificação 2
EPA	eicosapentaenoico
EREs	espécies reativas de enxofre
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROS	espécies reativas de oxigênio

FADS1	Fatty acid desaturase 1
FAS	ácido graxo sintase
FERT-TALP	Tyrode's albumin lactate pyruvate
FFAR1	receptor de ácidos graxos livres 1
FFAR4	receptor de ácidos graxos livres 4
FIA	fator de indução da apoptose
FIV	Fertilização In Vitro
FSH	hormônio folículo estimulante
GC	grânulos corticais
GENE BAX	BCL2 Associated X Protein
GLMM	modelo misto linear generalizado
HPM199	meio de cultivo de embrionario
IP	receptores de prostaciclina
ISP1 e ISP2	serinas proteases
Kb	kilobase
L-165041	agonista seletivo do Receptor Ativado por PPAR $\delta$
LA	linoleico
LH	hormônio luteinizante
<i>m/z</i>	massa/carga
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MALDI TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass. Spectrometry
MALDI-MS/MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization in tandem Mass Spectrometry
MCI	massa celular interna
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MIV	maturação in vitro
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
NF $\kappa$ B	fator nuclear kappa B
nm	nanometro
NO	óxido nítrico
O <sub>2</sub>	gás oxigênio

PBS-PVA	Tampão fosfato salino com polivinil álcool
PC	fosfatidilcolina
PCA	Análise de componentes principais
PDK-1	Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PES	etosulfato de fenazina
PGI <sub>2</sub>	prostaciclina
PIVE	produção <i>in vitro</i> de embriões
PLS-DA	análise parcial discriminante de mínimos quadrados
pmol	picomol
PPARs	Receptores Proliferadores de Peroxissomas
PPARA (PPAR $\alpha$ )	Receptores Proliferadores de Peroxissomas alfa
PPAR $\alpha$ -null	Receptores Proliferadores de Peroxissomas alfa deletado
PPAR $\beta$	Receptores Proliferadores de Peroxissomas beta
PPAR $\gamma$	Receptores Proliferadores de Peroxissomas gama
PPARD (PPAR $\delta$ )	Receptores Proliferadores de Peroxissomas delta
PPRE	elemento responsivo de PPAR
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados ômega 3
PUFAs	ácidos graxos poliinsaturados
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	rotações por minuto
RXR	Retinoide X receptor
RXR $\alpha$	Retinoide X receptor alfa
RXR $\beta$	Retinoide X receptor beta
RXR $\gamma$	Retinoide X receptor gamma
S14	Proteína ribossomal
SCD1	gene estearoil coa desaturase
SER	receptor de esteroides
SFB	soro fetal bovino
SM	esfingomiéline
SMR <sup>Te</sup> NCoR	receptor nuclear
SNAP	Procedimento de anotação numérica sofisticada
SOD1	gene superóxido dismutase
SOFaa	Meio de Fluido Ovidutal Sintético
SOX-2	fator de transcrição SOX-2

SREBP	gene da proteína de ligação ao elemento regulador de esteroides
SREBP1	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1
SREs	elementos de reguladores de esteróis
TALP	<i>Tyrode's-albumina-lactato-piruvato</i>
TCM-199	meio de maturação oocitario
TUNEL	Marcação nick-end com dUTP mediada pela desoxinucleotidil transferase terminal
v/v	volume/volume
ZP	Zona pelucida
µg	micrograma
µm	micrometro

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	17
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1 Impactos da produção <i>in vitro</i> convencional sobre o metabolismo e o potencial de desenvolvimento de embriões bovinos</b> .....	20
<b>2.2 Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR) e sua influência na reprodução</b> .....	28
<b>2.3 Efeito do L-165041 agonista seletivo do Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Delta (PPAR<math>\delta</math>) nos embriões</b> .....	29
<b>2.4 Efeito do ácido docosaheptaenóico (DHA) nos embriões</b> .....	30
<b>2.5 Técnicas para avaliação do desenvolvimento e qualidade embrionária</b> .....	32
<b>2.6 TUNEL, Marcação nick-end com dUTP mediada pela desoxinucleotidil transferase</b> .....	33
<b>2.7 Contagem do número total de células</b> .....	34
<b>2.8 Espectrometria de massa lipídica MALDI-MS</b> .....	34
<b>2.9 Alcances da técnica de semi-quantificação de lipídeos com uso da técnica de Sudan Black B em estudos em embriões bovinos</b> .....	36
<b>2.10 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	42
<b>ARTIGO 1 - DOES THE ACTIVATION OF PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS IMPROVE THE DEVELOPMENT OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED <i>In vitro</i>?</b> .....	55
<b>ARTIGO 2 - A ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA MELHORA A CRIOTOLERANCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>In vitro</i>?</b> .....	85

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia da produção *in vitro* de embriões bovinos tem baixa eficiência em comparação aos embriões produzidos *in vivo*, pois ocasiona danos aos embriões durante seu desenvolvimento (OHLWEILER et al., 2013; SIQUEIRA; VIANA, 2012). Fatores de estresse que não são encontrados no trato reprodutivo da vaca influenciam aos embriões produzidos *in vitro*, mesmo que a produção *in vitro* de embriões (PIVE) simule as condições *in vivo* (KHURANA; NIEMANN, 2000a). A produção de energia para suportar o desenvolvimento embrionário é um fator intrínseco que, igual ao que o estresse ambiental induzido pelos sistemas de cultivo subótimos, pode afetar, negativamente, o metabolismo e desenvolvimento dos embriões (CAGNONE et al., 2012; GARDNER; LANE; LANE, 2000).

A membrana celular embrionária, é composta por lipídios, entre eles os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), os quais fornecem fluidez a ela. Essa fluidez das membranas celulares é crucial ao momento da criopreservação, em decorrência de que a redução rápida da temperatura faz com que aconteça uma transição da fase lipídica, na qual passam de uma fase líquida a uma fase de gel. Em caso de a membrana ser pouco fluida, esta pode vir a ser prejudicada, ativando-se a cascata da apoptose (HORVATH; SEIDEL, 2006).

As células submetidas à criopreservação sofrem danos celulares, produtos das modificações de sua composição lipídica (AL DARWICH et al., 2010). A porção lipídica da membrana celular é a mais afetada pelo estresse osmótico, produto das rápidas modificações de volume, nos seus compartimentos celulares, em razão do fluxo de água e crioprotetores intracelulares. Conseqüentemente, membranas plasmáticas mais permeáveis e flexíveis serão menos danificadas, impactando positivamente o metabolismo celular (JUCHEM et al., 2010; SEIDEL, 2006).

Entre os danos que a criopreservação ocasiona nas células embrionárias, encontram-se a formação de cristais de gelo intracelularmente, a toxicidade dos crioprotetores, o choque osmótico (PEREIRA; MARQUES, 2008) e a modificação dos lipídeos celulares (AL DARWICH et al., 2010). Além disso, os embriões *in vitro* têm características como crescimento lento, sensibilidade térmica elevada, citoplasma demasiado electrón-denso e excessivo metabolismo de substrato energético que indica sua predisposição a ter sensibilidade à criopreservação (SUDANO et al., 2011). É importante destacar que a

qualidade embrionária representa um fator importante para o sucesso da criopreservação em embriões *in vitro* (SUDANO et al., 2011).

A membrana celular é composta por PUFA's e, entre eles, o ácido docosahexaenoico (DHA), o ácido linoléico e o ácido linoleico conjugado (CLA), os quais regulam a expressão de enzimas envolvidas na síntese de lipídeos na célula sem incrementar o catabolismo destes, nem prejudicar a produção de embriões (AL DARWICH et al., 2010). Ao mesmo tempo, aumentam a fluidez da membrana a qual é importante no processo de micela invertida que acontece na criopreservação, na qual o componente hidrofóbico está exposto externamente e o hidrofílico internamente na transição da fase fluida para a fase cristalina, favorecendo o incremento da permeabilidade da membrana celular (AMANN; PICKETT, 1987; PARKS; GRAHAM, 1992).

Referente aos aspectos moleculares, os fatores de transcrição que regulam a expressão de genes sintetizados em enzimas e que atuam no metabolismo lipídico são regulados com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA's) e seus metabólitos, além de outros ligantes. Entre esses fatores, estão os receptores ativadores pela proliferação peroxissomal (PPARs), proteínas de ligação aos elementos regulatórios de esteroides (SREBP) e retinoide X receptor (RXR). Esses fatores também estão envolvidos na transdução de sinais e na regulação da expressão de genes em diversos tecidos como coração, cérebro e adipócitos (SAMPATH; NTAMBI, 2005).

Os peroxissomos são organelas citoplasmáticas que realizam a remoção das substâncias tóxicas e a quebra dos ácidos graxos nas células eucarióticas. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) foram descobertos na procura de fatores que incrementam a proliferação de peroxissomos em células hepáticas de ratos (ISSEMANN; GREEN, 1990). Os PPARs são ativados por ácidos graxos insaturados, tendo uma alta compatibilidade com o PPAR $\alpha$ . Os eicosanoides provenientes da bioconversão do ácido araquidônico, tais como: os ácidos hidroxyeicosatetranoico, leucotrienos e prostanglandinas e os provenientes do ácido alfa linolênico, entre eles o eicosapentaenoico (EPA) e o docosahexaenoico (DHA) compõem um grupo de ácidos graxos que se ligam aos PPARs (CALDER, 2012), além de agonistas seletivos, tais como a molécula L-165041 (BERGER et al., 1999). Evidências mostram a relação dos fatores proliferadores de peroxissomas beta ou delta (PPAR $\beta/\delta$ ) na implantação embrionária (LIM et al., 1999) e na crioproteção (LIOU et al., 2006).

Hipotetizou-se que a ativação dos *PPARs* por meio da adição do seus ligandos DHA e L-165041 no cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* melhora o desenvolvimento e qualidade embrionária consequentemente melhorando a crioresistência.

O objetivo do presente estudo foi melhorar o desenvolvimento e criotolerância dos embriões bovinos produzidos *in vitro* pela ativação dos *PPARs* por meio da adição de ligantes destes no cultivo embrionário.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Impactos da produção *in vitro* convencional sobre o metabolismo e o potencial de desenvolvimento de embriões bovinos

Os embriões produzidos *in vitro* exibem padrões metabólicos diferentes aos embriões *in vivo*, além de incremento na expressão de transcritos relacionados a processos fisiológicos como diferenciação e proliferação celular, apoptose, e estresse oxidativo (GAD et al., 2012). O potencial de desenvolvimento dos embriões foi determinado com a ajuda do perfil do metaboloma que representa a relação entre o genoma e o fenótipo (BOTROS; SAKKAS; SELI, 2008). Técnicas de espectroscopia foram utilizadas em embriões para avaliar o metaboloma de uma forma não invasiva, analisando os meios de cultivo (SELI et al., 2007).

Os embriões *in vitro* têm maiores taxas metabólicas e oxidativas, onde produzem mais lactato que os embriões *in vivo* (KHURANA; NIEMANN, 2000a; LEESE, 2002, 2012). As condições dos meios de cultivo incrementam as taxas metabólicas. Isso foi demonstrado num experimento onde os embriões *in vivo* foram expostos a condições *in vitro*, e teve como resultado o aumento do metabolismo da glicose e a produção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), (LEESE, 2012). Os meios de cultivo *in vitro* geram estresse que modificam o metabolismo dos embriões tornando-o anormal. Isso foi evidenciado em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* que tiveram elevadas taxas glicolíticas comparados com embriões *in vivo* (LEESE, 2012; LEESE et al., 2008; STURMEY; LEESE, 2003). Embriões com um incrementado turnover de aminoácidos têm uma menor viabilidade. Por esse motivo, é possível prever que zigotos com baixo turnover de aminoácidos podem chegar a atingir o estágio de blastocisto (LEESE et al., 2008).

É postulado que a viabilidade do embrião é correlacionada com a análise dos metabólitos dos meios de cultivo. Mostrou-se uma excelente qualidade embrionária correlacionada com baixa taxa de glicólise, alta capacidade antioxidante, menor turnover de aminoácidos. Estas características não foram encontradas em embriões *in vitro*, sendo observada uma elevada expressão gênica comparado com embriões *in vivo*, podendo ser explicado por seu metabolismo “calmo” (CORCORAN et al., 2006; CÔTÉ et al., 2011). A exposição ao estresse ambiental conduz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e estresse oxidativo que altera o metabolismo dos embriões produzidos *in vitro*, os quais possuem a particularidade da “perda da tranquilidade” (LEESE et al., 2008).

Apesar das condições subótimas do cultivo *in vitro*, os embriões possuem alta capacidade de adaptabilidade a condições adversas. Sabe-se que a exposição a um ambiente inadequado têm consequências em longo prazo no feto e durante o crescimento pós-natal (HOELKER et al., 2014). Entretanto, para incrementar a viabilidade, qualidade, criotolerância e reduzir a incidência à mortalidade embrionária, é necessário aperfeiçoar os sistemas de cultivo (KANE, 2003; LONERGAN et al., 2007).

Outra característica dos embriões *in vitro* é a associação entre o acúmulo lipídico citoplasmático com a baixa criotolerância (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006; MUCCI et al., 2006). Sugere-se que esse acúmulo de lipídios no citoplasma seja consequência do uso de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo (BARCELO - FIMBRES; SEIDEL, 2007; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006), afetando negativamente a criotolerância, em decorrência da peroxidação lipídica (SEIDEL, 2006). Por esse, motivo, o incremento dos lipídios intracelulares pode aumentar a produção de radicais livres e induzir à morte embrionária (BARCELO - FIMBRES; SEIDEL, 2007). Com a finalidade de comprovar essa associação entre o acúmulo lipídico e a baixa criotolerância em embriões bovinos *in vitro*, foi realizada uma extração dos lipídios com o uso de citocalasina (estabilizador do citoesqueleto por inibição da polimerização de filamentos de actina), seguido de uma centrifugação e remoção com microcirurgia, e encontraram um incremento da sobrevivência pós-criopreservação nos embriões sem gotículas lipídicas (MURAKAMI et al., 1998).

Existem resultados contraditórios sobre a relação entre acúmulo lipídico e menor criotolerância. Embriões produzidos *in vivo* de fêmeas *Bos taurus taurus* tiveram maior conteúdo lipídico citoplasmático que embriões zebuínos (*Bos taurus indicus*), mesmo assim, tiveram maior criotolerância à vitrificação (VISINTIN et al., 2002). Por esse motivo, sugere-se que o acúmulo lipídico é consequência das alterações metabólicas que acontecem nos embriões *in vitro* sejam pelo desequilíbrio do metabolismo oxidação-redução ou pela adição de soro fetal bovino incrementado das EROS, conduzindo a menor criotolerância (SUDANO et al., 2011).

Referindo-se aos efeitos negativos do soro fetal bovino nos embriões *in vitro*, além de conter agentes patógenos (LONERGAN et al., 2006) e de estar relacionado com o incremento do acúmulo lipídico como já foi mencionado anteriormente, este está relacionado com modificação de organelas celulares (ABE et al., 2002) degeneração mitocondrial (DORLAND; GARDNER; TROUNSON, 1994), alteração do padrão de expressão gênica (RIZOS et al., 2002), formação prematura da blastocle (RIZOS et al., 2003), redução da relação entre as células da massa celular interna e as células trofoblásticas (FOULADI-

NASHTA et al., 2005) e aumento das células apoptóticas (BYRNE et al., 1999). Rizos et al. (2003) demonstraram que embriões cultivados com soro proporcionam maior expressão relativa de transcritos do gene Bax (BCL2 Associated X Protein que codifica a proteína pró-apoptótica. A síndrome do bezerro gigante também está relacionada com a adição de soro nos meios de cultivo (LAZZARI et al., 2002). Essa síndrome é consequência das alterações celulares que acontecem no cultivo *in vitro* que está acompanhada com a perda da gestação, placentas anormais, bezerros de tamanho sobredimensionado e incremento da taxa de aborto (FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2003).

Existem diferentes características morfológicas entre os embriões cultivados *in vitro* com e sem soro (SHAMSUDDIN; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994). Essas alterações presentes em embriões cultivados com soro são associadas a menor compactação das mórulas (ABE et al., 1999), por outro lado, embriões cultivados sem soro tem morfologia semelhante a embriões produzidos *in vivo* (CROSIER et al., 2001) A adição de soro no cultivo embrionário pode, conseqüentemente, alterar os complexos de união intercelulares (SHAMSUDDIN; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994). As diferenças nos embriões produzidos *in vitro* com/sem adição de soro com os embriões *in vivo* podem ser explicadas pelas variações de expressão do gene que codifica a proteína Connexina 43 (Cx43), que participa nas uniões de tipo gap nos embriões em estágio de pré-implantação (BONI et al., 1999). Isso foi corroborado, no estudo, utilizando embriões cultivados com soro, que tiveram uma transcrição menor do gene Cx43 comparados com os embriões cultivados em meio livre de soro. Como foi mencionado anteriormente, esse gene codifica a síntese da proteína que exerce um papel importante no desenvolvimento embrionário inicial (LAZZARI et al., 2002).

Embriões bovinos cultivados *in vitro* sem suplementação de soro no meio, reduziu o acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos, a redução do acúmulo lipídico iniciou-se no estágio de mórula e coincidiu com o surgimento de mitocôndrias maduras (ABE et al., 1999). Os lipídios exercem função de reserva energética, durante a fase do desenvolvimento embrionário com maior demanda para a formação da blastocele. Por outro lado, em cultivos *in vitro* de embriões bovinos com adição de soro, houve acúmulo lipídico no estágio de mórula (FERGUSON; LEESE, 1999). Sugere-se que as causas pelas quais o soro fetal bovino incrementa o conteúdo lipídico em embriões, pode ser produto de uma alteração metabólica com efeito deletério na atividade mitocondrial, a qual altera a morfologia da mitocôndria e causa disfunção dessa organela, tendo, como consequência, o acúmulo excessivo de gotículas lipídicas (DORLAND; GARDNER; TROUNSON, 1994). Outra possível causa proposta é que as lipoproteínas contidas no soro ingressam por endocitose nos blastômeros, as quais

carregam ácidos graxos, colesterol, além de outras substâncias, introduzindo esses lipídios e aumentando o acúmulo lipídico intracelular (ABE et al., 1999; THOMPSON et al., 1995).

Por outro lado, o incremento do acúmulo lipídico pode ser decorrente de alterações no metabolismo energético, tais como: o efeito “Crabtree”, no qual os embriões elevam a metabolização da rota glicolítica, acompanhado de bloqueio da fosforilação oxidativa. Por esse motivo, o acúmulo lipídico é resultado do excesso de metabolismo da glicose, por incremento de concentrações celulares de precursores da síntese de lipídios (RIEGER, 1992). Ocorre de maneira conjunta um distúrbio do equilíbrio no processo de oxidação-redução celular que prejudica o metabolismo da mitocôndria e afeta mecanismos como a oxidação tendo, conseqüentemente, acúmulo lipídico (BARCELO - FIMBRES; SEIDEL, 2007; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006; ABE et al., 2002; DORLAND; GARDNER; TROUNSON, 1994).

Além disso, deve-se levar em conta que os embriões in vitro possuem características como blastômeros soltos, citoplasma muito eletro denso e crescimento mais lento que ajudam a diminuir a criotolerância dos embriões (BARCELO - FIMBRES; SEIDEL, 2007; DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006; GARDNER; LANE; LANE, 2000; ABE et al.,

2002; RIZOS et al., 2002a, 2003). Encontrou-se correlação entre maiores taxas de apoptose em blastocistos in vitro pré-vitrificação com incremento da apoptose em blastocistos pós vitrificação, indicando que a qualidade dos embriões tem maior importância na sobrevivência embrionária nos processos de criopreservação em relação ao acúmulo lipídico (SUDANO et al., 2011).

O aumento nas concentrações das EROS produzidas pelos embriões in vitro reduz o desenvolvimento embrionário (TAKAHASHI, 2012) afetando a qualidade oocitária (TAMURA et al., 2009) em função da deterioração da membrana lipídica que acelera o processo apoptótico e destrói o DNA (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999). As EROS fazem parte de um grupo das três classes de compostos das espécies reativas, junto com as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), espécies reativas de enxofre (EREs). Essas espécies reativas são íons, átomos ou moléculas derivadas de oxigênio, com alta reatividade em sua grande maioria, as quais podem ser divididas em radicais livres e compostos não radicais (CAROCHO; FERREIRA, 2013; MAGDER, 2006). Os radicais livres são moléculas ou átomos com pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, característica que permite a transferência de elétrons para moléculas vizinhas (CAROCHO; FERREIRA, 2013; MAGDER, 2006).

As taxas de replicação celular em cada estágio embrionário e o desenvolvimento morfológico devem ser suportadas pela composição dos meios, além de reduzirem o estresse celular (LEESE et al., 2007) tendo como finalidade a obtenção de nascimentos de bezerros saudáveis (PARTRIDGE A; LEESE, 1996). O intuito do cultivo *in vitro* e a formulação dos meios de cultivo é simular a composição de nutrientes e as condições de oxigênio do fluido uterino que, durante o desenvolvimento embrionário, mudam dinamicamente pelos requerimentos de cada estágio embrionário (THOMPSON et al., 1996). Um marcador de qualidade embrionária pode ser o metabolismo do piruvato. Observou-se que a progressão morfológica dos embriões *in vitro* está relacionada com o consumo de piruvato. Embriões com metabolismo intermediário de piruvato progrediram, morfológicamente, comparados com aqueles embriões que permanecem estáticos e não se desenvolvem (68% vs. 13-25% respectivamente) (GUERIF et al., 2013). Isso corrobora, novamente, a hipótese do “metabolismo calmo” segundo a qual, a baixa taxa metabólica prediz a viabilidade de embriões *in vitro* e se relaciona com o desenvolvimento de blastocistos. Similarmente ao que acontece com embriões produzidos *in vivo* que permanecem numa “tranquilidade natural” (LEESE, 2012; STURMEY et al., 2010). Essa baixa taxa metabólica pode ser demonstrada na prática, pois sabe-se que, após transferência, aproximadamente 61% dos embriões bovinos produzidos *in vitro* não se desenvolvem, e àqueles que se desenvolvem podem nascer com alterações morfológicas relacionadas à “síndrome do bezerro gigante” (FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2003).

O comportamento dos embriões difere bastante 186 horas pós-inseminação, sendo nesse intervalo de tempo encontrados metabolitos relacionados à resposta ao estresse em blastocistos de crescimento rápido. Entre os metabolitos presentes, nesse momento, identifica-se o glucoroneto de 11 oxo-androsterona, o qual é produto da glucoronidação e que participa na eliminação de substâncias que não podem ser usadas como fonte de energia e de substâncias tóxicas (SALLUSTIO, 2008). Outro metabolito encontrado nos embriões de crescimento rápido foi o peroxinitrito, o qual atua como agente oxidante resultante da interação química entre o óxido nítrico (NO) e ânions superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que é considerada uma espécie reativa “híbrida”, relatada por ser responsável de danificar diretamente as bases de DNA, por nitração de resíduos de guanina e desaminação (OHSHIMA; BARTSCH, 1994; ROUTLEDGE et al., 1994).

. Blastocistos de ótima qualidade mantém a homeostase oxidativa, que é proporcionada no trato reprodutivo da fêmea. A exposição pro-oxidante ou um bloqueio da proteção antioxidante pode ser incrementado por condições não ótimas, as quais são

características do sistema de produção *in vitro* (AGARWAL et al., 2012; FEUGANG; CAMARGO-RODRÍGUEZ; MEMILI, 2009; KHURANA; NIEMANN, 2000b).

A produção de blastocistos não é o melhor parâmetro de medida da eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIVE). A capacidade de desenvolvimento pós-transferência é definida pela qualidade embrionária e a capacidade de suportar o estresse envolvido nos protocolos de criopreservação e transferência (CÔTÉ et al., 2011). Portanto, uma ferramenta que ajudaria no entendimento da resposta embrionária aos diferentes ambientes da PIVE e o desenvolvimento embrionário inicial é a biologia molecular que permite desenvolver sistemas de cultivo mais adequados para os embriões.

Além das diferenças morfológicas e metabólicas entre os embriões *in vitro* e os embriões *in vivo* mencionadas anteriormente, são encontradas também diferenças na expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário. Tal variação de expressão gênica é demonstrada em estudos de transcriptoma (CLEMENTE et al., 2011; MUNDIM et al., 2009). Entre os genes diferencialmente expressos temos os genes relacionados com o metabolismo de lipídios, que são mais expressos em embriões *in vivo*, comparados com embriões *in vitro* (GAD et al., 2012). Por esse motivo, a utilização dos lipídios internos como fonte de energia produzindo ATP pode estar comprometida nos embriões *in vitro*, em razão da alteração no metabolismo mitocondrial, que permite compreender as características morfológicas dos embriões *in vitro*, como o citoplasma mais escuro (DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013).

Sabe-se que a mitocôndria exerce funções que influenciam a qualidade oocitária e a competência de desenvolvimento embrionário, concordando com a hipótese do embrião “calmo” (LEESE, 2012). Constatou-se que um dos principais impactos na produção *in vitro* de embriões é a expressão de genes relacionados com a função mitocondrial em blastocistos produzidos *in vitro* comparados com os blastocistos produzidos *in vivo* (PLOURDE et al., 2012).

Algumas características presentes nos embriões *in vitro* tais como índice apoptótico, criotolerância, conteúdo lipídico, expressão gênica e número de células, refletem na sua baixa viabilidade (BERGERON et al., 1998; ABE et al., 2002; LEIBO; LOSKUTOFF, 1993; NIEMANN; WRENZYCKI, 2000). A criotolerância reduzida dos blastocistos *in vitro* e o elevado índice apoptótico, além da menor relação massa celular interna e trofocotoderma afetam seu desenvolvimento quando comparado com os embriões *in vivo* (GJORRET, 2003; IWASAKI et al., 1990).

A competência de desenvolvimento até o estágio de blastocisto está relacionada com a qualidade oocitária, além disso, as condições de cultivo impactam na qualidade do blastocisto (KNIJN et al., 2002; RIZOS et al., 2002b) além da velocidade de desenvolvimento embrionário, a taxa de clivagem, a ativação do genoma embrionário e a qualidade do blastocisto (CROSIER et al., 2001; LONERGAN et al., 1999).

O desenvolvimento dos embriões mamíferos produzidos *in vitro* é prejudicado, em decorrência do incremento do estresse oxidativo. As alterações no embrião, ocasionadas pela oxidação de sulfidrilas de proteínas, peroxidação lipídica da membrana, disfunção mitocondrial e fragmentação do DNA são determinadas pelo aumento na produção das EROS, (GUERIN, P, MOUATASSIM; MENEZO, 2001).

Por outro lado, o aumento de EROS e a redução das concentrações de superóxido dismutase foram associados com apoptose e dano no desenvolvimento embrionário (GUERIN, P, MOUATASSIM; MENEZO, 2001).

Entre as vias que podem desencadear a apoptose celular está a via extrínseca, na qual ativadores específicos se ligam aos receptores de necrose tumoral (rTNF), pelo subdomínio extracelular, na membrana, e, assim, é iniciada a cascata das caspases. (BUDIHardjo et al., 1999). Após o reconhecimento realizado no subdomínio extracelular, ocorre a trimerização e ativação dos receptores de morte específicos. A região externa dos receptores rTNF onde os ativadores se ligam é uma sequência de 65 aminoácidos denominada domínio de morte (NAISMITH; SPRANG, 1999). Esses domínios interatuam com as moléculas FADD/MORT-1, as quais recrutam a caspase 8 que irá induzir a ativação da caspase 3 resultando na indução da apoptose (DANIEL et al., 2001).

Fatores como radiação, hipóxia, monóxido de nitrogênio, bloqueio de fatores de sobrevivência e estresse celular podem induzir a via apoptótica intrínseca, na qual participam as mitocôndrias que liberam a proteína citocromo C no citosol, ligando-se ao fator de ativação da protease da Apoptose (Apaf-1). Essa liberação acontece pela permeabilização da membrana externa mitocondrial (BOSCÁ; HORTELANO, 1999; MATHIEU et al., 1999). (ZIMMERMAN et al., 2001; MOVASSAGH; Foo, 2008). Finalmente, a junção entre o Citocromo C e Apaf-1 induz a clivagem da procaspase-9 para caspase 9 ativa que, por sua vez, irá ativar as caspases 3 e 6 que irão executar a apoptose (LI et al., 1997).

Uma terceira via que ativa a apoptose é a do receptor-ligante, que está relacionada ao retículo endoplasmático submetido ao estresse por agentes como thapsigargina e tunicamicina. A indução de apoptose dependente do retículo endoplasmático e pode ser feita pelos mecanismos de sinalização de  $Ca^{++}$  e resposta proteica desdobrada (KAUFMAN,

1999). Estes induzem a clivagem da procaspase 12 e translocação da caspase 12 ativa no citoplasma com consequente ativação da procaspase-9. Nesse estágio, a via intrínseca converge com a via dependente de retículo endoplasmático com a ativação das caspases 3 e 7 (MOVASSAGH; FOO, 2008).

A via mitocondrial apoptótica e a via do receptor de morte possui um rol central na execução da via da apoptose pela enzima caspase 3, que é um efetor chave downstream da família da cisteína proteases (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). O embrião, na fase de pré-implantação, possui pró-caspase 3 inativa e, em razão de alguns estímulos, é clivada e ativada. Esse processo é crucial para a desorganização dos componentes do citoesqueleto, que causa a ativação da degradação da endonuclease (a caspase ativa a DNase). Entre as alterações que podem ser observadas nas células em processo de apoptose, temos a autofagia, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, do núcleo e do citoplasma (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002).

A mudança de temperatura é um estímulo não fisiológico que pode induzir à apoptose. Um exemplo é a criopreservação dos embriões, que ocasiona o estresse oxidativo que pode ativar a cascata apoptótica, além de causar outras injúrias tais como: dano na membrana, ruptura do citoesqueleto e fragmentação do DNA comprometendo a sobrevivência e desenvolvimento de oócitos e embriões (MARTINO et al., 2012). Embora aconteça a proliferação e renovação celular durante o desenvolvimento embrionário e aumente a criotolerância é crucial a inibição da via da apoptose, porém não podemos descartar que a inibição dessa via possa ter efeitos colaterais em longo prazo (STROH et al., 2002)

Por outro lado, o fosfolipídio fosfatidilserina na célula saudável é encontrado exclusivamente na camada interna da membrana celular. No caso da célula em apoptose, este é encontrado na camada externa da bicamada lipídica da membrana celular, isto é considerado como evento inicial do processo apoptótico (HANSHAW; SMITH, 2005). Embriões em estágios pré-implantacionais de 2 células até blastocisto em processo de apoptose exibiram a externalização de fosfatidilserina (LEVY et al., 1998) e (MATEUSEN et al., 2005).

Segundo Antunes et al. (2010) e Gawecka et al. (2013), não foram encontrados sinais de apoptose em embriões em estágios iniciais (estágios de 2 a 8 células) possivelmente em decorrência do genoma embrionário ainda estar inativo. Sugere-se que o processo de externalização da fosfatidilserina possa ser influenciado pela inativação do genoma embrionário. Em outro estudo, foram encontrados sinais iniciais de apoptose em embriões bovinos oriundos de clonagem por transferência nuclear de células somáticas em estágio de 4

células, além disso observou-se fragmentação de DNA no oócito e embriões em estágios de mórula e blastocisto (MATWEE et al., 1999).

Foi relatado o envolvimento de uma flavoproteína chamada de Fator Indutor de Apoptose (AIF) na via mitocondrial que, após uma indução de apoptose, migra da mitocôndria para o núcleo, causando a fragmentação do DNA em fragmento de 50Kb e condensação da cromatina. Esse processo é independente da cascata das caspases (BROKER; KRUYT; GIACCONE, 2005).

Os corpos apoptóticos podem ser delimitados e circundados por projeções da membrana plasmática nas fases finais da apoptose, isto permite que esses corpos possam ser expulsos para o lúmen adjacente ou fagocitados por células circunvizinhas (MATWEE et al., 2000).

As fases de indução ou upstream e a fase de execução ou downstream compreendem os eventos moleculares envolvidos no processo apoptótico. A ativação das caspases citoplasmáticas caracteriza a fase de indução, seguida da fase de degradação celular (MATWEE et al., 2000).

A apoptose é um mecanismo natural das células, estando relacionado com o desenvolvimento. O índice de células em apoptose é utilizado como indicador de qualidade embrionária. Em razão do aumento na taxa de apoptose celular e danos no desenvolvimento dos embriões, é afetada a qualidade embrionária que está correlacionada positivamente com a taxa de prenhez em transferência de embriões criopreservados (BYRNE et al., 1999).

Com tudo, a apoptose é um mecanismo de regulação celular, eliminando células danificadas não funcionais ou células em excesso na fase de pré-implantação do embrião como (BRISON, 2000; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002), proporcionando a sobrevivência embrionária em condições de estresse, o incremento está correlacionado com anormalidades na morfologia embrionária e diminuição da viabilidade (JACOBSON; WEIL; RAFF, 1997). Já se sabe que embriões *in vivo* tem menor índice apoptótico que os embriões PIVE (BERGERON et al., 1998). Desta forma, uma alternativa para determinar a taxa de apoptose é pela técnica *in situ* Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nickend Labeling (TUNEL) a qual marca o DNA fragmentado, característica presente em outros tipos de morte celular (AHUMADA et al., 2013; GRASL-KRAUPP et al., 1995; BYRNE et al., 1999; FOULADI-NASHTA et al., 2005).

## **2.2 Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR) e sua influência na reprodução**

Entre os isotipos de PPAR descobertos, temos o PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  (conhecido também como PPAR $\delta$ ) e o PPAR $\gamma$  (ISSEMANN; GREEN, 1990). Cada isotipo é codificado por diferentes genes. Podem existir outras variedades de PPARs, em decorrência do splicing alternativo e que teriam outros tipos de promotores (KOMAR, 2005). Todos fazem parte de uma subfamília dentro da superfamília de receptores de esteroides (SER). São similares aos receptores de hormônios esteroides e tireoidianos, sendo todos fatores de transcrição nuclear ativados por ligandos (HUANG et al., 2007a).

Os PPARs formam heterodímeros com outro receptor nuclear, chamado o Receptor X Retinoide (RXR). Os ligantes dos PPARs não são indispensáveis para que aconteça essa interação. Outra série de elementos cofatores são recrutados, antes de se unirem ao elemento responsivo do PPAR (PPRE), nos sítios promotores de genes responsivos ao PPAR. Os Receptores X Retinóide também formam heterodímeros com outros receptores nucleares. O Retinóide X receptor alfa (RXR $\alpha$ ), Retinóide X receptor beta (RXR $\beta$ ) e Retinóide X receptor gamma (RXR $\gamma$ ) são os três isotipos do RXR, estes são ativados pelo ácido 9-cis-retinoico (MANGELSDORF et al., 1995). Uma particularidade do PPAR $\beta$  /  $\delta$  é a repressão das atividades de transcrição do PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  feita por co-repressores acionados pelo PPAR $\beta$  /  $\delta$  (SHI; HON; EVANS, 2002).

Os três isotipos de PPAR foram encontrados em tecido ovariano. O isotipo PPAR $\gamma$  foi detectado em células da granulosa de camundongos (HIGASHIYAMA, 2007), ratos (KOMAR, 2005) e ovelhas (FROMENT et al., 2003). Foi encontrada a expressão de PPAR $\gamma$  em oócitos bovinos (MOHAN et al., 2002) e humanos (WOOD et al., 2007).

Em folículos primários, secundários e pré-ovulatórios foi detectado o PPAR $\gamma$ , que incrementa sua expressão no desenvolvimento dos folículos. Uma vez acontece o surto de LH, a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para PPAR $\gamma$  diminui (KOMAR, 2005). Nas células da granulosa, a síntese de hormônios esteroides parece ser regulada pela ativação natural de ligantes sintéticos e naturais, sugerindo que o PPAR $\gamma$  possa estar, indiretamente, relacionado com a maturação oocitária via células da granulosa. Ratas tiveram subfertilidade pela deleção do gene PPAR $\gamma$  em seus ovários, com a tecnologia do sistema de recombinação Cre-loxP (CUI et al., 2002).

No período pré-implantação, inicia-se a expressão do PPAR  $\beta/\delta$  e PPAR $\gamma$  em embriões de duas células de ratos e bovinos, respectivamente. O PPAR $\gamma$  é expresso no trofectoderma e na massa celular interna de blastocistos bovinos (MOHAN et al., 2002).

### **2.3 Efeito do L-165041 agonista seletivo do Receptor Ativado por Proliferadores de**

## Peroxisoma Delta (PPAR $\delta$ ) nos embriões

O PPAR $\delta$ , também conhecido como PPAR $\beta$  é um receptor nuclear, o qual é ativado por uma série de ligantes sintéticos e endógenos (FORMAN et al., 1997).

Existe uma relação da proteção celular por parte do PPAR $\delta$  o qual é ativado pela PGI<sub>2</sub> (HAO et al., 2002). Ratos com alelos deficientes para PPAR $\delta$  tiveram defeitos reprodutivos (CHENG et al., 2002) comprovados comparando blastocistos eclodidos provenientes de ratos PPAR $\delta$   $+/+$  (preservado) e PPAR $\delta$   $-/-$  (deletado) cultivados in vitro por 96h. Cerca de 30% dos embriões PPAR $\delta$   $+/+$  eclodiram às 96h comparados com o 3% de eclosão dos embriões PPAR $\delta$   $-/-$ . A adição do agonista seletivo de PPAR $\delta$  - L-165041 ((BERGER et al., 1999), no meio de cultivo embrionário incrementou a taxa de eclosão (58%) nos blastocistos do grupo tratamento comparada com a taxa de eclosão (30%) do grupo controle. A adição de L-165041 não teve efeito na taxa de eclosão nos embriões PPAR $\delta$   $-/-$ , indicando o efeito do L-165041 via PPAR $\delta$ . Os embriões PPAR $\delta$   $-/-$  permaneceram em estágio de mórula e somente 28% eclodiram a diferença dos blastocistos PPAR $\delta$   $+/+$  os quais 85% eclodiram. O efeito estimulador da eclosão pelo L-165041 foi eficaz somente quando foi adicionado nos embriões na fase de 2 células, 8 células e mórula. Quando os embriões chegaram à fase de blastocisto, a adição de L-165041 não foi mais eficaz. Demonstrou-se, com isto, que a ineficácia da eclosão nos embriões PPAR $\delta$   $-/-$  foi decorrente da diminuição da proliferação celular. Esses resultados indicam que o agonista seletivo exógeno do PPAR $\delta$  o L-165041 acelera a eclosão pela estimulação da proliferação celular nos embriões. Além disso, constatou-se que o PPAR $\delta$  interfere na proliferação de células embrionárias, aumentando a massa celular embrionária. Isso foi demonstrado ao comparar-se o número de células dos embriões PPAR $\delta$   $-/-$  de somente 30% do número de células dos embriões PPAR $\delta$   $+/+$ , depois de 72 horas de cultivo (HUANG, 2007).

A eclosão é mediada por dois fatores principais: o primeiro é o aumento do número de células embrionárias, o qual desencadeia a diminuição da espessura da zona pelúcida (MONTAG et al., 2000). O segundo fator é a digestão da zona pelúcida por enzimas proteolíticas (SAWADA et al., 1990).

Os agonistas ativam o PPAR $\delta$  o qual forma um heterodímero com o receptor retinóide X que se une a elementos de resposta a PPAR $\delta$  e ativam a transcrição do gene (KLIEWER et al., 1994). Entre os genes cuja expressão é mediada pelo PPAR $\delta$  foram relatados o 14-3-3 $\epsilon$  e o phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1), que estão implicados na proteção das células da apoptose (LIOU et al., 2006). Contudo, o mecanismo pelo qual o PPAR $\delta$  promove a

proliferação celular nos embriões é desconhecido. Não se tem conhecimento sobre os efeitos do L-165041 nos receptores de prostaciclina (IP). Em um estudo feito com embriões provenientes de animais IP<sup>-/-</sup> (sem receptores) não foi encontrada melhora no desenvolvimento. Pressupõe-se que a ativação do *PPAR* $\delta$  seja modulada por vias de sinalização ativadas pelos receptores IP. Outro fator que explica a demora no desenvolvimento dos embriões IP<sup>-/-</sup> que tinham o *PPAR* $\delta$  preservado pode ser a perda de mediadores de IP (HUANG et al., 2007a). Foram relatadas modificações pós-traducionais do *PPAR* $\delta$  as quais representam entre 40-50% do desenvolvimento embrionário *in vitro* (BLANQUART et al., 2003).

#### **2.4 Efeito do ácido docosahexaenóico (DHA) nos embriões**

O ácido graxo docosahexaenóico (DHA) pertence à família dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 3, onde o precursor é o ácido alfa-linolênico (ALA). O ácido graxo eicosanpentaenóico (EPA) também faz parte desse grupo de moléculas biológicas ativas que apresentam diversos benefícios à saúde (HASHEM et al., 2006).

O ácido graxo alfa-linolênico (ALA) é incapaz de ser sintetizado pelos mamíferos, sendo classificado como ácido graxo essencial. O ácido graxo que tem maior número de carbonos na sua estrutura é o DHA, produto da dessaturação e alongação do ALA. O ácido docosahexaenóico está presente em algas marinhas e peixes de águas geladas. Esse ácido graxo é a molécula mais biologicamente ativa da família n3 (MONTAG et al., 2000; ZERON; SKLAN; ARAV; 2002; BRETILLON et al., 1999).

O gene esteroil coa desaturase (*SCD1*), encarregado de colocar as duplas ligações nos ácidos graxos é reprimido somente pelo DHA em embriões bovinos comparados com o C18:2, C18:3 e ácidos graxos de cadeia curta que mostram pouca eficiência (AL DARWICH et al., 2010). A expressão do gene da proteína de ligação ao elemento regulador de esteroides (*SREBP*), um trans-ativador que tem efeito em genes e contém elementos de reguladores esteróis (*SREs*). É estimulado pelos PUFAs, por meio de diversos mediadores da transcrição (SAMPATH; NTAMBI, 2005). O ácido graxo DHA diminuiu a expressão do RNAm para proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (*SREBP1*), (AL DARWICH et al., 2010). Entre as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico está a *SREBP*, onde sua expressão é reduzida, por causa dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa em fígado e tecido adiposo (XU et al., 1999).

A suplementação com DHA, no meio de cultivo *in vitro* diminuiu a expressão dos genes SCD1 e FADS1 em embriões bovinos entre 7 e 8 dias. Esses genes codificam proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico, possivelmente, por meio da regulação da expressão do gene SREBP1 a qual também foi diminuída pelo DHA nesses embriões. Esses resultados sugerem que o DHA modificou o balanço de saturados e insaturados nesses blastocistos favorecendo a alteração na fluidez das membranas (AL DARWICH et al., 2010).

Os eventos de oxidação e síntese lipídica influenciados pelos PUFAs acontecem por seus efeitos sobre os fatores de transcrição. Resultados de trabalhos em ratos que consumiram óleo de peixe (rico em DHA) demonstraram a supressão dos genes lipogênicos Proteína ribossomal (S14) e FAS (REN et al., 1997). Ao adicionar os PUFAs ao meio de cultivo de embriões, estes se incorporam na bicamada fosfolipídica da membrana celular, proporcionando fluidez e melhorando o metabolismo das células (JUCHEM et al., 2010).

Foi comprovado, em vários estudos, o efeito do aumento da transcrição dos genes envolvidos na  $\beta$ -oxidação lipídica por causa do óleo de peixe que é rico em ácidos graxos poliinsaturados em especial ômega 3, tais como DHA e EPA (REN et al., 1997). Outro efeito encontrado dos PUFAs foi o bloqueio à expressão de genes com atividade lipogênicas, tais como: o FAS e S14 em ratos selvagens e em ratos mutantes. Com o gene PPAR $\alpha$ -null bloqueado, indica-se que o efeito da oxidação lipídica e a síntese não foram causados unicamente pelos PPARs nos quais os PUFAs e a enzima SREBP poderiam exercer efeitos nesse processo (REN et al., 1997). A redução da expressão gênica de enzimas que atuam no metabolismo lipídico é influenciada pelos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (DHA) e 6 (BRETILLON et al., 1999; CHOI et al., 2000).

## **2.5 Técnicas para avaliação do desenvolvimento e qualidade embrionária**

Existem técnicas para avaliação do metabolismo, viabilidade e ultraestrutura embrionária que podem auxiliar no análise dos efeitos da adição dos tratamentos no cultivo em embriões bovinos pré e pós vitrificados. Dentre elas, encontramos a Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nickend Labeling (TUNEL) que permite observar fragmentos de DNA os quais são característicos de processos apoptóticos, além de técnicas de coloração de células embrionárias, que nos permitem determinar a proporção de células em cada embrião, característica importante para predizer sua viabilidade. A composição fosfolipídica e o conteúdo de gotículas nos embriões também podem ser analisados por

técnicas, tais como: a espectrometria de massa Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry MALDI-MS e o Sudan Black o qual nos indica o metabolismo dos embriões. O estado das organelas celulares embrionárias pode ser avaliado pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

## **2.6 TUNEL, Marcação nick-end com dUTP mediada pela desoxinucleotidil transferase terminal**

A morte celular programada ou apoptose é altamente conservada e exerce funções relevantes no desenvolvimento embrionário e na homeostase do organismo. Células danificadas não funcionais ou excessivas são removidas pelo processo de apoptose, atuando como mecanismo de controle de qualidade (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; JACOBSON; WEIL; RAFF, 1997). A diminuição da viabilidade embrionária está associada ao incremento desproporcional desse tipo de morte celular (BYRNE et al., 1999).

A identificação *in situ* da fragmentação internucleossômica do DNA, TUNEL, pode ser realizada pré-criopreservação com o intuito de determinar o índice apoptótico causado pela PIVE e pós-criopreservação com a finalidade de avaliar o índice apoptótico causado pelo processo de criopreservação. A técnica pode ser utilizada para avaliar o efeito do choque térmico, o qual promove aumento da porcentagem de oócitos bovinos Tunel-positivos (ISPADA et al., 2011; MEIYU, LIU, ROTH, 2014a). Ascari et al. (2017) observaram que o choque térmico incrementou a fragmentação de DNA em oócitos, além de reduzir a atividade mitocondrial sem aumentar a atividade da caspase-3, o que indica a ativação da via de apoptose, pelo fator de indução da apoptose (FIA), uma flavoproteína (CANDÉ et al., 2004; SHEN et al., 2010), induzindo à condensação da cromatina, fragmentação do DNA, e apoptose celular (SUSIN et al., 1999; BRÖKER et al., 2005).

O TUNEL positivo é causado pela diminuição da maturação oócitaria pelo choque térmico, pode ser correlacionado à apoptose nas células do *cumulus*. Em células do *cumulus* de oócitos submetidos ao choque térmico, detectaram-se reações apoptóticas sem ser detectada apoptose nos oócitos, o que indica que a alteração na maturação dos oócitos não ocorreu por causa da apoptose ou danos no DNA submetidos ao choque térmico (YUAN et al., 2008; NABENISHI et al., 2012).

Foi encontrado maior índice de apoptose na massa celular interna (MCI) quando comparada com o trofoblasto em embriões bovinos (SUDANO et al., 2011; BYRNE et al.,

1999). Esses índices chegam a 4% nas células trofoblásticas vs 10% das células da massa celular interna. A linhagem celular, a partir da qual o feto se origina, é a massa celular interna na qual a apoptose exerce um controle qualitativo rigoroso (BYRNE et al., 1999).

## **2.7 Contagem do número total de células**

Um parâmetro importante para a avaliação da qualidade de embriões é a contagem do número total de células. Do número de células totais do embrião depende o desenvolvimento fetal normal, além disso, uma característica primordial que devem ter os embriões para garantir a viabilidade embrionária é a proporção adequada entre a massa celular interna e o trofoblasto (LANE; GARDNER, 1997). O tipo celular e os objetivos da pesquisa determinam o método de coloração a ser utilizado. Pursel et al. (1985) e Handyside e Hunter (1984) descreveram o uso do corante de DNA específico Hoeschst 33342 em embriões de camundongos. Posteriormente, Ellington et al. (1990) utilizaram esse corante em embriões bovinos. Para realizar a técnica, são classificados e medidos os embriões por uma câmera de imagem motica Motic-Moticam 2.0 Plus, Japão. Recomenda-se fixar blastocistos com um diâmetro > 160 µm (micrometro) e uma concentração de 1 µg (micrograma) / mL (mililitro) durante 5 min do corante Hoeschts 33342, e colocá-los em lâmina e cobrir com lamínula e, posteriormente, observar em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axiophot, Alemanha, filtro 24) com um comprimento de onda de 494/518 nanômetros (nm), (excitação / emissão) e, em seguida, realiza-se a contagem dos núcleos celulares (SPRÍCIGO et al., 2015).

## **2.8 Espectrometria de massa lipídica MALDI-MS**

A bicamada lipídica da membrana celular é composta por fosfolipídios, os quais exercem funções ainda não compreendidas em sua totalidade, em células eucarióticas (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008). A composição fosfolipídica das membranas estabelece suas propriedades físico-químicas, tais como: a permeabilidade, comportamento da fase térmica e sua fluidez. Portanto, as células têm uma proporção equilibrada de fosfolipídios para manter uma membrana funcional e estável (EDIDIN, 2003). Técnicas de análise baseadas em espectrometria de massa com alta sensibilidade e seleção ajudaram o conhecimento da função dos lipídios no interior das células (ROBERTS et al., 2008; EJSING et al., 2009). A técnica de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) (KARAS; HILLENKAMP, 1988) é bem-sucedida em pesquisas de

composição de lipídios. A MALDI-MS permitiu em estudos de lipidômica a aquisição simples e rápida de espectros de massa de lipídios em tecidos, líquidos corporais e células (FUCHS; SCHILLER, 2008). Essa técnica pode ajudar a entender o comportamento da membrana celular, segundo sua composição lipídica em mudanças de temperaturas.

O entendimento do comportamento das membranas fosfolipídicas é importante para pesquisas de criopreservação de diversos tipos celulares, como gametas e embriões para a conservação de recursos genéticos e exportação de material genético (PEREIRA; MARQUES, 2008). A técnica de Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) permite obter produtos como íons com características diferentes, tais como: fosfatidilcolinas (PC), TAG e esfingomielinas (SM) cada um com suas respectivas abundâncias. A análise de impressões digitais de lipídios pelo MALDI-MS é possível ser feita em embriões, pois estes possuem uma complexa mistura de lipídios, que é detectada de maneira sensível, sendo comparada à abundância relativa das moléculas encontradas entre os tratamentos estudados (SCHILLER et al., 2004). A análise estatística multivariada é utilizada para analisar os perfis lipídicos dos componentes principais, que permitem agrupar as amostras semelhantes e localizar os íons mais importantes (FERREIRA et al., 2010; SUDANO et al., 2012a; TATA et al., 2013) Após a análise estatística multivariada, outro recurso estatístico que pode ser utilizado é a análise univariada que possui moléculas identificadas como significativas para a separação dos grupos experimentais (SUDANO et al., 2012a). A análise dos perfis lipídicos em amostras biológicas pela técnica de MALDI ou por outros métodos de ionização não requerem da utilização de referências externas ou internas, em decorrência da comparação ser semiquantitativa e não absoluta (LEÃO et al., 2014).

Demonstrou-se que o acúmulo de lipídios citoplasmáticos em embriões bovinos prejudica a criotolerância (ABE et al., 2012; BARCELO-FIMBRES; SEIDEL, 2007; GEORGE et al., 2008), o que permite-se deduzir que a estabilidade e propriedades das membranas celulares são alteradas pelas modificações no metabolismo lipídico causadas no cultivo embrionário (DINNYES; NEDAMBALE, 2009). A técnica MALDI-MS conta uma resolução espacial elevada que segmenta espécies únicas de dimensões microscópicas (100-200µm) como oócitos e embriões de mamíferos, permitindo detectar lipídios intactos. Essa técnica não precisa de manipulação química nem de extração de solvente, atua diretamente sobre os oócitos e embriões intactos de diversas espécies de mamíferos e de invertebrados (FERREIRA et al., 2010).

Perfis de triacilgliceróis e fosfolipídios são gerados com o uso da técnica MALDI-MS, a qual detecta íons moleculares carregados individualmente, permitindo interpretar os dados

com facilidade (SCHILLER et al., 2004). Lipídios a partir de 10-15 picomol (pmol) são detectados em embriões e oócitos com o uso de MALDI-MS, pois essa técnica é altamente sensível, além de que é sabido que o oócito bovino contém essa quantidade de fosfolipídios (KIM et al., 2001). Quando são aplicadas as medidas de massa e carga de alta precisão aumenta a acurácia da técnica, em decorrência de que os componentes complexos da mistura lipídica são resolvidos por massa e se identificam em baixas concentrações (FERREIRA et al., 2010).

Os grupos de resíduos de ácidos graxos principais em oócitos bovinos imaturos são os grupos palmíticos (16: 0), esteárico (18: 0) e oleico (18: 1), (KIM et al., 2001). Foram reportadas mudanças nos perfis de fosfatidilcolina (PC) entre oócitos e blastocistos bovinos (FERREIRA et al., 2010). Existe associação entre a maturação e fertilidade de oócitos bovinos e os resíduos graxos (KIM et al., 2001) e com o desenvolvimento embrionário em mamíferos (WATERMAN; WALL, 1988; PEREIRA et al., 2007). A crioresistência embrionária aumentou em um estudo de modulação da composição lipídica em embriões bovinos, quando foi adicionado ácido linoleico (LA) (PEREIRA et al., 2007).

Em um estudo utilizando a técnica MALDI-MS foram analisados a fosfatidilcolina, esfingomiélna e triacilglicerol em embriões bovinos individualmente e avaliado o efeito da tensão de oxigênio (alta 20% e baixa 5%) e o meio de cultivo com BSA ou soro fetal bovino sobre o perfil lipídico. Métodos de coloração e microscopia eletrônica permitiram demonstrar que o soro fetal bovino altera metabolismo embrionário (ABE; HOSHI, 2003). Foi proposto que a baixa tensão de oxigênio simula as condições fisiológicas, reduzindo o estresse oxidativo nos embriões (ORSI; LEESE, 2004). Foi encontrado que a baixa tensão de oxigênio e a suplementação com BSA favoreceram o conteúdo da fosfatidilcolina (PC), contendo o ácido graxo oleico 18: 1 (PC 36: 1) e não o ácido graxo palmítico 16: 0 (PC 34: 1) e a esfingomiélna (SM) 16: 0). Estando de acordo com outros estudos que demonstraram o efeito negativo da suplementação com ácido palmítico (16:0) na crioresistência embrionária (SHEHAB-EL- DEEN et al., 2009) e o efeito benéfico da ausência de soro fetal bovino e baixa tensão de oxigênio (ORSI; LEESE, 2004; SEIDEL, 2006).

A célula oocitária possui particularidades em relação a sua composição fosfolipídica de suas membranas e o armazenamento de triglicerídeos o qual influencia na sua criotolerância a métodos de criopreservação como à vitrificação (MEN et al., 2006; SUDANO *et al*, 2011; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013). Os meios de cultivo e a origem do embrião modificam a composição dos fosfolipídios da membrana (SUDANO et al.,

2012). O fosfolípido que foi encontrado em diferente proporção entre oócitos de fêmeas superestimuladas com hormônio folículo estimulante (FSH) e não superestimuladas foi à fosfatidilcolina [PC (34: 1) + H] +, sendo que esse fosfolípido não foi alterado pelo sistema de maturação em oócitos de vacas Nelore. Os fatores que modificaram sua proporção foram suas origens: *in vitro* ou *in vivo* e a subespécie. A fosfatidilcolina foi mais abundante *in vitro* que em *in vivo* e mais abundante em Simental que em Nelore (SUDANO et al., 2012). Entre as características que possuem esse fosfolípido constatam-se que tem somente uma insaturação e possui uma cadeia grande de carbono, a qual afeta o processo de criopreservação, por diminuir a permeabilidade das membranas (FERREIRA et al., 2010).

## **2.9 Alcances da técnica de semi-quantificação de lipídeos com uso da técnica de Sudan Black B em estudos em embriões bovinos**

Foi demonstrado com o uso da técnica de Sudan Black que o incremento do conteúdo lipídico tem uma correlação moderada entre apoptose e a vitrificação em blastocistos bovinos (SUDANO et al., 2012a).

Em outro estudo *in vitro*, foi obtida redução no número de gotículas lipídicas em embriões bovinos, ao diminuir a porcentagem de soro fetal bovino (SFB) para 2,5% ao meio de cultivo e por meio da adição de etosulfato de fenazina (PES), no dia 4 do cultivo embrionário, contudo, foi constatado que o grupo de embriões *in vivo* teve menor conteúdo de gotículas lipídicas ( $P < 0.05$ ), (SUDANO et al., 2011).

No mesmo trabalho, foi constatado que a adição de PES no meio, no dia 2.5 de cultivo embrionário, promoveu maior redução do conteúdo lipídico comparado a sua adição no dia 4. Embriões de 2 a 8 células têm maior quantidade de gotículas médias e grandes, no estágio de mórula, que é justamente o estágio onde acontece o maior acúmulo lipídico em embriões cultivados com soro fetal bovino (ABE et al., 2002).

Por outro lado, foi encontrado em blastocistos *in vivo* bovinos maior quantidade de gotículas lipídicas, na massa celular interna, quando comparada com as células trofotoderma. Já, nos embriões *in vitro* bovinos, a distribuição das gotículas lipídicas foi aleatória entre as duas linhagens celulares (SUDANO et al., 2012b).

O conteúdo lipídico dos embriões bovinos está correlacionado com a subespécie e a origem. Um estudo, onde os embriões foram corados com Sudan Black B, indicou que os embriões *in vitro* de *Bos taurus indicus* têm menor conteúdo lipídico que embriões *Bos taurus*

taurus, além disso, foi constatado que os embriões produzidos in vivo têm menor conteúdo lipídico que os embriões in vitro (SUDANO et al., 2012b).

Foi demonstrado, por meio da técnica de Sudan Black, que 5 mM (milimolar) de forskolina reduziu o conteúdo lipídico em embriões bovinos o qual foi correlacionado com maior taxa de re-expansão (71,4%) às 24 horas, comparado com o grupo controle (42, 2%) considerado este um parâmetro de sobrevivência (MENEGHEL et al., 2017).

Outra descoberta obtida pelo uso da técnica Sudan Black, foi que embriões produzidos in vivo tem maior número de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas pequenas que os embriões produzidos in vitro, e que os embriões in vitro têm maior número de gotículas lipídicas de tamanho mediano. Não foram encontradas gotículas grandes em embriões produzidos in vivo (DE LA TORRE-SANCHEZ et al., 2006).

Foi feito um estudo com o objetivo de diminuir o conteúdo lipídico em embriões, adicionando reguladores metabólicos e SFB, no qual os tratamentos foram 0.3  $\mu$ M PES; 30  $\mu$ M 2,4-dinitrophenol (DNP); 0.3  $\mu$ M PES +30  $\mu$ M de DNP; 10% SFB comparados com um grupo controle. Foi utilizada a técnica de Sudan Black para determinar o conteúdo lipídico dos embriões dos tratamentos. Foi encontrado um menor conteúdo de lipídios nos grupos PES, DNP e DNP + PES, quando comparado com o grupo SFB e controle. Os embriões do grupo controle tiveram aumento de 2 vezes e o do grupo SFB de 4.3 vezes que os embriões tratados com PES (BARCELO-FIMBRES; SEIDEL, 2007). Em um estudo onde determinaram o conteúdo lipídico em embriões cultivados em meio livre de soro, comparado com embriões cultivados com meio de cultivo de embrionário (HPM199) com soro fetal bovino, constatou-se que os embriões cultivados livres de soro tinham numerosas gotículas lipídicas pequenas em todos os estágios de desenvolvimento. Embriões de estágio de 8 células cultivados com meio de cultivo embrionário (HPM199) com soro fetal bovino, possuíam pequenas partículas sudanofílicas distribuídas em todo citoplasma de maneira aleatória, enquanto que as mórulas e blastocistos tinham muitas gotículas lipídicas grandes. No grupo HPM199 + soro fetal bovino foram observadas gotículas sudanofílicas grandes na massa celular interna (MCI) e trofoblasto e o grupo sem soro fetal bovino tinham gotículas pequenas (ABE et al., 2002)

Com a ajuda da técnica Sudan Black foram determinados o tamanho das gotículas lipídicas intracitoplasmáticas, pequenas (<2  $\mu$ m de diâmetro) e grandes ( $2 \pm 6 \mu$ m) de embriões cultivados com HPM199 + soro fetal bovino, sem soro + com células do cumulus/granulosa bovinas e sem soro e sem células do cumulus/granulosa bovinas, micrografias de luz em embriões, desde duas células até eclodidos. O número de gotículas

lipídicas grandes foi maior nos embriões cultivados com HPM199 + soro fetal bovino, fases de morula e blastocistos iniciais (ABE et al., 2002).

## **2.10 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

São detectadas diferenças ultra estruturais entre organelas de embriões produzidos in vitro quando comparadas com organelas de embriões in vivo em estádios idênticos de desenvolvimento com ajuda da microscopia eletrônica. Também foram encontradas diferenças entre organelas de embriões produzidos in vitro em função do cultivo. Entre as alterações encontradas temos o incremento de fagossomos e vacúolos citoplasmáticos nos blastômeros de embriões in vitro (GREVE; AVERY; CALLESEN, 1993). Em geral, embriões cultivados in vitro tem o citoplasma com muitas gotículas lipídicas e de aspecto mais escuro. As condições de cultivo determinaram a quantidade de gotículas lipídicas, por exemplo, em cultivos com ausência de soro fetal bovino, o número de inclusões é menor que com a substituição deste por aminoácidos e BSA (DORLAND; GARDNER; TROUNSON, 1994).

Uma das organelas que representam importância no metabolismo embrionário é a mitocôndria, na qual são detectadas diferenças nos embriões produzidos in vitro, tais como: a relação volume mitocondrial/volume citoplasmático reduzido, quando comparado com embriões in vivo (FARIN; CROSIER; FARIN, 2001). Tendo em vista que a mitocôndria realiza a maior porcentagem das reações oxidativas que resultam na produção de energia e moléculas de ATP, tais diferenças podem refletir no metabolismo dos embriões.

Outras estruturas que podem ser analisadas no citoplasma são as microgotas citoplasmáticas de lipídios, as quais possuem uma relação espacial com o retículo endoplasmático liso. Essas microgotas são fonte de elementos nutritivos, mas também influenciam as propriedades funcionais e físicas das membranas. Sugere-se que as microgotas exerçam efeito direto na sobrevivência embrionária nos processos de criopreservação (GUYADER-JOLY, 1998).

Dentro das múltiplas possibilidades que oferece a técnica de microscopia eletrônica de transmissão, tem-se a análise de alterações na zona pelúcida, nos cromossomos, nos microtúbulos e a destruição das junções gap entre o oócito e as células do cumulus. A distribuição periférica precoce e exocitose dos grânulos corticais (GC) são passíveis de serem avaliadas com microscopia eletrônica de transmissão. Essa característica induz o enrijecimento precoce da zona pelúcida, prejudicando a fecundação (FUKU; XIA;

DOWNEY, 1995). A alteração da zona pelúcida precoce causa resultados negativos na vitrificação de oócitos maturados in vitro (WU et al., 2006).

Em estudo utilizando a microscopia eletrônica de transmissão em embriões com desenvolvimento precoce (embriões de 2 células 24 horas pós-fertilização) com embriões de desenvolvimento tardio (48 pós-fertilização), as mitocôndrias eram as organelas que tiveram as principais alterações. Os embriões tardios tiveram incremento de mitocôndrias com presença de edema (RODRÍGUEZ et al., 2012). Sugere-se que esses tipos de alterações possam refletir no desenvolvimento embrionário inicial, visto que as mitocôndrias proporcionam a energia necessária para o metabolismo das células (FERREIRA et al., 2009).

A presença de edema mitocondrial é produto de uma vacuolização inicial, o qual poderia ser consequência de infiltração na organela, ficando somente remanentes de cristas mitocondriais (RODRÍGUEZ et al., 2012). O uso de soro fetal bovino em meios, ocasiona alterações nas mitocôndrias (mitocôndrias imaturas e disfunção mitocondrial) e incrementos na quantidade de vacúolos lipídicos citoplasmáticos, no entanto, essas inclusões lipídicas também estão presentes em embriões cultivados com fluido ovidutal sintético modificado (CROSIER, 2001). É proposto que as alterações na viabilidade dos embriões in vitro e danos mitocondriais têm relação com os vacúolos lipídicos (ABE; HOSHI, 2003). Rodriguez et al., (2012) não encontraram relação entre as alterações mitocondriais e o acúmulo de gotículas lipídicas, alertando que existem outros mecanismos que interferem nesse tipo de distúrbios nos embriões bovinos produzidos in vitro.

O estresse térmico por calor está relacionado a alterações mitocondriais (HANSEN; ARECHIGA, 1997; HANSEN, 2001). Encontrou-se uma maior quantidade de mitocôndrias vacuoladas em embriões bovinos produzidos in vivo, quando comparados com embriões in vitro cultivados em diferentes meios (CROSIER, 2001). Situações de estresse também originam vacúolos e edema nas mitocôndrias, tais como: isquemia (OOIE et al., 2001), estresse oxidativo (HALESTRAP; MCSTAY; CLARKE, 2002; LEMASTERS, 1999), sobrecarga de cálcio (HALESTRAP; MCSTAY; CLARKE, 2002; ICHAS; MAZAT, 1998)

hipertermia (RIVERA et al., 2003), exposição crônica ao etanol (LI et al., 2001). Foi proposto que mudanças na permeabilidade no trânsito da membrana mitocondrial ocasionado pela abertura dos poros de alta condutância da membrana interna mitocondrial que causa, conseqüentemente, um fluxo não seletivo de solutos, são produto do edema mitocondrial (ICHAS; MAZAT, 1998).

A síntese de ATP e o gradiente de prótons são bloqueados numa disfunção mitocondrial (WILLIS, 2000), em conjunto com o desdobramento das cristas mitocondriais,

além de que fatores iniciadores de apoptose podem ser liberados como o fator indutor de apoptose e o citocromo C (ICHAS; MAZAT, 1998; SUSIN et al., 1998), induzindo distúrbios no desenvolvimento embrionário. De acordo com alguns estudos, a diminuição da síntese de ATP intracelular poderia ter relação com o bloqueio da sinalização da apoptose e indução de necrose, determinando que a necrose possa ser o mecanismo mais provável de morte celular que a apoptose nesse caso (EGUCHI; SHIMIZU; TSUJIMOTO, 1997). Encontrou-se um número incrementado de vacúolos citoplasmáticos de diversos tamanhos não associados a vacúolos lipídicos (RIVERA et al., 2003).

As gotículas lipídicas diminuem durante o desenvolvimento embrionário, e estão presentes em embriões bovinos (LINARES; PLOEN, 1981; PLANTE; KING, 1994) e ovinos (FERRER et al., 1995) produzidos in vivo. O armazenamento de glicogênio poderia ser uma função desses vacúolos em oócitos bovinos (FLEMING; SAACKE, 1972). Quanto à origem desses vacúolos, sugere-se que possam ser resultado de fagocitoses de material endocelular e extracelular presentes em blastocistos in vivo bovinos (LINARES; PLOEN, 1981) e de primatas (ENDERS; SCHLAFKE, 1981). Esses vacúolos podem fusionar-se e originar vacúolos que ocupam maior tamanho no citoplasma, o qual é evidenciado em embriões bovinos submetidos a cargas elétricas (PIVKO et al., 2004). Por meio do uso da microscopia eletrônica, foi constatado que mórulas de qualidade boa tiveram microvilosidades na membrana celular e no complexo de Golgi normais, abundantes mitocôndrias e citoplasma claro, quando comparadas com mórulas de qualidade pobre, com menor quantidade de organelas e citoplasma escuro (ABE; MATSUZAKI; HOSHI, 2001).

Além das características que podem ser observadas na microscopia eletrônica de transmissão mencionadas anteriormente, é possível observar vírions no espaço intracitoplasmático. Aspectos morfológicos que indicam degeneração, produto dos vírus podem ser detectados, tais como: incremento do tamanho do núcleo e mitocôndrias, o que permite que essa técnica seja eficaz no diagnóstico de lentivírus (LEE et al., 1996), além de possibilitar a detecção de estruturas semelhantes a bactérias (PICCOLOMINI, 2010).

## REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and-fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 325–335, 1999.
- ABE, H. et al. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 1, p. 57–66, 2002.
- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced high performance serum- free media. **J. Reprod. Develop**, v. 49, p. 193-202, 2003.
- ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morule classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenoly**, v. 57, p. 1273-1283, 2001,
- AGARWAL, A. et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Theriogenology**, v. 1784, n. 1, p. 49, 2012.
- AHUMADA, C. J. et al. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 7, n. 3, p. 455–62, 2013.
- AL DARWICH, A. et al. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK $\alpha$  phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 93, n. 1–2, p. 30–36, 2010.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.
- ANTUNES, G. et al. Influence of apoptosis in bovine embryo's development. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 45 p. 26-32, 2010.
- ASCARI, I. J. et al. Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. **Domest Anim Endocrinol**. v. 60, p. 50-60.
- BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL, G.E, J. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 1395–1405, 2007.
- BERGER. et al. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 274(10), p. 6718-25,1999.
- BERGERON, L. et al. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. **Genes**

**and Development**, v. 12, n. 9, p. 1304–1314, 1998.

BRETILLON, L. et al.,. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. **Lipids**, v. 34(9), p. 965–9, 1999.

BONI, R. et al. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 4, p. 1050–1055, 1999.

BOSCA, L.; HORTELANO S. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. **Cellular signaling**, v. 11, p. 239-244, 1999.

BOTROS, L.; SAKKAS, D.; SELI, E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 12, p. 679–690, 2008.

BRISON, D. R. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: Regulation by survival factors. **Human Fertility**, v. 3, n. 1, p. 36–47, 2000.

BROKER, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: A review. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3155–3162, 2005.

BUDIHardjo, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 15, p. 269-90, 1999.

BYRNE, A. T. et al. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Reproduction**, v. 117, n. 1, p. 97–105, 1999.

CAGNONE, G. L. M. et al. Differential Gene Expression Profile in Bovine Blastocysts Resulting from Hyperglycemia Exposure During Early Cleavage Stages1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, p. 1–12, 2012.

CALDER, P. C. Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 592S–599S, 1 mar. 2012.

CANDÉ, C. et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? **J. Cell Sci.** v. 15, p. 4727-34, 2002.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; RAGA, E.; DINNYES, A.; SILVESTRE, M. A. Beneficial effect of melatonin on blastocyst in vitro production from heat-stressed bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 738-746, 2013.

CHENG, Y. et al. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. **Science**, v. 296, p. 539–541, 2002.

CHOI, Y. et al. The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **J Nutr**, v. 130(8), p. 1920–4, 2000.

- CLEMENTE, M. et al. Transcriptome Changes at the Initiation of Elongation in the Bovine Conceptus1. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 2, p. 285–295, 2011.
- CORCORAN, D. et al. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. **Reproduction**, v. 131, n. 4, p. 651–660, 2006.
- CÔTÉ, I. et al. Comprehensive cross production system assessment of the impact of in vitro microenvironment on the expression of messengers and long non-coding RNAs in the bovine blastocyst. **Reproduction**, v. 142, n. 1, p. 99–112, 2011.
- CROSIER, A E. et al. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 5, p. 1375–1385, 2001.
- CUI, Y. et al. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17830–17835, 2002.
- DANIEL, P. T.; WIDER, T.; STURM, I.; SCHULZE-OSTHOFF, K. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, 15:1022-1032, 2001.
- DE LA TORRE-SANCHEZ, J. et al. Metabolic regulation of in vitro-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate; sodium azide and 2;4- dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 597–607, 2006.
- DINNYES, A.; NEDAMBALE, T. L. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. **Reprod. Fertil. Dev**, v. 21, p. 45 – 59, 2009.
- DODE, M. A N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 145–150, 2013.
- DORLAND, M.; GARDNER, D. K.; TROUNSON, A. O. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. **J Reprod Fert**, Abstr. Ser, v.13, p. 70, 1994.
- EDIDIN, M. The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 257–283, 2003.
- EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer. Res**, v. 57, p.1835-1840, 1997.
- EJSING, C. S. et al Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 106, p. 2136 – 2141, 2009.
- ELLINGTON, J.E.; CARNEY, E.W.; FARRELL, P.B. et al. Bovine 1-2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. **Biol. Reprod**, 1990, v. 43, p. 97-104.
- ENDERS, A. C.; SCHLAFKE, S. Differentiation of the blastocyst of the rhesus monkey. **Am.**

**J. Anat**, v. 162, p. 1-21, 1981.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from *in vitro* – produced and cloned bovine embryos 1. **Reproduction**, n. April, p. 53–62, 2003.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. 1999.

FERRER, F. et al. Ultrastructural study of the early development of the sheep embryo. **Anat. Histol. Embryol**, v. 24, p. 191-196, 1995.

FERREIRA, C. R. et al. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. **The Journal of Lipid Research**, v. 51, 2010.

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

FEUGANG, J. M.; CAMARGO-RODRÍGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v. 121, n. 2–3, p. 141–149, 2009.

FLEMING, W.N.; SAACKE, R.G. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. **J. Reprod. Fertil**, v. 29, p. 203-213, 1972.

FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 9, p. 4312–7, 1997.

FOULADI-NASHTA, A. A. et al. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 10, n. 4, p. 497–502, 2005.

FROMENT, P. et al. Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1665–74, 2003.

FUCHS, B.; SCHILLER, J. MALDI-TOF MS analysis of lipids from cells, tissues and body fluids. **Subcell. Biochem**, v. 49, p. 541 – 565, 2008.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B. R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, 1995, v. 32, p. 139-56.

GAD, A. et al. Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and Their Regulation by Alternative *In Vivo* and *In Vitro* Culture Conditions 1. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 1–13, 2012.

GARDNER, D. K.; LANE, M. W.; LANE, M. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation.

**Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 3, p. 256–261, 2000.

GAWECKA et al., Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. **PLoS ONE**, v. 8 p. e56385, 2013.

GEORGE, F. et al. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. **Theriogenology**, v. 69, n. 5, p. 612–623, 2008.

GJORRET, J. O. Chronology of Apoptosis in Bovine Embryos Produced In Vivo and In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1193–1200, 2003.

GRASL-KRAUPP, B. et al. In Situ Detection of Fragmented DNA (TUNEL Assay) to Discriminate Among Apoptosis, Necrosis, and Auto Cell Death: A Cautionary Note. **Hepatology**, p. 1465–1468, 1995.

GREVE, T.; AVERY, B.; CALLESEN, H. Viability of *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim*, v. 28, p. 645-654, 1993.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GUERIF, F. et al. A Simple Approach for CONsumption and RElease (CORE) Analysis of Metabolic Activity in Single Mammalian Embryos. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

GUERIN, P, MOUATASSIM, S. EL; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 2, p. 175–189, 2001.

GUYADER-JOLY, C. Activité métabolique et aptitude à la congélation de l'embryon bovin produit *in vitro*. **Elevage et Insémination**, v. 288, p. 3-23, 1998.

HALESTRAP, A. P.; MCSTAY, G. P.; CLARKE, S. J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochim**, v. 84, p. 153-166, 2002.

HANDYSIDE, A. H.; HUNTER, S. A rapid procedure for visualizing the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. **J. Exp. Zool**, , 1984, v.231, p.429-434.

HANSEN, P. J.; ARECHIGA, C. F. Strategies for managing the heat-stressed Dairy cow. *J. Anim. Sc*, 77:36-50, 1997.

HANSEN, P. J. et al. Adverse impact of the heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, p. 91-103, 2001.

HANSHAW, R.G.; SMITH, B.D. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 5035–5042, 2005.

HAO, C. M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation promotes cell survival following hypertonic stress. *J Biol Chem*, v. 277, p. 21341–21345, 2002.

HASHEM, A. e al. Effect of potassium simplex optimization medium and NCSU23

supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids of in vitro fertilized porcine embryos. **J Reprod Dev**, v. 52(5), p. 591–9, 2006.

HIGASHIYAMA, H. et al. Expression profiling of peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  (PPAR- $\delta$ ) in mouse tissues using tissue microarray,” **Histochemistry and Cell Biology**, v. 127, no. 5, p. 485–494, 2007.

HOELKER, M. et al. Molecular signatures of bovine embryo developmental competence. **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, n. 1, p. 22–36, 2014.

HORVATH, G.; SEIDEL, G. E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin. v. 66, p. 1026–1033, 2006.

HUANG, J.-C. et al. Prostacyclin receptor signaling and early embryo development in the mouse. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 22, n. 11, p. 2851–6, 2007a.

ICHAS, F.; MAZAT, J. P. From calcium to cell death: two conformations of the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low to high-conductance state. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1366, p. 33-50, 1998.

ISPADA, J. et al. Insulin-like growth factor-I exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. **Reprod. Fertil. Dev**, v. 24, p. 209, 2011.

ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645–650, 1990.

IWASAKI, S. et al. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. **Journal of reproduction and fertility**, v. 90, n. 1, p. 279–284, 1990.

JACOBSON, M.; WEIL, M.; RAFF, M. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 347–354, 1997.

JUCHEM, S. O. et al. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 55–62, 2010.

KAUFMAN RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev**, v. 13, p. 1211-1233, 1999.

KANE, M. T. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, n. 3–4, p. 171–190, 2003.

KARAS, M.; HILLENKAMP. F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem*, v. 60, p. 2299 – 2301, 1988.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy Metabolism in Preimplantation Bovine Embryos Derived In Vitro or In Vivo. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 847–856, 2000a.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo

density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 741–756, 2000b.

KIM, J. Y. et al. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen – thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. p. 131–138, 2001.

KNIJN, H. M. et al. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived in vitro or in vivo. **Reproduction**, v. 124, n. 3, p. 365–375, 2002.

KOMAR, C. M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function - Implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1–14, 2005.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3–4, p. 463–471, 1999.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. **Human Reproduction, Oxford**, v. 13, n. 4, p. 991-997, 1998.

LAZZARI, G. et al. Cellular and Molecular Deviations in Bovine In Vitro-Produced Embryos Are Related to the Large Offspring Syndrome<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 767–775, 2002.

LEÃO, B. C. S. et al. Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro -produced bovine embryos. v. 23, n. September, p. 732–741, 2014.

LEE, W. C.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. A. Electron microscope studies of the replication of a British isolate of Maedi visna virus in macrophages and skin cell lines. **Veterinary Microbiology**, v. 49, p. 93-104, 1996.

LEESE, H. J. Quiet please, do not disturb: A hypothesis of embryo metabolism and viability. **BioEssays**, v. 24, n. 9, p. 845–849, 2002.

LEESE, H. J. et al. Embryo viability and metabolism: Obeying the quiet rules. **Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 3047–3050, 2007.

LEESE, H. J. et al. Metabolism of the viable mammalian embryo: Quietness revisited. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 12, p. 667–672, 2008.

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

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 81–94, 1993.

LEVY, R. et al. Annexin V labelling and terminal transferase-mediated DNA end labelling (TUNEL) assay in human arrested embryos. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 8, p. 775–783, 1998.

- LI P, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v. 91, p. 479-489, 1997.
- LINARES, T.; PLOEN, L. On the ultrastructure of seven day old normal (blastocysts) and abnormal bovine embryos. *Zentralbl. Vet. Med. C. Anat. Histol. Embryol*, v.10, p. 212-226, 1981.
- LIM, H. et al. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPAR $\delta$ . **Genes and Development**, v. 13, n. 12, p. 1561–1574, 1999.
- LIOU, J. Y. et al. Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  mediated 14-3-3 upregulation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 7, p. 1481–1487, 2006.
- LONERGAN, P. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Reproduction**, v. 117, n. 1, p. 159–167, 1999.
- LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 137–152, 2006.
- LONERGAN, P. A. et al. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development* p. 861–868, 2007.
- MAGDER, S. Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? **Critical Care**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2006.
- MAKAREVICH, A. V.; MARKKULA, M.. Apoptosis and proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. In: **Biol. Reprod.**, 2002, vol. 66, p. 386-392, 2002.
- MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M et al., The nuclear receptor superfamily: the second decade, **Cell**, v. 83, no. 6, p. 835–839, 1995.
- MARTINO, N. A.; DELL’AQUILA, M. E.; CARDONE, R. A.; SOMOSKOI, B.; LACALANDRA, G. M.; CSEH, S. Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reproduction Biology and Endocrinology*, v. 3, p. 11-27, 2013.
- MATEUSEN, B. et al. Porcine embryo development and fragmentation and their relation to apoptotic markers: A cinematographic and confocal laser scanning microscopic study. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 443–452, 2005.
- MATHIEU, J. et al. Apoptose et rayonnement gamma. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 57, p. 314-323, 1999.
- MATWEE, C.; BETTS, D. H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote** v. 8, p. 57-68, 2000.
- MENEGHEL, M. et al. Lipid content and cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 395–400, 2017.

- MEIYU, Q.; LIU, L.; ROTH, Z. IGF-I slightly improves nuclear maturation and cleavage rate of bovine oocytes exposed to acute heat shock in vitro. **Zygote**, v. 23, n. 4, p. 514-524, 2014.
- MEN, H. et al. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology**, v. 66 (8), p. 2008–16, 2006.
- MOHAN, M. et al. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 692–700, 2002.
- MONTAG, M. et al. Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1738–1744, 2000.
- MOVASSAG, M.; FOO, R. S. Simplified apoptotic cascades. **Heart Fail Rev**, v. 13, p. 111-119, 2008.
- MUCCI, N. et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. v. 65, p. 1551–1562, 2006.
- MUNDIM, T. C. D. et al. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 1398–1407, 2009.
- MURAKAMI, M. et al. Effects of centrifugation and lipid removal on the cryopreservation of in vitro produced bovine embryos at the eight-cell stage. **Cryobiology**, v. 36, n. 3, p. 206–12, 1998.
- NABENISHI, H. et al. The role of mitochondrial transition pores on bovine oocyte competence after heat stress, as determined by effects of cyclosporin A. **Mol. Reprod. Dev**, v. 79, p. 31-40, 2012.
- NAISMITH, J. H. ; SPRANG, S. R. Modularity in the TNF-receptor family. **Trends Biochem Sci**. 1998;23:74-79.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 21–34, 2000.
- OHLWEILER, L. U. et al. Intracytoplasmic sperm injection improves in vitro embryo production from poor quality bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 778–783, 2013.
- OHSHIMA, H.; BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutation research**, v. 305, n. 2, p. 253–264, 1994.
- OOIE, T et al. Single dose of geranylgeranylacetone induces heat-shock protein 72 and renders protection against ischemia/ reperfusion injury in rat heart. **Circulat**, v. 104, p. 1837-1843, 2001.
- ORSI, N. M.; LEESE, H. J. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. **Theriogenology**, v. 61, p. 561 –

572, 2004.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209–222, 1992.

PARTRIDGE A, R. J.; LEESE, H. J. Consumption of amino acids by bovine preimplantation embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 6, p. 945–950, 1996.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1169–1177, 2002.

PEREIRA, R. M. et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (10*t*,12*c* CLA). **Anim. Reprod. Sci.**, v. 98, p. 293 – 301, 2007.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, v. 9, p. 267–277, 2008.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2–3, p. 83–94, 2004.

PICCOLOMINI, M. M. Alterações na Morfologia e na Viabilidade no Desenvolvimento de Embriões Bovinos Fecundados *in vitro* com Sêmen Exposto Experimentalmente à *Escherichia coli* Produtora da Toxina Shiga Stx2 (STEC). Dissertação de mestrado. Instituto Biológico, 2010.

PLANTE, L.; KING, W. A. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. **J. Assist. Reprod. Genet**, v. 11, p. 515-529, 1994.

PLOURDE, D. et al. Contribution of oocyte source and culture conditions to phenotypic and transcriptomic variation in commercially produced bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 116–131, 2012.

PURSEL, V. G.; WALL, R. J.; REXROAD, C. E. et al. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. **Theriogenology**, v.24, p.687-691, 1985.

REN, B. et al. Polyunsaturated Fatty Acid Suppression of Hepatic Fatty Acid Synthase and S14 Gene Expression Does Not Require Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha^*$ . v. 272, n. 43, p. 26827–26832, 1997.

RIEGER, D. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 75–93, 1992.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234–248, 2002a.

RIZOS, D. et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: Implications for blastocyst quality. **Biology**

**of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 589–595, 2002b.

RIZOS, D. et al. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236–243, 2003.

RIVERA, R. M. et al. Alterations in Ultrastructural Morphology of Two-Cell Bovine Embryos Produced *in vitro* and *in vivo* Following a Physiologically Relevant Heat Shock. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 2068–2077, 2003.

ROBERTS, L. D. et al. A matter of fat: an introduction to lipidomic profiling methods. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, v. 871, p. 174 – 181.

RODRÍGUEZ, Y. U. et al Estudio ultraestructural de embriones bovinos *in vitro* durante el desarrollo temprano y tardío. **Revista Científica**, v. 22, n. 3, p. 201 – 210, 2012.

ROUTLEDGE, M. N. et al. DNA sequence changes induced by two nitric oxide donor drugs in the supF assay. **Chem Res Toxicol**, v. 7, n. 5, p. 628–632, 1994.

SALLUSTIO, B. C. Chapter 3 Glucuronidation-Dependent Toxicity and Bioactivation. **Advances in Molecular Toxicology**, v. 2, n. C, p. 57–86, 2008.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, n. 1, p. 317–340, 2005.

SAWADA, H.; YAMAZAKI, K.; HOSHI, M. Trypsin- like hatching protease from mouse embryos: Evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. **Journal of Experimental Zoology**, v. 254, n. 1, p. 83–87, 1990.

SCHMIDT, M. et al. Ultrastructure of *in vitro* matured bovine oocytes after controlled freezing in 10 % glycerol. v. 4320, 1995.

SCHILLER, J. et al. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog. Lipid Res.*, v. 43, p. 449 – 488, 2004.

SEIDEL, G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 228–235, 2006.

SELI, E. et al. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 5, p. 1350–1357, 2007.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fine Structure of Bovine Blastocyst Develops Either in Serum-Free Medium or in Conventional Co-Culture With Oviduct Epithelial Cells. v. 316, p. 307–316, 1994.

SHEN, S. M. et al. Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells. **Carcinogenesis**, v. 31(3), p. 419–26, 2010.

SHI, Y.; HON, M.; EVANS, R. M. The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an

integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2613–8., 2002.

SIQUEIRA, L. G. B. . J. F. F.; VIANA, L. S. A. C. J. H. M. Factores que afectan a la fecundación in vitro en bovinos. **Spermova**, v. 2, n. 1, p. 10–12, 2012.

SPRÍCIGO, J. F. W. et al. Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. **PLOS ONE**, 2015.

STROH, C. et al. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 12, p. 1651–1653, 2002.

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

SUDANO, M. J. et al. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro -produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, p. 124–131 2012a.

SUDANO, M. J. et al. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts . v. 87, p. 1–11, 2012b.

SUSIN, S. A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, p. 441-446, 1999.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. **The Journal of reproduction and development**, v. 58, n. 1, p. 1–9, 2012.

TAMURA, H. et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 328–343, 2009.

TATA, A. et al. Optimal single-embryo mass spectrometry fingerprinting. n. February, p. 844–849, 2013.

THOMPSON, J. G. et al. Lamb Birth Weight is Affected by Culture System Utilized during in Vitro Pre-Elongation Development of Ovine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1385–1391, 1995.

THOMPSON, J. G. et al. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Reproduction**, v. 106, p. 299–306, 1996.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 2008, v. 9, p. 112 – 124.

VISINTIN, J. A. et al. Cryopreservation of *bos taurus* vs *bos indicus* embryos: Are they really different? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 345–359, 2002.

WILLIS, W. T.; JACKMAN, M. R.; BIZEAU, M. E.; PAGLIASSOTTI, M. J.; HAZEL, J. R. Hyperthermia impairs liver mitochondrial function *in vitro*. **Am J Physiol**, v. 278, p. 1240-1246, 2000.

WOOD, J. R. et al. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 2, p. 705–713, 2007.

WU, C. et al. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 73, p. 1454-62, 2006.

XU, J. et al. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 23577–83, 1999.

YUAN, Y. et al. Heat shock at the germinal vesicle breakdown stage induces apoptosis in surrounding cumulus cells and reduces maturation rates of porcine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 70, p.168-178, 2008.

WATERMAN , R. A.; WALL, R. J. Lipid interactions with *in vitro* development of mammalian zygotes. *Gamete Res*, v. 21, p. 243 – 254, 1988.

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Mol Reprod Dev**, v. 61, p. :271–8, 2002.

ZIMMERMAN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 92, p. 57-70, 2001.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS****ARTICLE 1 - DOES THE ACTIVATION OF PEROXISOME PROLIFERATOR-  
ACTIVATED RECEPTORS IMPROVE THE DEVELOPMENT OF BOVINE  
EMBRYOS PRODUCED *in vitro*?****A ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE  
PEROXISSOMA MELHORA O DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS  
PRODUZIDOS *In vitro*?**

Jesús Alfonso Sánchez Viafara<sup>1</sup>, Renata Maculan<sup>2</sup>, Gisvani Lopes de Vasconcelos<sup>2</sup>, Nadja Gomes Alves<sup>2</sup>, Marcos Brandão Dias Ferreira<sup>3</sup>, Mariana Aragão M. Donato<sup>4</sup>, Mateus José Sudano<sup>5</sup>, Gisele Zoccal Mingoti<sup>6</sup>, Giovana Barros Nunes<sup>6</sup>, José Camisão de Souza<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; <sup>2</sup>Department of Animal Science, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil; <sup>3</sup>EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>4</sup>Aggeu Magalhães Research Center, Fiocruz, Recife, Pernambuco, Brazil; <sup>5</sup>Federal University of ABC, Santo André, São Paulo, Brazil; <sup>6</sup>Laboratory of Reproductive Physiology, UNESP -Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Department of Animal Science, Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. \*E-mail: jcamisao@dzo.ufla.br.

**ARTIGO REDIGIDO CONFORME A NORMA DO PERIÓDICO JOURNAL  
THERIOGENOLOGY.**

## ABSTRACT

**The aim of this study** was to evaluate the effect of addition of L-165041 (selective agonist of PPAR $\delta$ ) and of docosahexaenoic fatty acid (DHA) in the embryo culture medium on metabolism and embryonic development. **Materials and methods:** day 1 presumptive zygotes (control group n = 609; DHA group n = 611; and L165041 group n = 608) were randomly allocated for embryo culture. The cleavage rate was evaluated on day 2 (D2) and blastocyst production on day 7 (D7). Embryos were fixed for TUNEL on D7. **Results:** Blastocyst production on D7 was high in the control and L-165041 groups compared with the DHA group ( $P < 0.05$ ). The proportion of ICM cells was greater, and the total apoptosis and ICM rates were lower in the L-165041 group compared to the control and DHA groups ( $P < 0.05$ ). For its part, the DHA group had a lower proportion of ICM and higher total apoptosis and ICM rates compared to the control ( $P < 0.05$ ). In the DHA group, the mitochondria exhibited signs of cell stress, and various cells exhibited intense vacuolization. In conclusion, the use of L-165041 in IVC is recommended, and the use of DHA in the IVC for bovine embryos should be avoided.

**Keywords:** blastocyst, apoptosis, L-165041, DHA, bovine.

## Introduction

The lower viability of embryos produced through *in vitro* embryo production (IVP) compared to those obtained *in vivo* is the result of a combination of morphological changes that include reduction of inner cell mass (ICM) in relation to trophoctoderm and blastomere extrusion (Crosier et al., 2001). There are also metabolic changes, such as a smaller number of cells, an increase in the apoptotic index, an increase in lipid content (Sudano et al., 2011), high thermal sensitivity (Leibo and Loskutoff, 1993), high DNA methylation (Salilew-Wondim et al., 2015), the occurrence of chromosome abnormalities (Viuff et al., 1999), and an increase in

the metabolism of energy substrates (Khurana and Niemann, 2000), which lead to a lower survival rate (Rizos et al., 2002).

Long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the n-3 series (for example, alpha linolenic - ALA, eicosapentaenoic - EPA, and docosahexaenoic - DHA) and n-6 series (linoleic - LA and arachidonic - AA) change the signaling pathways and cell metabolism, regulation of gene expression, and lipid composition in various tissues, such as the adipose, cardiac, cerebral, and hepatic tissue (reviewed in Sampath and Ntambi, 2005). The steroid regulatory element-binding proteins (SREBP), liver X receptors (LXR), and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) may be regulated by the metabolites of the PUFAs that regulate gene transcription. They may also inhibit positive regulation of the target genes of the nuclear factor kappa Beta (NFκB) (Calder, 2012). In addition, non-mutually exclusive mechanisms were proposed through which the DHA can modify cell function, such as eicosanoid metabolism, protein trafficking, changes in lipid peroxidation, change in membrane structure, and D-resolvin signaling and synthesis (Stulnig, 2003).

The n-3 PUFAs change the lipid composition of the membrane, increasing its fluidity, which promotes the formation of lipid rafts involved in cell signaling. In addition, the n-3 PUFAs act through membrane free fatty acid receptors, such as the 1 and 4 free fatty acid receptor (FFAR1 and FFAR4), activating their signaling pathways (Miyamoto et al., 2016). Nevertheless, the direct effect of DHA on plasmatic membrane organization is little known (Shaikh and Edidin, 2006). Yet, it is known that phospholipids composed of DHA have a particular structure that can modify the organization of the lipid rafts in the cell membranes (Stillwell and Wassall, 2003), classified as transient microdomains rich in sphingolipids and cholesterol, which share signaling events (Edidin, 2003).

In mouse, goat, and human embryos, activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta (*PPARδ*), a transcription factor expressed in the ICM and in the trophectoderm

in the initial phase of development and during pre-implantation, reduces the apoptotic index (Grunert et al., 2014) and increases cell proliferation and embryo development (Huang et al., 2007; Pakrasi and Jain, 2007). Expression of the *PPAR $\delta$*  gene has been reported in bovines in diverse tissues, such as the lungs, rumen, liver, adipose tissue, and mammary cells (Bionaz et al., 2013); however, it has not yet been reported in bovine embryos. The L-165041, a phenoxyacetic acid derivative, is a potent and selective synthetic agonist of *PPAR $\delta$*  (Seimandi et al., 2005). Addition of L-165041 in *in vitro* culture media increased the implantation rate in transfer of mouse embryos (Huang et al., 2003, 2007).

Based on the above, it is possible that activation of the PPAR transcription factors reduces the apoptotic index and increases cell proliferation, resulting in improvement in the development and quality of bovine embryos produced *in vitro*. Thus, the present study was conducted to evaluate the effect of addition of L-165041 (selective agonist of *PPAR $\delta$* ) and of DHA (non-specific agonist of *PPAR $\alpha$* ) in the embryo culture medium in regard to embryonic development, intracytoplasmic lipid accumulation, ultrastructure and apoptosis.

## **Materials and methods**

Bovine ovaries were collected from a commercial slaughterhouse (Belo Horizonte, Brazil) predominantly from cows of undefined breed (July to September of 2017). The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the use of animals of the Universidade Federal de Lavras, protocol no. 012/16.

### ***Oocyte maturation and embryo production by in vitro fertilization (IVF)***

Bovine ovaries were collected from the slaughterhouse and transported within the period of 1 h to the laboratory in physiological saline solution (0.9% NaCl) at 37°C. The cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated from antral follicles with 3 to 8 mm

diameter. The COCs (1828) were placed in the washing medium TCM-199 HEPES (Gibco 1234 0030) with the addition of 10% SFB (Gibco 12657029), 22 µg/mL pyruvate (Sigma P5280), and 83.4 µg/mL amikacin (Amikacin Sulfate, Nova Farma). After that, the COCs (n = 1910) under went *in vitro* maturation (IVM) for 24 hours at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air, in microdrops of 90 µL of IVM medium covered with mineral oil. The IVM medium was composed of TCM-199 bicarbonate (Gibco 1234 0030) with the addition of 10% SFB, 0.5 µg/mL Folltropin-V FSH (Bioniche), 5 g/mL LH Lutropin-V (Bioniche), 10 µg/mL estradiol (Sigma E2758), 22 µg/mL pyruvate, and 83.4 µg/mL amikacin. At the end of the maturation period, *in vitro* fertilization (IVF) was performed (IVF, day 0) for 18 to 22 hours at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> in air and saturated humidity in FERT-TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate) medium, supplemented with 83.4 µg/mL amikacin sulfate, 27 µg/mL penicillamine (Sigma P4875), 1 µg/mL hypotaurine (Sigma H1384), 0.3 µg/mL epinephrine (Sigma E4250), 22 µg/mL pyruvate, 5µg/mL bovine serum albumin (BSA; Sigma A3803), and 10µg/mL heparin (Sigma H4149). All fertilizations were performed with semen from the same collection from a Gir breed bull after selection of motile spermatazoids by the Percoll (Sigma P1644) discontinuous density gradient technique(Parrish et al., 1995).

### ***In vitro embryo development***

Presumptive zygotes (control group n = 609; DHA group n = 611; and L165041 group n = 608) were denuded of cumulus cells with the use of a micropipette and randomly distributed in microdrops containing 100 µL Synthetic Oviduct Fluid Medium (SOFaa; Holm et al. 1999) with the addition of 2.5% SFB, 22 µg/mL pyruvate, 5 µg/mL BSA, and 83.4 µg/mL amikacin and covered with mineral oil. The L-165041 and the DHA were added to the culture medium at a final concentration of 1 µM diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Huang et al., 2007; Al Darwich et al., 2010).

The final concentration of DMSO used as a diluent of L-165041 and of DHA was 0.008%, and this same concentration of DMSO was added to the control group. *In vitro* culture (IVC) was performed for 7 days at 38.5°C at 5% CO<sub>2</sub> and 5% atmospheric O<sub>2</sub>. The cleavage rate was evaluated on day 2 (D2) and was calculated in relation to the number of matured oocytes. The blastocyst production rate was evaluated on day 7 (D7) and calculated in relation to the number of cleaved embryos.

### **Inner cell mass quantification and embryo apoptosis index (TUNEL)**

Embryos collected on D7 were simultaneously analyzed by immunofluorescence to quantify the ICM and by Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nickend Labeling (TUNEL; DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Promega, Madison, WI, USA) to quantify the cells in apoptosis with fragmentation of DNA (TUNEL positive). Fresh early blastocysts, blastocyst, expanded blastocyst of the control (n = 21), DHA (n = 16), and L-165041 (n = 21) groups were subjected to the TUNEL reaction for identification of apoptotic cells. The embryos on D7 were washed in PBS-PVA and fixed in 4% paraformaldehyde at ambient temperature for one hour and stored at 4°C in microtubes with 250 µL of PBS-PVA. The embryos were washed three times for 5 min in PBS with 0.3% Triton X-100. They were then blocked with 5% normal goat serum (NGS, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR) for 30 min and incubated with the primary antibody anti-SOX2, rabbit IgG (1:200, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) overnight in the refrigerator. The next day, the embryos were washed three times in 0.3% PBS -Triton X-100 for 5 min and were incubated with the secondary antibody cy3 rabbit anti-IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluted 1:600 in 0.01% PBS-Triton X-100 for 1 hour at 37°C in a humidity chamber. After that, the embryos were washed with PBS and then subjected to TUNEL analysis using the DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System kit (Promega, Madison, WI, USA). Three more washings were

then performed with 0.01% PBS-Triton before adding 0.1% 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 5 minutes for the purpose of marking the cell nuclei. The confocal microscope Leica TCSSP5II (Wetzlar, Germany) was used, with a 20X objective to capture images. Total number of cells, inner cell mass cells, and apoptotic cells were quantified using LAS AF software (2.6.3, Leica Microsystems, Germany). The number of SOX-2 positive cells (ICM cells) and TUNEL positive cells (cells in apoptosis) was calculated in relation to the total number of cells stained by DAPI. The proportion of TUNEL positive cells contained in the ICM was also determined.

#### ***Semi-quantitative intracellular lipid content by Sudan Black B staining***

Blastocyst samples (D7) of the control (n = 11), DHA (n = 13), and L-165041 (n = 12) groups were randomly selected during the replications of the experiment and stained with Sudan Black B lipophilic dye (Sigma 199664). The embryos were previously fixed in 4% formaldehyde for 2 hours at ambient temperature and then washed in PBS and stored in microtubes with 250  $\mu$ L of PBS-PVA in a refrigerator at 4°C up to the time of analysis. Staining procedures were carried out following the method described by Paschoal et al., 2017. The embryos were transferred to drops of 50% ethanol in distilled water for 2 min and then deposited in drops containing 1% Sudan Black B (w/v) diluted in 70% ethanol for 2 min. They were then washed three times in 50% ethanol for 5 min each and, after that, in distilled water with the addition of 1% PVP. The embryos were mounted on drops of 10  $\mu$ L glycerol on slides and then examined under an inverted light microscope (IX51, Olympus, Tokyo, Japan). The images were photographed (Figure 1) and analyzed by the program Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., version 5.0.1.26) after gray scale conversion. The embryos were delimited to obtain area ( $\mu\text{m}^2$ ) and mean of gray intensity (arbitrary units), allowing gray intensity to be calculated by area (arbitrary units/ $\mu\text{m}^2$ ). The control group was

chosen as calibrator and the value of each treatment was divided by the mean of the calibrator to generate the relative level of abundance.

### **Ultrastructural characteristics of embryos cultured *in vitro***

Expanded blastocyst cultured *in vitro* with 1  $\mu$ M DHA, with 1  $\mu$ M L165041, and control group that had a grade 1 were selected for analysis in a transmission electron microscope (TEM). Three blastocysts per treatment were fixed in Karnovsky solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2) for 4 h at ambient temperature (approximately 25°C). After fixation, the embryos were maintained in sodium cacodylate buffer for up to 15 days at ambient temperature and were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide, and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 h at ambient temperature. The embryos were then washed in sodium cacodylate buffer and counterstained with 5% uranyl acetate. The samples were dehydrated through an ascending acetone series, which begins with a 30% acetone solution, followed by a 60% acetone solution, a 90% solution, and finally a 100% solution. Then the samples were incorporated in epoxy resin (Epoxy-Embedding Kit, Fluka Chemika-BioChemika). After that, they were cut into semi-thin sections (2  $\mu$ m), stained with toluidine blue, and analyzed by an optical microscope with 400X magnification. Based on this evaluation, regions were selected where it was possible to observe trophoblast and embryoblast cells. Ultra-thin sections (70 nm), obtained from the semi-thin sections, were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined under an electron microscope (Fei Tecnai, Spirit model). At least three embryos from each group were used for TEM analysis. The ultrastructural parameters evaluated were density and integrity of the membranes and cytoplasmic organelles of the trophoblast and embryoblast cells and the degree of cytoplasmic vacuolization.

### *Experimental design*

A randomized block experimental design was used; each block was an IVP routine. A pool of blastocysts was chosen at random, from among the 11 replications made in the experiment, for TUNEL and immunocytochemical analysis, Sudan Black B staining and Ultrastructural characteristics of embryos cultured in vitro.

### *Statistical analysis*

Statistical analyses were performed by generalized mixed linear models in which the effect of the collection day (block) was considered random. For the variables referring to countings, such as the total number of cells, Poisson distribution and the log link function were considered. For variables expressed in rates (such as the rate of cleaved embryos in relation to the number of COCs, the rate of blastocysts in relation to the number of cleaved embryos, the rate of total apoptosis and of the ICM, and the proportion of ICM cells) binomial distribution and the logit link function were used. When the effect of the treatments was significant, the Dunnett test was applied, comparing the 1  $\mu$ M L-165041 and 1  $\mu$ M DHA treatments in relation to the control. Statistical difference at 5%.

## **Results**

### *Embryo development*

The cleavage rate was not affected ( $P > 0.05$ ) by the addition of L-165041 and of DHA in the IVC medium (Table 1). Nevertheless, blastocyst production on D7 was less in the DHA group compared to of the control and L-165041 groups. Blastocyst production did not differ ( $P > 0.05$ ) between the control and the L-165041 groups.

### *Apoptosis*

The number of cells per embryo was greater ( $P < 0.05$ ) in the DHA group (Table 2) compared to the control and L-165041 groups, which did not differ from each other ( $P > 0.05$ ). However, the proportion of ICM cells was higher and the total apoptosis and in the ICM apoptosis rates were lower in the L-165041 group compared to the control and DHA groups ( $P < 0.05$ ). The DHA group had a lower proportion of ICM and higher total apoptosis and in the ICM apoptosis rates compared to the control and L-165041 groups ( $P < 0.05$ , Table 2).

#### *Semi-quantitative lipid content study*

The lipid content of the blastocysts did not differ ( $P > 0.05$ ) among the DHA, L-165041, and control groups (Table 3). Representative photomicrographs of embryos stained with Sudan Black are shown in Figure 2.

#### *Ultrastructural characteristics of in vitro cultivated embryos*

Two ultrastructurally distinct cell types were observed in all the groups, the trophoblastic epithelium in contact with the zona pellucida and the inner cell mass of the embryo arranged in an organized and polarized manner. Embryonic architecture was preserved in all the groups, which was expected, since only embryos classified grade 1 were selected for ultrastructural evaluation, and significant embryo fragmentation was not observed in any of the samples. There was no change among groups considering the cells of the inner embryonic mass, which exhibited irregular formats, forming a well-defined cell mass, with nuclei of irregular chromatin; and possible intracytoplasmic vesicles were found, with evident lysosomes and lipid droplets. The main differences observed among groups were related to trophoblastic cells.

In the control group, the trophoblastic cells exhibited mitochondria , with a spherical or ovoid shape and with few visible cristae in the center of the organelle, but dispersed at the cell periphery instead. Some lipid droplets could be seen, and lysosomes were seen in all cells of the trophoblast. The zona pellucida was found to be whole, surrounding the embryo. Microvilli appeared in the perivitelline space.

In the group cultured with DHA, a certain degree of cell degeneration was observed, an aspect that had not been observed in the semi-thin sections before electron microscope analysis. Mitochondria were reduced in number and exhibited dilation of the mitochondrial cristae, as well as their distortion. Visible and significant vacuolization was observed in inner cell mass cells and trophoblastic cells. In the inner cavity, cell fragmentation could be seen, and various cells exhibited visible and significant vacuolization when we compare this group to the control group. The microvilli, when present, appeared in smaller number.

The group treated with L164604 exhibited embryonic architecture quite similar to the control group, with lysosomes, nuclei, lipid vesicles, and other organelles with integrity similar to that of the control group. Microvilli were present in large number and quite developed in the outer membrane of the trophoblast. The mitochondria exhibited a certain degree of immaturity,; there was a high degree of dilated mitochondria, with an interior notably without cristae, which appeared, above all, on the periphery of the organelle.

## **Discussion**

In the present study, the total apoptotic and in the ICM apoptosis rates were lower in the blastocysts cultured with 1  $\mu$ M of L-165041. In addition, a higher proportion of ICM was observed compared to the embryos of the control group and DHA group, similar to results obtained in other species (Huang et al., 2007). In mouse embryos, a positive effect of activation of *PPAR $\delta$*  was observed in reduction of apoptosis in blastocysts cultured with the

same concentration of L-165041 used in the present study (Grunert et al., 2014). In other studies performed on mice, the addition of 1  $\mu\text{M}$  of L-165041 to the culture medium decreased the apoptotic index (Grunert et al., 2014; Chauhan et al., 2013), whereas greater concentrations (10  $\mu\text{M}$ ) increased cell proliferation (Huang et al., 2007).

In this study, supplementation of the culture medium with DHA, which exhibits high affinity for *PPAR $\alpha$*  (Forman et al., 1997; Huang, 2008), did not improve embryo development (blastocyst rate), (Table 1) and did not increase the proportion of ICM cells or reduce apoptosis (Table 2). Corroborating the results of this study, Al Darwich et al. (2010), supplementation DHA did not observe improvement in blastocyst production on D7. In the same way, the addition of DHA at a higher concentration (2.5  $\mu\text{M}$ ) during IVC (Mifsud et al., 2012) did not improve the quality or the production of blastocysts in mice, although the rate of development from morula to blastocysts was greater in the embryos cultured with DHA. Low molecular weight toxic products, such as aldehydes and products of oxidative peroxidation of polyunsaturated fatty acids such as DHA, within the membrane phospholipids, are formed and are prone to attack from ROS, due to their high degree of unsaturation. In addition, they have mutagenic effects (Feng et al., 2006). This may explain the lower proportion of ICM cells in the embryos cultured with DHA (C22:6) compared to the control group and the L-165041 group.

In addition, the apoptosis index in total cells and in the ICM was greater in the DHA group, which may be explained by the effect of the PUFA, which includes DHA, in the increase in ROS production, such as the hydroxyl radical and peroxynitrite. These substances are toxic to cells because they reduce cell antioxidant capacity and stimulate lipid peroxidation, leading to damage in cell membrane structure, which brings about changes in the fluidity and synthesis of proteins of the membrane, increasing apoptosis (Kanno et al., 2004; Ježek and Hlavatá, 2005) Furthermore, the addition of DHA in IVM at the same

concentration used in the present study (1  $\mu$ M DHA) resulted in an increase in the rate of bovine blastocysts and in the number of cells per blastocyst (Oseikria et al., 2016). Thus, the addition of DHA in the culture may have a negative effect on embryonic development.. The addition of DHA in IVM benefits modulation of the cell membrane for permeability of the lipid bilayer (Stillwell et al., 1993, 1997).

The negative results obtained in the present study through the addition of DHA may also be explained by biophysical studies conducted with liposomes, which proposed a model in which the molecules of the lipid rafts prevent molecular interaction with the phospholipids containing DHA (Shaikh et al., 2002, 2004, 2006; Soni et al., 2008). Due to the particularity of DHA in the structure of lipid rafts, signal transduction may be compromised, altering cell function, which helps explain the results of lower embryonic development and proportion of the ICM and greater apoptosis index.

The number of cells per embryo increased in blastocysts cultured with 1  $\mu$ M DHA in the present study. This is a contradictory result because it can be interpreted as a positive effect of DHA on cell proliferation. Nevertheless, it should be considered that the proportion of ICM cells in the blastocysts was lower in the DHA group. In addition, the total number of cells includes both healthy cells and cells in apoptosis, which could explain the greater number of cells per embryo in the DHA group, taking into consideration that in this group a higher rate of total apoptotic cells and of ICM was observed.

The ICM of the blastocysts cultivated *in vitro* is susceptible to oxidative apoptosis (Brison and Schultz, 1997; Schratt et al., 2004). The ICM can be protected from apoptosis through activation of *PPAR* $\delta$  with (prostacyclin) PGI<sub>2</sub>, a natural ligand. The activation of this transcription factor provokes up regulation of the 14-3-3 $\epsilon$  gene, which sequesters the phosphorylated BAD (member of the BCL-2 family that regulates apoptosis) through PDK-1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1) and Akt (Protein kinase B), (Zha et al., 1996;

Datta et al., 1997). This mechanism can explain the lower percentage of total apoptosis and apoptosis in the ICM and the greater proportion of ICM cells in the embryos cultured with L-165041. The apoptosis rates of the total cells of the embryo and of the ICM are considered markers of embryo quality, which, for their part, can be used as a morphological criterion to predict the viability of the embryo (Betts and King, 2001; Fouladi-Nashta et al., 2005; Korhonen et al., 2010). One of the most important characteristics of viability and post-implantation development is the adequate ratio of cell lines, i.e., trophoctoderm and inner cell mass (Iwasaki et al., 1990; Koo et al., 2002; Knijn, 2003), since both lines are essential for embryo development (Hardy et al., 1989; Van Soom et al., 1997). It has been shown that activation of the *PPAR $\delta$*  stimulates cell proliferation, which may be due to regulation in expression of the 14-3-3 $\epsilon$  gene. The proteins synthesized from expression of this gene are considered support for a large number of proteins, such as receptors and signaling molecules (Tzivion and Avruch, 2002).

In the present study, the lipid droplet content was not different among the treatments. The *PPAR $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$*  activate the transcription of genes that participate in the homeostasis of glucose and lipids (Desvergne and Wahli, 1999; Kersten et al., 2000). Nevertheless, the *PPAR $\delta$*  has the particular characteristic of repressing the transcriptional activities of the *PPAR $\alpha$*  and of the *PPAR $\gamma$*  mediated by co-repressors recruited by the *PPAR $\delta$* . For their part, it is assumed that the *PPAR $\alpha$*  and the *PPAR $\gamma$*  are not able to join with the nuclear receptor co-repressors SMRT and NCoR in the element responsible for PPAR (PPARE) in the DNA (Zamir et al., 1997). Thus, it is possible that the addition of L-165041 (specific activator of the *PPAR $\delta$* ) in the culture medium repressed the transcription of genes involved in the homeostasis of the lipids through repression of *PPAR $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$* , not allowing differences to be observed in lipid content in relation to the control. It may be that DHA, which is a non-specific activator of the three PPAR isotopes (Germain et al., 2006), likewise activated

*PPAR $\delta$* , which repressed the transcriptional activities of *PPAR $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$* , resulting in blockage of the homeostasis of the lipids. That would explain the absence of differences between the control group and the DHA group (Table 3).

In reference to TEM analysis performed in the study groups, we found particularities in the embryos cultured with DHA, which had a reduced number of mitochondria, and their cristae were dilated and distorted. According to Rieger et al., 1998, operation of the mitochondria is linked to potential development of the embryo, and mitochondrial changes exhibited in this group may hinder its development. The internal organization of the mitochondria could not be compared to the forms observed by Crosier et al., 2001, which leads us to believe that the presence of DHA in the culture medium was responsible for this change. In addition, there were microvilli present in the embryos of this group, but in smaller number than those observed in the control group. According to Shamsuddin and Rodriguez-Martinez, 1994, bovine blastocysts produced *in vitro* have shorter microvilli and in smaller number, and they may have reduced absorption capacity. In the study of Crosier et al. (2001), blastocysts produced *in vitro* also exhibited microvilli that were not very developed, and suggested that the reduction or incapability of producing microvilli in sufficient number is related to low quality embryos.

According to Plante and King, 1994, certain characteristics may appear (or reappear) during bovine embryo development, such as microvilli and lysosomes/phagosomes, and others may disappear, such as lipid droplets and cortical granules. These modifications are part of embryo maturation, and in embryos arising from *in vitro* fertilization, they may occur at a later time. Thus, the presence alone of such ultrastructural characteristics cannot be a definitive diagnosis of embryo quality, but rather a suggestion of morphological changes that can compromise embryo development.

In conclusion, the addition of 1  $\mu\text{M}$  of L-165041 increases the proportion of ICM cells and reduces the total apoptotic index and that of the ICM. In a contrary manner, the addition of 1  $\mu\text{M}$  of DHA reduces embryo development and the proportion of ICM cells and increases the total apoptotic rates and that of the ICM. Therefore, the use of L-165041 in IVC is recommended, in IVC for bovine embryos under the conditions of the present study.

### **Acknowledgments**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. The Cenatte Embriões company, Pedro Leopoldo, MG, also supported this research by sponsoring the production of the embryos in their research laboratory.

### **References**

- Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T and Hoshi H** (1999) Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and- fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development* **53** 325–335.
- Baguisi, A; Lonergan, P; Overstrom, EW; Boland M** (1999) Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology* **51** 162.
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JCM et al.** (1998) Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes and Development* **12** 1304–1314.
- Betts DH and King WA** (2001) Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* **55** 171–191.
- Bionaz M, Chen S, Khan MJ and Loor JJ** (2013) Functional Role of PPARs in Ruminants:

Potential Targets for Fine-Tuning Metabolism during Growth and Lactation.

*Physiological and Nutritional Roles of PPAR across Species* **2013** 28.

**Brisson DR and Schultz RM** (1997) Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* **56** 1088–1096.

**Calder PC** (2012) Mechanisms of Action of (n-3) Fatty Acids. *The Journal of Nutrition* **142** 592S–599S.

**Crosier a E, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE and Farin CE** (2001) Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction* **64** 1375–1385.

**Al Darwich A, Perreau C, Petit MH, Papillier P, Dupont J, Guillaume D, Mermillod P and Guignot F** (2010) Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK $\alpha$  phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **93** 30–36.

**Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME** (1997) Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*, **91** 231–241.

**Desvergne B and Wahli W** (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews* **20** 649–688.

**Edidin M** (2003) The State of Lipid Rafts: From Model Membranes to Cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **32** 257–283.

**Feng Z, Hu W, Marnett LJ and Tang M shong** (2006) Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **601** 125–

136.

- Forman BM, Chen J and Evans RM** (1997) Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** 4312–4317.
- Fouladi-Nashta AA, Alberio R, Kafi M, Nicholas B, Campbell KHS and Webb R** (2005) Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive BioMedicine Online* **10** 497–502.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar M a, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ and Gronemeyer H** (2006) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacological Reviews* **58** 760–772.
- Grunert G, Dunn R, Huang JC, Schenk L, Chauhan S and Wun WS** (2014) Prostacyclin Agonist (L165041) Enhances Embryos Survival after Vitrification and Warming. *Fertility and Sterility* **101** e15–e16.
- Guerin, P, Mouatassim S El and Menezo Y** (2001) Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update* **7** 175–189.
- Hardy K, Handyside A and Winston R** (1989) The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development* **107** 597–604.
- Huang JC** (2008) The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the development and physiology of gametes and preimplantation embryos. *PPAR Research* **2008**.
- Huang JC, Wun WSA, Goldsby JS, Wun IC, Falconi SM and Wu KK** (2003) Prostacyclin enhances embryo hatching but not sperm motility. *Human Reproduction* **18** 2582–2589.

**Huang JC, Wun WSA, Goldsby JS, Wun IC, Noorhasan D and Wu KK (2007)**

Stimulation of embryo hatching and implantation by prostacyclin and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activation: Implication in IVF. *Human Reproduction* **22** 807–814.

**Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S and Nakahara T (1990)** Morphology and

proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility* **90** 279–284.

**Ježek P and Hlavatá L (2005)** Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in

cell, tissues, and organism. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **37** 2478–2503.

**Kanno T, Sato EF, Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Utsumi T, Inoue M and Utsumi**

**K (2004)** Oxidative stress underlies the mechanism for  $Ca^{2+}$ -induced permeability transition of mitochondria. *Free Radical Research* **38** 27–35.

**Kersten S, Desvergne B and Wahli W (2000)** Roles of PPARs in health and disease. *Nature*

**405** 421–424.

**Khurana NK and Niemann H (2000)** Energy Metabolism in Preimplantation Bovine

Embryos Derived In Vitro or In Vivo. *Biology of Reproduction* **62** 847–856.

**Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A and Watanabe T (2004)** Effects of oxygen concentration

and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* **62** 1186–1197.

**Knijn HM (2003)** Consequences of In Vivo Development and Subsequent Culture on

Apoptosis, Cell Number, and Blastocyst Formation in Bovine Embryos. *Biology of Reproduction* **69** 1371–1378.

**Koo D-B, Kang Y-K, Choi Y-H, Park JS, Kim H-N, Oh KB, Son D-S, Park H, Lee K-K**

- and Han Y-M** (2002) Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biology of Reproduction* **67** 487–492.
- Korhonen K, Kananen K, Ketoja E, Matomäki J, Halmekytö M and Peippo J** (2010) Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals* **45** 42–49.
- Leibo SP and Loskutoff NM** (1993) Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* **39** 81–94.
- Miyamoto J, Hasegawa S, Kasubuchi M, Ichimura A, Nakajima A and Kimura I** (2016) Nutritional signaling via free fatty acid receptors. *International Journal of Molecular Sciences* **17** 1–12.
- Moley KH, Chi MMY, Knudson CM, Korsmeyer SJ and Mueckler MM** (1998) Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nature Medicine* **4** 1421–1424.
- Oseikria M, Elis S, Maillard V, Corbin E and Uzbekova S** (2016) N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental competence in cattle. *Theriogenology* **85** 1625–1634.e2.
- Pakrasi PL and Jain AK** (2007) Evaluation of cyclooxygenase 2 derived endogenous prostacyclin in mouse preimplantation embryo development in vitro. *Life Sciences* **80** 1503–1507.
- Parrish JJ, Krogenaes A and Susko-Parrish JL** (1995) Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* **44** 859–869.
- Paschoal DM, Sudano MJ, Schwarz KRL, Maziero RRD, Guastali MD, Crocomo LF, Magalhães LCO, Martins A, Leal CLV and Landim-Alvarenga F da C** (2017) Cell

apoptosis and lipid content of in vitro–produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology* **87** 108–114.

**Plante L and King WA** (1994) Light and Electron Microscopic Analysis of Bovine Embryos Derived by in Vitro and in Vivo Fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **11** 515-29.

**Polidori\* MC, Praticó\* D, Parente B, Mariani E, Cecchetti R, Yao Y, Sies H, Cao P, Mecocci P and Stahl W** (2007) Elevated Lipid Peroxidation Biomarkers and Low Antioxidant Status in Atherosclerotic Patients with Increased Carotid or Iliofemoral Intima Media Thickness. *Journal of Investigative Medicine* **55** 163.

**Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A GF** (1998) The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity , nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* **112** 123–130.

**Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP and Lonergan P** (2002) Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* **61** 234–248.

**Salilew-Wondim D, Fournier E, Hoelker M, Saeed-Zidane M, Tholen E, Looft C, Neuhoff C, Besenfelder U, Havlicek V, Rings F et al.** (2015) Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts developed in vivo from embryos completed different stages of development in vitro. *PLoS ONE* **10** 1–31.

**Sampath H and Ntambi JM** (2005) Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism. *Annual Review of Nutrition* **25** 317–340.

**Schratt G, Philippar U, Hockemeyer D, Schwarz H, Alberti S and Nordheim A** (2004) SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic

development. *EMBO Journal* **23** 1834–1844.

**Seimandi M, Lemaire G, Pillon A, Perrin A, Carlavan I, Voegel JJ, Vignon F, Nicolas**

**JC and Balaguer P** (2005) Differential responses of PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ , and PPAR $\gamma$  reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Analytical Biochemistry* **344** 8–15.

**Shaikh SR and Edidin M** (2006) Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T

cells, and antigen presentation. *The American Journal of Clinical Nutrition* **84** 1277–1289.

**Shaikh SR, Brzustowicz MR, Gustafson N, Stillwell W and Wassall SR** (2002)

Monounsaturated PE does not phase-separate from the lipid raft molecules sphingomyelin and cholesterol: Role for polyunsaturation? *Biochemistry* **41** 10593–10602.

**Shaikh SR, Dumauval AC, Castillo A, LoCascio D, Siddiqui RA, Stillwell W and Wassall**

**SR** (2004) Oleic and docosahexaenoic acid differentially phase separate from lipid raft molecules: A comparative NMR, DSC, AFM, and detergent extraction study.

*Biophysical Journal* **87** 1752–1766.

**Shaikh SR, Cherezov V, Caffrey M, Soni SP, LoCascio D, Stillwell W and Wassall SR**

(2006) Molecular organization of cholesterol in unsaturated phosphatidylethanolamines: X-ray diffraction and solid state<sup>2</sup>H NMR reveal differences with phosphatidylcholines.

*Journal of the American Chemical Society* **128** 5375–5383.

**Shaikh SR, Rockett BD, Salameh M and Carraway K** (2009) Docosahexaenoic Acid

Modifies the Clustering and Size of Lipid Rafts and the Lateral Organization and Surface Expression of MHC Class I of EL4 Cells. *The Journal of Nutrition* **139** 1632–1639.

**Shamsuddin M and Rodriguez-Martinez H** (1994) Fine Structure of Bovine Blastocyst

Develop Either in Serum-Free Medium or in Conventional Co-Culture With Oviduct

Epithelial Cells. *Zentralbl Veterinarmed A* **316** 307–316.

**Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnyés**

**A, Nagai T and Kikuchi K** (2007) Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* **55** 115–126.

**Soni SP, LoCascio DS, Liu Y, Williams JA, Bittman R, Stillwell W and Wassall SR**

(2008) Docosahexaenoic acid enhances segregation of lipids between raft and nonraft domains: 2H-NMR study. *Biophysical Journal* **95** 203–214.

**Van Soom A, Ysebaert MT and De Kruif A** (1997) Relationship between timing of

development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* **47** 47–56.

**Stillwell W and Wassall SR** (2003) Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids* **126** 1–27.

**Stillwell W, Ehringer W and Jensi LJ** (1993) Docosahexaenoic acid increases

permeability of lipid vesicles and tumor cells. *Lipids* **28** 103–108.

**Stillwell W, Jensi L, Thomas C. F and Ehringer W** (1997) Effect of docosahexaenoic

acid on mouse mitochondrial membrane properties. *Lipids* **32** 497–506.

**Stulnig TM** (2003) Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: Mechanisms and

effects. *International Archives of Allergy and Immunology* **132** 310–321.

**Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado S, Carlos L, Magalhães O, Crocomo LF, Lima-neto**

**JF De and Landim-alvarenga FC** (2011) Lipid content and apoptosis of in vitro - produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification.

*Theriogenology* **75** 1211–1220.

- Tzivion G and Avruch J** (2002) 14-3-3 Proteins: Active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **277** 3061–3064.
- Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H and Thomsen PD** (1999) A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biology of Reproduction* **60** 1273–1278.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW and Oh KS** (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)* **13** 998–1002.
- Zamir I, Zhang J and Lazar MA** (1997) Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes and Development* **11** 835–846.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J and Korsmeyer SJ** (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87** 619–628.

Table 1. Effect of 1  $\mu$ M of L-165041 and 1  $\mu$ M of DHA supplementation during *in vitro* culture on embryo development.

Parameter	CIV + DMSO	CIV + 1 $\mu$ M de DHA	CIV + 1 $\mu$ M de L-165041
COCs (n)	609	611	608
Cleavage (n)	450	437	441
Cleavage %	75.5 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	73.1 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	74.1 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>
Blastocyst yield, D7 (%)	49.1 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>	41.3 $\pm$ 6,2 <sup>b</sup>	51.8 $\pm$ 6.3 <sup>a</sup>

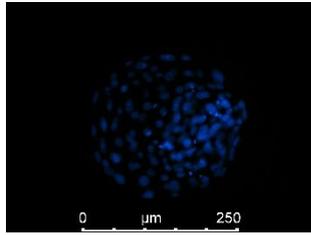
Within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ )

Table 2. Effect of 1  $\mu$ M L-165041 and 1  $\mu$ M of DHA supplementation during *in vitro culture* on embryo development on d 7, total number of cells, percentage of apoptotic cells and percentage of inner cell mass (ICM) in bovine fresh early blastocysts, blastocyst, expanded blastocyst.

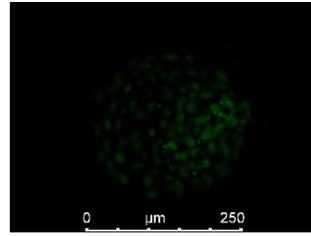
Variables	CIV + DMSO (n)	CIV + 1 $\mu$ M de DHA	CIV + 1 $\mu$ M de L-165041
No. embryos	21	16	21
Total no. cell	87.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	102.8 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	90.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>
% ICM	57.0 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	39.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	61.9 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>
% Apoptotic cells	9.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	11.7 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	5.9 $\pm$ 0.5 <sup>c</sup>
% Apoptotic in ICM	11.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	15.9 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>	7,4 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>

Within a column, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ )

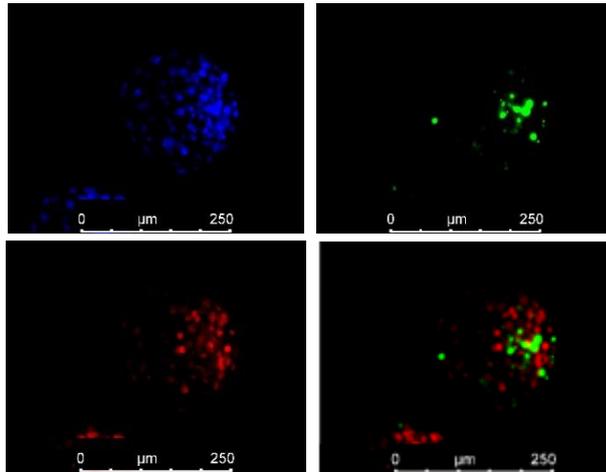
**Negative control**



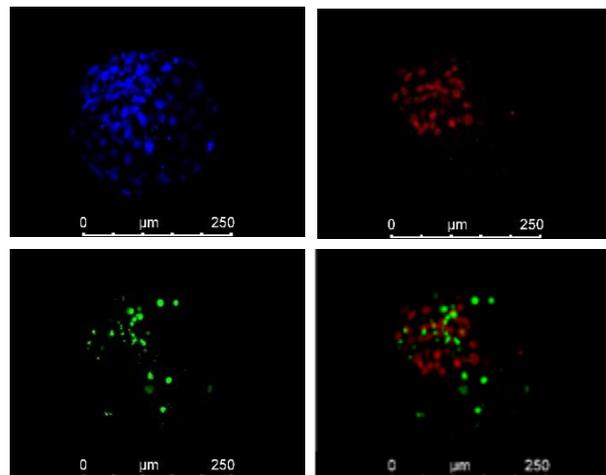
**Positive control**



**Control**



**DHA**



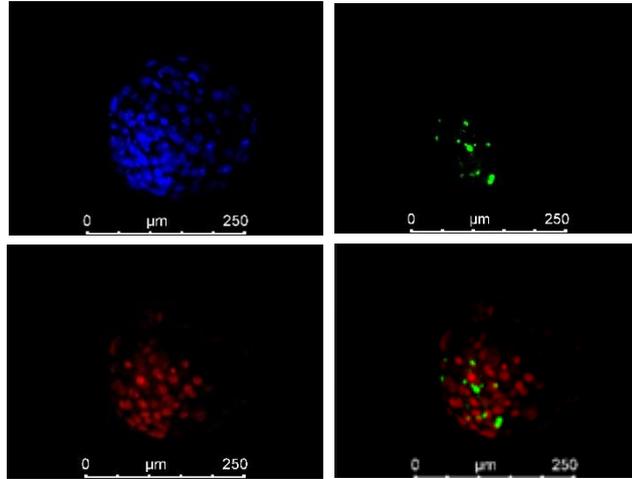
**L-165041**

Fig. 1. Representative embryos of each group in which the number of TUNEL-positive cells was determined. Green nuclei fluorescence (TUNEL) was considered with fragmented DNA. DAPI stained all healthy and apoptotic cells with the blue nuclei fluorescence. SOX-2 stained of red the cell of the internal cell mass. The green and red was used for determined the apoptotic cells of the internal cell mass. At 200X magnification. Observations: control, DHA and L-165041group.

Table 3. Effect of 1  $\mu\text{M}$  L-165041 and 1  $\mu\text{M}$  of DHA supplementation during *in vitro* culture on cytoplasmic lipid content expressed by gray intensity, gray intensity per area (gray intensity  $\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$ ), and gray intensity per area divided by the mean of the calibrator group control (relative lipid content).

Variables	CIV + DMSO	CIV + 1 $\mu\text{M}$ DHA	CIV + 1 $\mu\text{M}$ L-165041
No. embryos	11	13	12
Gray intensity	70.6 $\pm$ 4.8	67.8 $\pm$ 2.7	60.9 $\pm$ 4.2
Gray intensity $\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$	13.2 $\pm$ 1.1	11.2 $\pm$ 0.4	10.8 $\pm$ 0.8
Relative lipid content	1.0 $\pm$ 0.07	0.8 $\pm$ 0.03	0.8 $\pm$ 0.02

The data are presented as mean  $\pm$  SEM.

No difference was observed between treatments ( $P > 0.05$ )

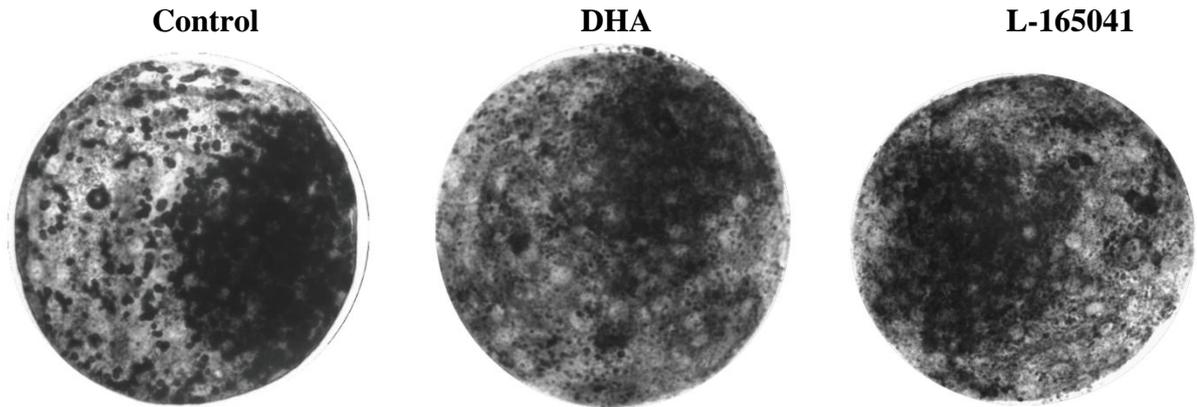
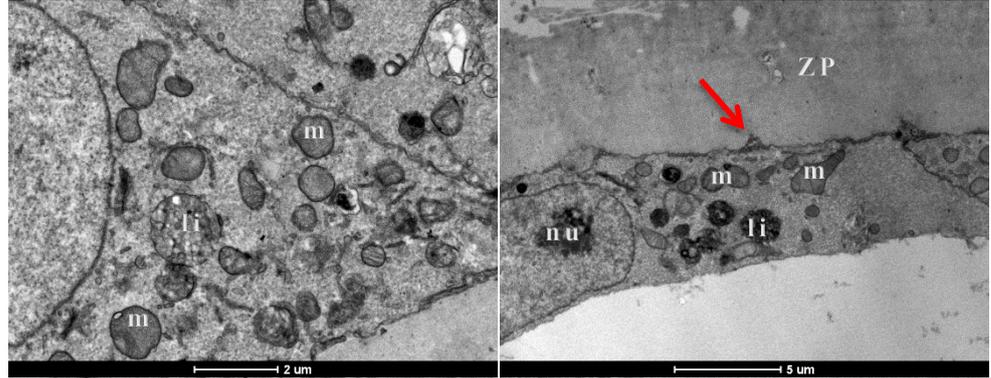
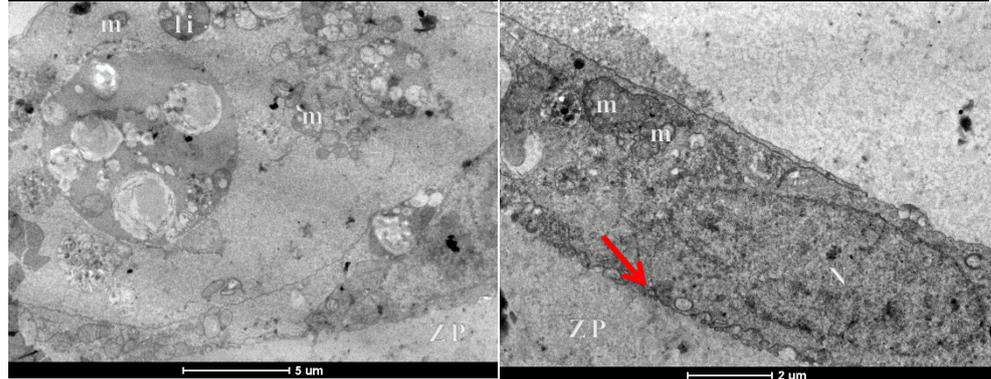


Fig. 2. Light micrographs of control, DHA and L-165041 embryos stained with Sudan black B. Black areas indicate sudanophilic cytoplasmic lipid droplets. 40 x magnification. Images converted to gray scale. Original magnification 3600; bar =50  $\mu$ m.

CONTROLE



DHA



L164604

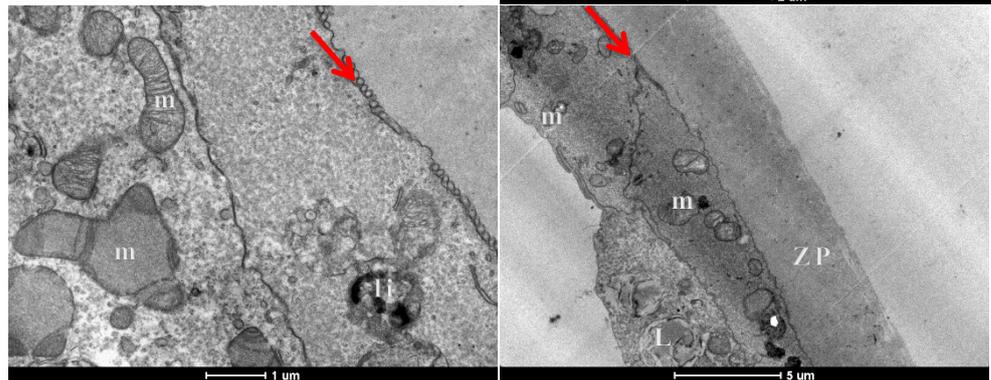


Fig. 3. Ultrastructural characteristics of cultured blastocysts in vitro. SUBTITLES:  
 ZP - zona pellucida, M-mitochondria, N-nucleus, Nu- Nucleolus, Li-lysosomes, L-vesicular  
 lipid, Arrow – microvilli.

**ARTIGO 2 - A ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES ATIVADOS POR  
PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA MELHORA A CRIOTOLERANCIA DE  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *in vitro*?**

**DOES THE ACTIVATION OF RECEPTORS ACTIVATED BY PEROXISOME  
PROLIFERATORS IMPROVE THE CRYOTOLERANCE OF BOVINE EMBRYOS  
PRODUCED *in vitro*?**

Jesús Alfonso Sánchez Viafara<sup>1</sup>, Nadja Gomes Alves<sup>2</sup>, Renato Ribeiro de Lima<sup>3</sup>, Roberti Martins Drumond<sup>3</sup>, Raphael Nunes dos Santos<sup>3</sup>, Marcos Nogueira Eberlin<sup>4</sup>, Fernanda Negrao<sup>4</sup>, Marcos Brandao Dias Ferreira<sup>5</sup>, Jasmin<sup>6</sup>, José Camisão de Souza<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Estatística, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil; <sup>4</sup>Cenatte Embriões, Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil; <sup>5</sup> Universidade Estadual de Campinas, Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, Campinas, São Paulo, Brasil; <sup>6</sup>EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil; NUMPEX-Bio, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil<sup>6</sup>. \*E-mail: jcamisao@dzo.ufla.br.

**ARTIGO REDIGIDO CONFORME A NORMA DO PERIÓDICO REPRODUCTION,  
FERTILITY AND DEVELOPMENT.**

## Abstract

The effect of addition of L-165041 and of docosahexaenoic acid (DHA) in embryonic culture was analyzed in regard to metabolism and post-vitrification survival. The eclosion rate of warming embryos of the treatments and their lipid profile were evaluated by the MALDI-MS technique. The apoptosis rate was analyzed by the TUNEL assay. The total apoptosis and inner cell mass rates were reduced ( $P < 0.05$ ) in the L-165041 group compared to the DHA and control group. The eclosion rates from 24 h to 72 h after devitrification were greater ( $P < 0.05$ ) in the L-165041 group compared to the control group, and from 24h, 48 h, 60h and 72h compared to the DHA group. A relative abundance of protonated phosphatidylcholine [PC (34:2) + H]<sup>+</sup> and oxidized [PC (36:1) + H]<sup>+</sup> in the L-165041 group was found compared to the control group. The DHA group had relative abundance ( $P < 0.05$ ) of protonated PC (32:0) compared to the control group. Our study indicates that the addition of 1  $\mu$ M of L-165041 in the culture medium decreases apoptosis, and increases post-vitrification embryonic survival.

**Keywords:** Embryonic cryotolerance, apoptosis, L-165041, DHA, bovines.

## Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) se expandiu mundialmente, no entanto, ainda existem dificuldades em alguns aspectos tais como: a criopreservação, decorrente da alta susceptibilidade de embriões *in vitro* a essa técnica (George et al., 2008), sendo bem documentada a existência de diferenças de viabilidade entre embriões *in vitro* e *in vivo* (Van Wagtendonk-de Leeuw et al., 2000).

Um dos parâmetros de maior acurácia na predição de sobrevivência embrionária após aquecimento é a taxa de apoptose. Uma vez que esse parâmetro é usado para determinar a qualidade embrionária que irá refletir-se na taxa de prenhez (Sudano et al., 2011). A composição adequada dos meios de cultivo otimiza a viabilidade para obter uma maior

crioresistência (Kitagawa et al., 2004). Embriões PIVE exibem alta incidência de células apoptóticas, que estão associados a anomalias morfológicas (Hardy et al., 1989; Bergeron et al., 1998).

Em embriões de camundongos, cabras e humanos, a ativação do *PPAR $\delta$* , um fator de transcrição expresso na massa celular interna (MCI), e no trofotoderma na fase inicial de desenvolvimento e durante a pré-implantação, diminuíram o índice apoptótico, além de incrementarem a proliferação celular e o desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, aumentando a crioresistência, a taxa de eclosão e prenhez (Huang et al., 2007; Pakrasi and Jain, 2007; Grunert et al., 2014). Em estudos prévios em embriões de camundongo, o cultivo com 1 $\mu$ M de L-165041 aumentou a taxa de eclosão, (Huang et al., 2003, 2007; Grunert et al., 2014).

A família biologicamente ativa de ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFA n-3) está composta pelo ácido alfa linoleico (C18:3 n-3, ALA) o qual é precursor do ácido eicosapentaenoico (EPA) e do ácido docosahexaenoico (DHA) (Siriwardhana et al., 2012). O DHA é o n-3 com maior atividade biológica, que é o ácido graxo mais longo dessa família, com uma cadeia de 22 carbonos (C22:6), produto de uma serie de alongamento e elongações do ALA ou EPA, não obstante as taxas dessas bioconversões serem baixas nos mamíferos (Plourde and Cunnane, 2007).

Em nível molecular, os PUFAs modulam a transcrição gênica através de fatores de transcrição, tais como: o receptor ativado por proliferadores de peroxissomas alfa e gamma (*PPAR $\alpha$* , *PPAR $\gamma$* ), proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (*SREBPF1*, 3) e o fator nuclear kappa B (*NF $\kappa$ B*), regulando, dessa forma, a expressão dos genes alvo (Sampath et al, 2005).

Não obstante pouco se sabe sobre o efeito do DHA na modificação da organização das membranas plasmáticas. A bicamada lipídica das membranas celulares tem em sua

composição PUFAs n-3, o qual proporciona fluidez e promove a formação de rafts lipídicos, melhorando, dessa forma, as vias de sinalização atuando, portanto, sobre sensores e receptores, além de melhorar a criotolerância embrionária (Seidel, 2006). Esses efeitos foram demonstrados no incremento das taxas de clivagem e em tendências de incremento das taxas de produção de blastocistos, a causa de suplementação destes na dieta de vacas (Moallem et al., 2013; Zachut et al., 2010).

Neste artigo, foi hipotetizado que a ativação do PPARs via adição de L-165041 ativador específico do *PPAR $\delta$*  ou DHA ativador inespecífico do *PPAR $\alpha$*  no cultivo de embriões bovinos, aumenta a proliferação celular e diminui o índice apoptótico, além de melhorar a sobrevivência embrionária pós-criopreservação. Para isso, foi analisado o efeito dos tratamentos no meio de cultivo sobre a apoptose pós-vitrificação, a taxa de eclosão das 12h às 72h pós-criopreservação e as modificações do perfil lipídico.

## **Material e métodos**

Todos os procedimentos do experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Lavras, protocolo n°012/16. Os ovários foram coletados de vacas abatidas num frigorífico comercial de bovinos (Frigorífico Hiper Carnes, com predominância de ovários de vacas mestiças) e transportados para o laboratório em solução salina fisiológica (0,9% NaCl) a 37°C. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma, caso contrário será indicado.

### *Produção embrionária*

Folículos antrais (3 a 8 mm de diâmetro) foram aspirados utilizando uma seringa de 10 mL acoplada a agulha de calibre 40G. O fluido aspirado foi colocado em placas de petri contendo meio de lavagem: TCM-199 bicarbonato (Gibco®, Invitrogen Co., Grand

Island, NY, USA) suplementado com 10% de SFB, 22µg/mL de piruvato (P5280 Sigma®), 83,4µg/mL de amicacina (Sulfato de Amicacina – Nova Farma®). Utilizou-se um estereoscópio para realizar o rastreamento dos oócitos. Em seguida, selecionaram-se os oócitos de boa qualidade com mais de três camadas compactas de células do cumulus e citoplasmas homogêneos e foram lavados três vezes em meio de lavagem. Após a seleção, os COCs foram lavados uma vez em meio de maturação: TCM-199 bicarbonato (Gibco®, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de SFB, 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-V®, Bioniche Inc, Belleville, ON, Canada), 5g/mL de hormônio luteinizante (LH), (Lutropin-V®, Bioniche Inc, Belleville, ON, Canada), 10µg/ml de estradiol (E2758 Sigma®), 22µg/mL de piruvato (P5280 Sigma®), 83,4µg/mL de amicacina (Sulfato de Amicacina – Nova Farma®). Os COCs (n=1909) foram transferidos a gotas, contendo 80 µL de meio MIV cobertos por óleo mineral em placas de Petri de 60 x 16 mm, por 24 horas a 38,5°C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico, com 95% de umidade. Depois da MIV, os oócitos foram submetidos à fertilização *in vitro* (FIV; Day 0). Foi usado sêmen de um único touro da raça Gyr da mesma partida. As palhetas de sêmen foram descongeladas à temperatura de 37°C por 30 segundos. Seguidamente, 250 µL de sêmen foram adicionados no tubo eppendorf® e realizado o gradiente de densidade descontínua de Percoll (Biodux, Campinas, Brasil) com 250 µL de solução 45% e 250 µL de solução 90%, centrifugado durante cinco minutos a 5500 rotações por minuto (rpm) em temperatura ambiente. O sedimento recuperado (70 µL) foi suspenso num tubo eppendorf® com 70 µL volume/volume (v/v) de meio de capacitação espermática TALP-Sêmen (*Tyrode's-albumina-lactato-piruvato*) previamente estabilizado em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 38°C. O eppendorf® contendo os espermatozoides no TALP- SEMEN foi centrifugado novamente por 1 minuto a 5500 rpm. Essa lavagem foi repetida duas vezes, descartando o sobrenadante. 100 µL do precipitado foram ressuspensos em 100 µL (v/v) de meio FIV (FERT- Tyrode's albumin lactate pyruvate TALP),

suplementado com amicacina (83,4µg/mL), penicilamina (27µg/mL), hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), piruvato (22µg/mL), albumina sérica bovina (5µg/mL) e heparina (10µg/mL). A FIV foi realizada entre 18 a 22 horas a 38,5°C em 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada em gotas de 40 µL cobertas com óleo mineral. Subsequentemente, foi realizado o desnudamento das células do COCs dos presumíveis zigotos com micropipeta e submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) em gotas de 100 µL de meio Synthetic Oviduct Fluid Medium (SOFaa) adaptado de Holm et al., 1999, suplementado com 2,5% de SFB, 22µg/mL de piruvato, 5mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 83,4µg/mL de amicacina cobertos por óleo mineral. O DHA e o L-165041 foram diluídos em DMSO (0,008%) e adicionados ao meio de cultivo a uma concentração final de 1 µM. No grupo controle, utilizou-se apenas DMSO (0,008%). Os presumíveis zigotos foram divididos em partes iguais entre os grupos controle e o grupo DHA. O cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado a 38,5°C a 5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> atmosférico. A clivagem foi avaliada no dia 2 (D2) e a produção de blastocistos no dia 7 (D7).

### *Vitrificação*

Foi utilizada a técnica two-step para a vitrificação dos blastocistos, no grupo controle foram vitrificados 98, do grupo DHA 76 e 111 blastocitos do grupo L-165041. Blastocistos grau 1, 2 e 3 foram lavados em solução de manutenção (SM) (TCM 199 Gibco + 20% SFB) e transferidos para a solução de vitrificação SV1 (7,5% etileno glicol + 7,5% DMSO em TCM 199 Hepes), durante 3 min. Posteriormente, os embriões foram transferidos para a solução de vitrificação SV2 (18% etilenoglicol + 18% DMSO + 0.4 M sacarose em TCM 199 Gibco) durante 30 seg. Após esse período, os embriões foram colocados em Cryotop® em grupos de 3 a 5 blastocistos e imersos imediatamente em nitrogênio líquido.

### *Aquecimento*

Os Cryotop®, contendo os embriões de todos os tratamentos, foram retirados do nitrogênio líquido e mergulhados na solução de aquecimento 1 (DV1), composta por SM + 1 M de sacarose, durante 5 min, e transferidos para a solução de aquecimento 2 (DV2) composta por SM + 0,5 M de sacarose durante 1 min. Posteriormente, os embriões foram lavados duas vezes em gotas de SM, para posterior análise da criotolerância.

### *Imunocitoquímica e TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase uracil nick end labeling)*

Blastocistos expandidos que foram vitrificados dos grupos controle (n= 12), DHA (n= 12) e L-165041 (n= 12) em D7 e aquecidos e recultivados por 24 horas, foram fixados em paraformaldeído a 4%, durante uma hora, à temperatura ambiente e armazenados a 4°C em microtubos com 250 µL de PBS-PVA. Análises de imunocitoquímica, foram realizadas para quantificar a MCI e de Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nickend Labeling (TUNEL), para quantificar as células em apoptose com fragmentação do DNA (TUNEL positivas). Os mesmos embriões foram utilizados para a realização das duas análises. Os embriões foram lavados três vezes por 5 min em PBS com 0,3% de Triton X-100. Após as lavagens foi realizado o bloqueio com 5% de soro normal de cabra (NGS, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, BR), durante 30 min e incubadas com o anticorpo primário anti-SOX2, IgG de coelho (1:200, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), durante toda a noite na geladeira. No dia seguinte, os embriões foram lavados três vezes em 0,3% PBS -Triton X-100, durante 5 min e foram incubados com o anticorpo secundário cy3 anti-IgG de coelho (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluído 1:600 em PBS-Triton X-100 a uma concentração de 0,01%, por 1 hora a 37 °C em câmara úmida. Posteriormente, os embriões foram lavados com PBS e, então, submetidos à análise de TUNEL, utilizando o kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, EUA). Seguidamente,

foram realizadas três novas lavagens com PBS-Triton 0,01%, antes da adição de 0,1% de 4'-diaminidino-2-phenylindole (DAPI), por 5 minutos, com o objetivo de marcar os núcleos celulares. Foi utilizado o microscópio confocal leica TCSSP5II (Wetzlar, Alemanha), utilizando objetiva de 20x para a capturar das imagens. A quantificação do número total de células, células da massa celular interna e células apoptóticas foram realizadas, usando software LAS AF (2.6.3, Leica Microsystem, Alemanha). O número de células positivas, para SOX-2 (células da MCI) e para TUNEL (células em apoptose), foram calculados em relação ao número total de células coradas pelo DAPI. Também foi determinada a proporção de células TUNEL positivas contidas na MCI.

#### *Lipid Analysis by Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry MALDI-MS*

##### *Preparação das amostras*

Foi realizada a técnica *MALDI-MS* numa amostra que foi coletada dos embriões aquecidos, para analisar sua composição fosfolipídica. Após a desvitrificação, os embriões foram re-cultivados em meio CIV, durante 24 horas, nas mesmas condições do cultivo *in vitro*. Posteriormente, foram lavados três vezes em PBS, livre de cálcio e magnésio e armazenados em palhetas de 0,25 mL em PBS livre de cálcio e magnésio, as quais foram congeladas e armazenadas imediatamente em nitrogênio líquido até posterior análise. No momento da análise, as amostras foram desvitrificadas em temperatura ambiente, e os embriões foram lavados cinco vezes em solução 50% metanol/H<sub>2</sub>O miliq. Foi colocado cada embrião em um único spot, na placa de MALDI, sobre esteromicroscópio. Posterior à secagem das amostras, foi depositado 1 µL de 1,0 M de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) diluído em solução metanol (70%) com 0,1% de ácido fórmico sobre cada embrião e secados à temperatura ambiente. Os dados foram adquiridos pelo espectrômetro de massas Autoflex

III, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF), (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha).

#### *Aquisição e Processamento de Dados MALDI-MS*

Dados MALDI-MS e MALDI-MS / MS foram adquiridos nos modos ion positivo e reflectron, utilizando um espectrômetro de massa de tempo de voo Autoflex III MALDI (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com tecnologia laser de feixe inteligente. Os dados MS foram adquiridos na faixa de 700-1200 m / z (massa carga), com uma média de 1.500 disparos a laser consecutivos, com uma frequência de 200 até sinais dos espectros serem obtidos . A Dessorção / Ionização por Laser Assistida por Matriz em Espectrometria de Massa em série (MALDI-MS / MS) foi adquirida, manualmente, aumentando a energia de colisão até que uma dissociação extensa do íon precursor fosse observada. O argônio foi usado como o gás de colisão. Os dados do perfil de lipídeos MS foram pré-processados por Flex Analysis (software 3.4 Bruker Daltonics) incluindo subtração da linha de base, alisamento e alinhamento de espectros. O algoritmo SNAP (Procedimento de anotação numérica sofisticada) foi aplicado para gerar uma lista de massas monoisotópicas. Os dados foram normalizados por soma e escalonados automaticamente. Os dados pré-processados foram convertidos em arquivos .csv (Macintosh), para posterior análise estatística.

Referente à análise da composição fosfolipídica das membranas dos embriões feita com o uso da técnica MALDI-MS, no presente estudo, devemos explicar que as abreviaturas da classe (PC ou SM) são usadas para designar os fosfolipídios, seguidos do total de carbonos e ligações duplas unidas ao esqueleto de glicerol. As estruturas lipídicas foram atribuídas com base em estudos prévios (Ferreira et al., 2010), além disso, foram usadas bases de dados lipídicas <http://lipidsearch.jp> ou [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org).

### *Desenho Experimental*

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, sendo que cada bloco foi uma rotina de PIVE. Para a análise de TUNEL e imunocitoquímica, foram escolhidos um pool de blastocistos ao acaso dentro das 11 repetições feitas no experimento.

### *Análises Estatísticas*

Para as análises estatísticas, foram realizadas análises de deviance, considerando modelos lineares mistos generalizados, sendo o efeito do dia de coleta (bloco) considerado como aleatório. Para as variáveis referentes a contagens, foi considerada a distribuição Poisson e função de ligação log. Nos casos de variáveis que representam taxas, foi utilizada a distribuição binomial e função de ligação logit.

No caso das variáveis taxas de blastocistos em relação ao número de clivados, número de células totais, taxa de apoptose total e da MCI e taxa da massa celular interna, quando o efeito dos tratamentos foi significativo, foi aplicado o teste de Dunnett, comparando os tratamentos L-165041 e DHA em relação ao controle.

No estudo da criotolerância foi realizada uma análise de deviance da taxa de eclosão para cada um dos tempos avaliados (12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72 h), sendo que nos casos de significância do efeito dos tratamentos, foi aplicado o teste de Dunnett, para comparar o tratamento controle com os demais. Todas as análises foram executadas utilizando o Proc GLIMMIX do software SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Para o experimento de MALDI-MS, os dados foram analisados com ANOVA, usando o modelo misto linear generalizado (GLIMMIX), procedimento do pacote estatístico do software SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). A fonte de variação do modelo incluía adição de 1  $\mu$ M de L-165041 e de 1  $\mu$ M de DHA, no meio de cultivo embrionário. Na ausência de interações significativas, apenas os principais efeitos significativos são apresentados. Foram

utilizados os modelos estatísticos multivariate e univariate para a análise dos perfis lipídicos, por espectrometria de massa. A metade do valor mínimo positivo dos dados obtidos no procedimento de pré-processamento foram usados para substituir os valores faltantes. A importância de cada valor m/z foi dada pelo auto-dimensionamento (médio-centrado e dividido pelo desvio padrão de cada variável) dos valores de intensidade de cada pico em vários espectros. O MetaboAnalyst 2.0 foi utilizado para realizar a análise dos componentes principais (PCA) (Xia et al., 2012), para obter a relação entre a variância nos dados e diferenças entre os embriões de cada tratamento. O teste de ANOVA, seguido do teste Tukey, foram utilizados para identificar as espécies lipídicas, diferencialmente expressas entre os tratamentos. Foram utilizadas as distancias euclidianas e vinculo de Ward para realizar o agrupamento hierárquico das espécies de lipídios diferencialmente expressas, com a relação entre amostras e características.

## **Resultados**

### *Cryotolerance*

Um dos indicadores usados para avaliar a qualidade embrionária foi a criotolerância. A taxa de eclosão às 12h após aquecimento não foi influenciada ( $P > 0.05$ ) pela adição de  $1\mu\text{M}$  de L-165041 (Figura 1). No entanto, as taxas de eclosão às 24h, 36h, 48h, 60h e 72h após desvitrificação foram maiores ( $P < 0.05$ ) no grupo tratado com  $1\mu\text{M}$  de L-165041 quando comparado com o grupo controle. O grupo L-165041 teve maiores taxas de eclosão que o grupo DHA as 24h, 48h, 60h e 72h. As taxas de eclosão não foram estatisticamente diferentes entre os grupos controle e o grupo tratado com  $1\mu\text{M}$  de DHA, nos momentos de avaliação ( $P > 0.05$ ). A taxa de mortalidade entre os grupos foi similar ( $P > 0.05$ ), (Figura 1).

### *Imunocitoquímica e índice apoptótico embrionário (TUNEL)*

O número de células por embrião em blastocistos desvitrificados dos grupos DHA e L-165041 foram maiores ao do grupo controle ( $P < 0,05$ ). A taxa de apoptose no grupo L-165041 foi reduzida ( $P < 0,05$ ), quando comparada com o grupo DHA e controle (Tabela 1). No entanto, o número de células da massa celular interna foi similar entre os grupos (Tabela 1). Contudo, a taxa de apoptose da massa celular interna foi reduzida ( $P < 0,05$ ) no grupo L-165041 (Tabela 1). Na figura 2, pode-se observar imagens das técnicas de embriões representativos de cada grupo.

#### *Lipid Profile of Embryos (MALDI-MS)*

Na figura 3, mostram-se os espectros representativos de um único blastocisto no modo iônico positivo MALDI-MS para cada tratamento. No eixo X, estão apresentados os valores  $m/z$  que correspondem às moléculas lipídicas, no eixo Y está apresentada a intensidade relativa ou abundância de cada íon desses lipídios.

A designação dos fosfolipídios é realizada pela abreviatura da classe (PC ou SM), seguida do total de carbonos e ligações duplas em resíduos de acilo, unidas ao esqueleto de glicerol escrito entre parênteses. Com base em estudos prévios (Ferreira et al., 2010; Sudano et al., 2012a; Tata et al., 2013; Sala et al., 2015) de perfis lipídicos obtidos pela técnica de MALDI-MS foi atribuída às espécies PL (Tabela 2 e 3), assim como bases de dados lipídicas <http://lipidsearch.jp> ou [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org). Os perfis obtidos pela técnica de MALDI-MS mostraram uma agrupamento correspondente à comparação do grupo controle com os tratamentos (Controle vs. DHA e Controle vs. L-165041). Os resultados obtidos pela análise PCA permitem observar no plot 2D-PCA perfis lipídicos dos grupos experimentais Controle vs L-165041 e Controle vs DHA, com uma separação pronunciada e nenhuma sobreposição (Fig. 3 e 4). Na figura 5, aparecem as intensidades dos íons que foram representativos do grupo L-165041 e DHA comparados com o grupo controle e, na tabela 2 e 3, aparecem as

espécies dos íons mais representativas encontrados neste estudo indicado em PCA via MALDI-MS.

Quando foi comparado o grupo L-165041 com o grupo controle, foi encontrada uma maior abundância relativa nos embriões tratados com L-165041 dos íons lipídicos m/z 758 e 789 +- 1Da correspondentes a fosfatidilcolina (PC), PC protonada [PC (34:2) + H]<sup>+</sup> e PC oxidado [PC (36:1) + H]<sup>+</sup> quando comparados ao grupo controle (Tabela 2).

Foi encontrada uma maior abundância relativa ( $P < 0.05$ ) do íon lipídico m/z 734, correspondente a PC protonada [PC (32:0) + H] no grupo tratado com DHA, quando comparado com o grupo controle (Tabela 3).

Quando foram feitas as comparações entre os três grupos (controle, DHA e L-165041), não foi encontrada nenhuma diferença na abundância relativa dos íons.

## **Discussão**

A criopreservação induz à ativação das vias apoptóticas, em razão das lesões celulares causadas por insultos mecânicos e osmóticos (Brison and Schultz 1997; Baust et al. 2000; Marquez et al. 2004; Park et al. 2006; Paschoal et al., 2017). A redução do índice apoptótico excessivo nos embriões PIVE é uma alternativa que pode aumentar a criotolerância.

No presente estudo, o cultivo com L-165041 reduziu o índice apoptótico total e da MCI nos embriões aquecidos. Em concordância, a adição de 1µM de L-165041, reduz a taxa de apoptose e melhora o desenvolvimento embrionário de camundongos desvitrificados (Chauhan et al., 2013; Grunert et al., 2014). Isto pode ser explicado pela regulação que o *PPARδ* exerce na expressão de genes envolvidos na proteção celular da apoptose, dois desses genes são 14-3-3ε e fosfoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) (Di-Po et al., 2002; Liou et al., 2006).

Entre os diversos danos causados pela criopreservação nos embriões temos: fragmentação do DNA, aumento do índice apoptótico (Behr et al., 2002; Rubio Pomar et al.,

2005; Park et al., 2006) danos nas membranas celulares (Wolfe and Bryant, 1999) e distúrbio no citoesqueleto (Dobrinsky, 1996) e consequentemente redução da viabilidade..

A inibição da ativação da apoptose pré- congelamento em células de mamíferos, promoveu a viabilidade pós-criopreservação (Stroh et al., 2002; Heng et al., 2007). Corroborando com o presente estudo que mostra o aumento da criotolerância nos embriões cultivados com 1 $\mu$ M de L-165041, acompanhado da diminuição da apoptose pós-vitrificação, comparado com o grupo controle e o grupo DHA.

A avaliação da criotolerância é considerada como um marcador relevante da qualidade embrionária a qual pode ser avaliada pela taxa de eclosão (Imai et al., 2002; Lonergan et al., 2003; Rizos et al., 2003). No presente estudo, foi evidenciado um incremento na taxa de eclosão nos embriões no grupo L-165041, das 24 h até as 72h pós-aquecimento, comparado com o grupo controle e as 24h, 48h, 60h e 72h no grupo DHA. Esses resultados sugerem que os embriões tratados com L-165041 têm uma maior chance de implantação embrionária, se esses embriões chegaram a ser transferidos a fêmeas receptoras, considerando que a eclosão é um evento prévio crucial para posterior alongamento do blastocisto ao longo do lúmen uterino para uma área de aposição com o endométrio (Carroll et al., 1990; Matson et al., 1997). Além disso, deve se ter em conta que criopreservação endurece a zona pelúcida e retarda a eclosão dos blastocistos (Kim et al., 2017), porém, o aumento da taxa de eclosão é muito importante para aumentar a sobrevivência embrionária.

A taxa de eclosão em blastocistos de camundongos foi incrementada pela adição de 1 $\mu$ M de L-165041 ativador do *PPAR $\delta$*  no cultivo embrionário, além de estimular a proliferação celular e proteger as células da apoptose em embriões de camundongos e suínos, por esse motivo, foi escolhida essa concentração para a presente pesquisa (Huang et al., 2007; Kim et al., 2010; Kang et al., 2011).

Em um estudo, foi constatado que a adição de L-165041, no cultivo de embriões em estágio de 2 e 8 células e mórula, estimulou o desenvolvimento, pois estes atingiram o estágio de blastocisto e, conseqüentemente, eclodiram (Huang et al., 2007). Esse efeito não foi obtido, quando o L-165041 foi adicionado no meio de cultivo com embriões no estágio final de blastocisto. Pode ser decorrente da proximidade dos blastocistos em eclodir. Outro tipo de ligante específico do *PPAR $\delta$*  é o Iloprost, que é uma prostaciclina. Estudos realizados em embriões de camundongos, usando essa molécula, encontraram um incremento no potencial de implantação e nos nascimentos (Huang et al., 2004, 2007). Além disso, o uso desse ativador do *PPAR $\delta$*  melhorou o desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos (Kim et al., 2010).

*PPAR $\delta$*  knock-out tiveram menor proliferação celular e sobrevivência de blastômeros refletidos, negativamente, no desenvolvimento embrionário e na taxa de eclosão dos blastocistos (Huang et al., 2007). É sabido que o número adequado de células embrionárias é essencial para a eclosão de blastocistos (Montag et al., 2000), demonstrando, assim, a importância da ativação do *PPAR $\delta$*  na criotolerância.

Os principais fatores envolvidos na eclosão são o incremento do número de células nos embriões o que causa uma diminuição da espessura da zona pelúcida, além da digestão da zona pelúcida, por parte das enzimas proteolíticas (Sawada et al., 1990; Montag et al., 2000). A expressão dos genes que sintetizam as enzimas proteolíticas cisteína protease, catepsina L e P foi detectada em blastocistos de hamster. Considera-se que essas enzimas estão envolvidas na eclosão desses blastocistos (Sireesha et al., 2008). Foi proposto que as serinas proteases ISP1 e ISP2, além de outras proteases tais como metaloproteases de matriz e plasminogênio participam na eclosão embrionária (Seshagiri and Lalitha, 2003; Aflalo et al., 2005; Sharma et al., 2006). No presente trabalho, o número total de células foi maior para o grupo DHA e L-165041, em relação ao controle ( $P < 0.05$ ).

O incremento na taxa de eclosão e o aumento do número de células pode ser decorrente do efeito antiapoptótico, provocado pelo estímulo do *PPAR $\delta$*  (Huang et al., 2007). A ação do *PPAR $\delta$*  é considerada crucial no desenvolvimento do blastocisto no camundongo, quando comparada com os efeitos das demais isoformas de PPARs. A expressão do *PPAR $\delta$*  foi incrementada durante a transição no estágio de oito células para blastocisto, porém esse incremento não esteve presente nas isoformas *PPAR $\alpha$*  e *PPAR $\gamma$*  (Kang et al., 2011). A ausência do efeito na taxa de eclosão e nas demais variáveis analisadas no presente estudo no grupo DHA pode ser em razão de ser este um ativador inespecífico dos PPARs (Germain et al., 2006). Tendo em conta que o *PPAR $\delta$*  reprime a ativação da transcrição causada pelos *PPAR $\alpha$*  e do *PPAR $\gamma$*  a qual é mediada por co-repressores, recrutados pelo *PPAR $\delta$*  (Zamir et al., 1997). Os isotipos *PPAR $\alpha$*  e do *PPAR $\gamma$*  participam na transcrição de genes que regulam a homeostase da glicose e dos lipídios (Desvergne and Wahli, 1999; Kersten et al., 2000). Tendo isso em conta, podemos propor que mesmo que o DHA ative o *PPAR $\alpha$*  irá, ao mesmo tempo, ativar o *PPAR $\delta$* , o qual reprimirá as atividades transcricionais do *PPAR $\gamma$*  e *PPAR $\alpha$* , consequentemente bloqueando sua ação positiva na homeostase do metabolismo da glicose e dos lipídios.

Não foi observada alteração na MCI nos embriões dos três grupos estudados. Porém, foi demonstrado o efeito da estimulação da proliferação celular em embriões pela ativação do *PPAR $\delta$*  (Huang et al., 2007). Era esperado que, pela adição do ligando específico do *PPAR $\delta$*  o L-165041, fosse observado um incremento no número de células embrionárias nesse grupo. Isso pode ser explicado, em razão de que, além de moléculas sintéticas como o L-165041 ativam o *PPAR $\delta$* , este também pode ser ativado por moléculas naturais como o DHA (Germain et al., 2006) e a prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub> ou prostaciclina) (Huang et al., 2003, 2007; Huang, 2008), as quais podem estar presentes nas lipoproteínas contidas no soro fetal bovino (SFB), tendo em conta que este é indefinido e poder conter além delas, diversas

substâncias. Essas lipoproteínas podem ingressar por endocitose nos blastômeros, permitindo o ingresso dessas substâncias (ABE et al., 1999; Thompson et al., 1995).

Como já foi mencionado, os embriões cultivados com L-165041 tiveram um incremento na taxa de eclosão, a partir das 24h pós- desvitrificação, portanto essa variável foi considerada como uma característica de sobrevivência na criopreservação. Além disso, existe um dinamismo nas abundâncias de intensidade dos íons moleculares nas membranas celulares dos organismos (Ferreira et al., 2010; Apparicio et al., 2012; Sudano et al., 2012a; Tata et al., 2013). As diferenças nas abundâncias relativas de algumas fosfatidilcolina (PC) foram encontradas nos íons lipídicos  $m/z$  758 e 789  $\pm$  1Da, correspondentes a PC protonada (34:2) e PC oxidado [PC (36:1) + H<sup>+</sup>] respectivamente nos embriões cultivados com L-165041. Na Tabela 2, mostra-se que a adição dessa molécula estimula a síntese de tais íons e estes podem ser considerados potenciais biomarcadores positivos para criotolerância em embriões bovinos (Sudano et al., 2012a).

Sugere-se que o efeito no aumento da sobrevivência causado pelo L-165041 é ocasionado pela modificação na composição fosfolipídica das membranas e, conseqüentemente, nas suas propriedades físico-químicas, porém o mecanismo específico pelo qual ele causa essa modificação é desconhecido até o momento (Sudano et al., 2012a). Embora a relação dos lipídios das membranas com a criopreservação ainda seja pouco compreendida, espécies de fosfolipídios estão sendo identificados como marcadores para criotolerância em blastocistos bovinos (Sudano et al., 2012a). Em especial, tem-se encontrado as PC como potenciais biomarcadores para a sobrevivência pós criopreservação (Leão et al., 2014).

A molécula L-165041 foi o ligante escolhido no presente estudo para ativar o *PPAR $\delta$* . O uso dessa molécula, embora relatada para outras espécies (Huang et al., 2007; Chauhan et

al., 2013; Grunert et al., 2014) não foi relatado na PIVE em embriões bovinos, dessa forma, representa uma alternativa para incrementar a criotolerância nessa espécie.

A concentração de 1 $\mu$ M de DHA foi escolhida, baseada em prévios resultados nos quais não teve efeito negativo na criotolerância avaliada a 72h pós-vitrificação, quando comparada com a concentração de 100 $\mu$ M a qual reduziu a criotolerância em embriões bovinos (Al Darwich et al., 2010). Em outro estudo, foi reportada uma concentração de DHA de 5 a 15  $\mu$ M em soro e de 1.5 a 3  $\mu$ M no fluido folicular de folículos preovulatórios de bovinos (Bender et al., 2010), o qual indica que a ausência de efeito da adição de 1 $\mu$ M de DHA no cultivo embrionário, nas variáveis analisadas no presente estudo, poderia ser pelo uso de uma concentração abaixo da concentração fisiológica. Mais estudos devem ser realizados, testando diferentes doses de DHA, usando como ponto de partida as concentrações deste no fluido folicular.

## **Conclusões**

Em conclusão, ocorreu a redução do índice apoptótico em embriões bovinos produzidos *in vitro* na técnica de vitrificação estudada. A adição de 1 $\mu$ M de L-165041 no meio de cultivo diminui a apoptose e aumenta a taxa de sobrevivência embrionária pós-vitrificação, por meio da ativação do *PPAR $\delta$* . A adição de 1 $\mu$ M DHA, no meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos, não exerce efeito na taxa de eclosão, nem na redução do índice apoptótico e proliferação celular nas condições do presente estudo.

## **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

–A Empresa Cenatte Embriões, Pedro Leopoldo-MG também apoia esta pesquisa, patrocinando a produção dos embriões no seu laboratório de pesquisa.

## Referências bibliográficas

- Abe H, Yamashita S, Itoh T, Satoh T, Hoshi H.** Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and- fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, n. 3, p. 325–335, 1999.
- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H.** Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, n. 1, p. 57–66, 2002.
- Aflalo ED, Sod-moriah UA, Potashnik G and Har-vardi I** (2005) Expression of plasminogen activators in preimplantation rat embryos developed in vivo and in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **8** 1–8.
- Apparicio M, Ferreira CR, Tata A, Santos VG, Alves AE, Mostachio GQ, Pires-Butler EA, Motheo TF, Padilha LC, Pilau EJ et al.** (2012) Chemical Composition of Lipids Present in Cat and Dog Oocyte by Matrix-Assisted Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI- MS). *Reproduction in Domestic Animals* **47** 113–117.
- Arav A, Zeron Y, Leslie SB and Anderson GB** (1996) Phase Transition Temperature and Chilling Sensitivity of Bovine Oocytes. **599** 589–599.
- Baust JM, Buskirk RVAN and Baust JG** (2000) Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* **36** 262–270.
- Behr B, Gebhardt J, Lyon J and Milki AA** (2002) Factors relating to a successful cryopreserved blastocyst transfer program. *Fertility and Sterility* **77** 697–699.
- Bender K, Walsh S, Evans ACO, Fair T and Brennan L** (2010) Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. *Reproduction* **139** 1047–1055.
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JCM et al.** (1998) Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes and Development* **12** 1304–1314.
- Brisson DR and Schultz RM** (1997) Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* **56**

1088–1096.

- Carroll J, Depypere H and Matthews CD** (1990) Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* **90** 547–553.
- Chauhan S, Canet M, Huang J-C, Dunn R, Grunert G and Wun W-S** (2013) Peroxisome proliferator activated receptor  $\delta$  (PPAR  $\delta$ ) activation enhances the development of cryopreserved embryos. *Fertility and Sterility* **100** S187.
- Paschoal DM, Sudano MJ, Schwarz KRL, Maziero RRD, Guastali MD, Crocomo LF, Magalhães LCO, Martins A, Leal CLV, Landim-Alvarenga FDC** (2017) Cell apoptosis and lipid content of in vitro – produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. *Theriogenology* **87** 108–114.
- Al Darwich A, Perreau C, Petit MH, Papillier P, Dupont J, Guillaume D, Mermillod P and Guignot F** (2010) Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK $\alpha$  phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **93** 30–36.
- Desvergne B and Wahli W** (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews* **20** 649–688.
- Di-Po N, Tan NS, Michalik L, Wahli W and Desvergne B** (2002) Antiapoptotic role of PPAR $\beta$  in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Molecular Cell* **10** 721–733.
- Dobrinsky JR** (1996) Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* **45** 17–26.
- Ferguson EM and Leese HJ** (1999) Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Reproduction and Fertility*, **116** 373–378.
- Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo FC, Sanvido GB, Santos LFA, Turco EG Lo, Pontes JHF, Basso AC et al.** (2010) Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* **51**.
- George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P and Donnay I** (2008) Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology* **69** 612–623.
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar M, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ and Gronemeyer H** (2006) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacological Reviews* **58** 760–772.
- Grunert G, Dunn R, Huang JC, Schenk L, Chauhan S and Wun WS** (2014) Prostacyclin

- Agonist (L165041) Enhances Embryos Survival after Vitrification and Warming. *Fertility and Sterility* **101** e15–e16.
- Hardy K, Handyside A and Winston R** (1989) The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development* **107** 597–604.
- Heng BC, Clement MV and Cao T** (2007) Caspase inhibitor Z-VAD-FMK enhances the freeze-thaw survival rate of human embryonic stem cells. *Bioscience Reports* **27** 257–264.
- Hiroyuki Abe, Shoko Yamashita, Takeshi Satoh HH** (2002) Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. *Molecular Reproduction and Development* **66** 57– 66.
- Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H** (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* **52** 68–700.
- Huang J** (2008) The Potential Applications of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\delta$  Ligands in. *PPAR Research*.
- Huang JC, Wun WSA, Goldsby JS, Wun IC, Falconi SM and Wu KK** (2003) Prostacyclin enhances embryo hatching but not sperm motility. *Human Reproduction* **18** 2582–2589.
- Huang J, Goldsby JS and Wun WA** (2004) Prostacyclin enhances the implantation and live birth potentials of mouse embryos. *Human Reproduction* **19** 1856–1860.
- Huang JC, Wun WSA, Goldsby JS, Wun IC, Noorhasan D and Wu KK** (2007) Stimulation of embryo hatching and implantation by prostacyclin and peroxisome proliferator-activated receptor ?? activation: Implication in IVF. *Human Reproduction* **22** 807–814.
- Imai K, Matoba S, Dochi O and Shimohira I** (2002) Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. *Journal Veterinary Medicine Science (Jap)* **64** 887–891.
- Kang HJ, Hwang SJ, Yoon JA, Jun JH, Lim HJ, Yoon TK and Song H** (2011) Activation of peroxisome proliferatorsactivated receptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) promotes blastocyst hatching in mice. *Molecular Human Reproduction* **17** 653–660.
- Kersten S, Desvergne B and Wahli W** (2000) Roles of PPARS in health and disease. *Nature*

405 421–424.

- Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M and Fukui Y** (2001) Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen – thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* **122** 131–138.
- Kim JS, Chae J Il, Song BS, Lee KS, Choo YK, Chang KT, Park H and Koo DB** (2010) Iloprost, a prostacyclin analogue, stimulates meiotic maturation and early embryonic development in pigs. *Reproduction, Fertility and Development* **22** 437–447.
- Kim HJ, Park SB, Yang JB, Choi YB and Lee KH** (2017) Effects of laser-assisted hatching and exposure time to vitrification solution on mouse embryo development. *Clin Exp Reprod Med* **44** 193–200.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A and Watanabe T** (2004) Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* **62** 1186–1197.
- Leão BCS, Rocha-frigoni NAS, Cabral EC, Franco MF, Ferreira CR, Eberlin MN, Filgueiras PR and Mingoti GZ** (2014) Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro -produced bovine embryos. *Zygote* **23** 732–741.
- Liou JY, Lee S, Ghelani D, Matijevic-Aleksic N and Wu KK** (2006) Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  mediated 14-3-3 upregulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26** 1481–1487.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T and Boland MP** (2003) Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animals* **38** 259–267.
- Marquez-Alvarado YC, Galina CS, Castilla B, Le on H M-MN** (2004) Evidence of Damage in Cryopreserved and Fresh Bovine Embryos Using the Tunel Technique. *Reproduction in Domestic Animals* **145** 141–145.
- Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich JL and Edirisinghe WR** (1997) Cryopreservation of oocytes and embryos: Use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme. *Human Reproduction* **12** 1550–1553.
- Moallem U, Shafran A, Zachut M, Dekel I, Portnick Y, Arieli A** (2013). Dietary  $\alpha$ -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. *Reproduction*

146 603–614.

- Montag M, Koll B, Holmes P and van der Ven** (2000) Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. *Biology of Reproduction* **62** 1738–1744.
- Mucci N, Aller J, Kaiser GG and Hozbor F** (2006) Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* **65** 1551–1562.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ, Glander H-J and Agarwal A** (2004) Cryopreservation and Thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **71** 1828–1837.
- Pakrasi PL and Jain AK** (2007) Evaluation of cyclooxygenase 2 derived endogenous prostacyclin in mouse preimplantation embryo development in vitro. *Life Sciences* **80** 1503–1507.
- Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, Park SP and Lim JH** (2006) Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote* **14** 125–131.
- Plourde M, Cunnane SC** (2007) Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab* **32** 619–34.
- Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP and Lonergan P** (2003) Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction* **68** 236–243.
- Rubio Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanit T, Aguilar B and Roelen BAJ** (2005) Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: A comparative study. *Theriogenology* **63** 2254–2268.
- Sala P, Pötzt S, Brunner M, Trötz Müller M, Fauland A, Triebel A, Hartler J, Lankmayr E and Köfeler HC** (2015) Determination of oxidized phosphatidylcholines by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to fourier transform mass spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences* **16** 8351–8363.
- Sampath H and Ntambi JM** (2005) Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism. *Annual Review of Nutrition* **25** 317–340.

- Sawada H, Yamazaki K and Hoshi M** (1990) Trypsin- like hatching protease from mouse embryos: Evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. *Journal of Experimental Zoology* **254** 83–87.
- Schmidt M, Hyttel P, Avery B and Grevea T** (1995) Ultrastructure of in vitro matured bovine oocytes after controlled freezing in 10 % glycerol. *Animal Reproduction Science* **37** 281-290.
- Seidel GE**. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 228–235, 2006.
- Seshagiri PB and Lalitha HS** (2003) Embryo-endometrial proteases during early mammalian development. Indian Journal of Experimental Biology. *Indian Journal of Experimental Biology* **41** 756–763.
- Sireesha GV, Mason RW, Hassanein M, Tonack S, Navarrete SA, Fischer B, Seshagiri PB** (2008). Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster. *Mol Hum Reprod*, v.14, p. 337–346.
- Sharma N, Liu S, Tang L, Irwin J, Meng G and Rancourt DE** (2006) Implantation Serine Proteinases heterodimerize and are critical in hatching and implantation. *BMC Developmental Biology* **11** 1–11.
- Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N** (2012). Chapter 13- health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. In: Se-Kwon K, editor. *Advances in Food and Nutrition research*. San Diego, CA: Academic Press 211–22.
- Stroh C, Cassens U, Samraj AK, Sibrowski W, Schulze-Osthoff K and Los M** (2002) The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16** 1651–1653.
- Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado S, Carlos L, Magalhães O, Crocomo LF, Lima-neto JF De and Landim-alvarenga FC** (2011) Lipid content and apoptosis of in vitro - produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology* **75** 1211–1220.
- Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Eberlin MN, Landim-alvarenga FDC and Machado R** (2012a) Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo- Produced Blastocysts. *Biology of Reproduction* **87** 1–11.

- Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado S, Crocomo LF, Carlos L, Magalhães O, Junior AM, Machado R and Landim-alvarenga FC** (2012b) Crucial surviving aspects for vitrified in vitro -produced bovine embryos. *Zygote* **22** 124–131.
- Tata A, Sudano MJ, Santos VG, Landim-alvarenga FDC, Ferreira R and Eberlin MN** (2013) Optimal single-embryo mass spectrometry fingerprinting. *Journal of Mass Spectrometry*, **48** 844–849.
- Van Wagendonk-de Leeuw AM, Mullaart E, De Roos APW, Merton JS, Den Daas JHG, Kemp B and De Ruigh L** (2000) Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* **53** 575–597.
- Wolfe J and Bryant G** (1999) Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* **39** 103–129.
- Xia J, Mandal R, Sinelnikov I V., Broadhurst D and Wishart DS** (2012) MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Research* **40** 127–133.
- Zachut M, Arieli A, Lehrer H, Livshitz L, Yakoby S, Moallem U**, “Effects of increased supplementation of n-3 fatty acids to transition dairy cows on performance and fatty acid profile in plasma, adipose tissue, and milk fat,” *Journal of Dairy Science*, **93**, 5877–5889, 2010.
- Zamir I, Zhang J and Lazar MA** (1997) Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes and Development* **11** 835–846.

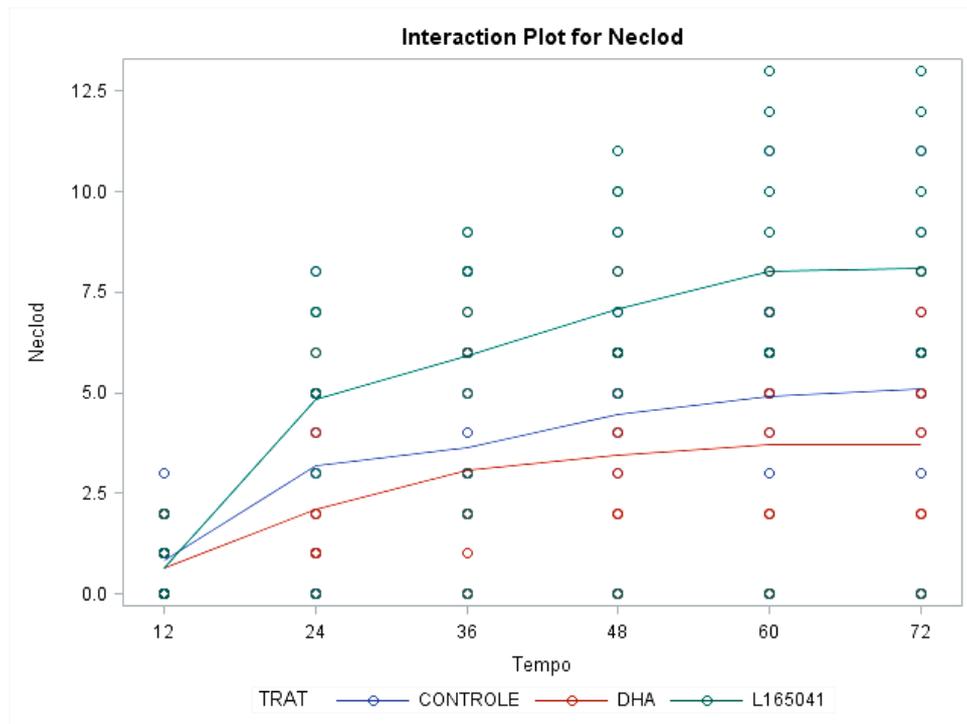


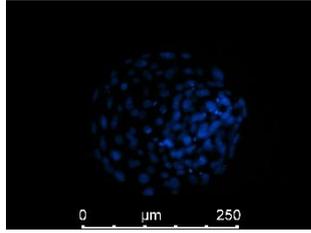
Fig. 1. Effects of DHA and L-165041 on blastocyst survival following vitrification and thawing. Hatched blastocyst rate at different times after thawing. Different superscripts indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between treatments at a given time point.

Table 1. Effect of 1  $\mu$ M DHA and 1  $\mu$ M L-165041 supplementation during *in vitro* embryo development on d 7 embryo yield and on *in vitro* embryo on total number of cells and the percentage of apoptotic cells and percentage of inner cell mass (ICM) in vitrified bovine blastocysts.

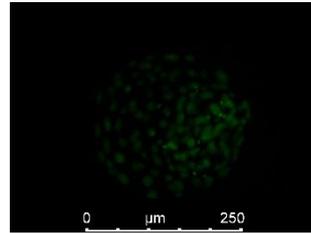
Variables	CIV+ DMSO	CIV+1 $\mu$ M of DHA	CIV + 1 $\mu$ M of L-165041
No. embryos	12	12	12
Total no. cell	89.33 $\pm$ 2.72 <sup>a</sup>	105.58 $\pm$ 2.96 <sup>b</sup>	103.92 $\pm$ 2.94 <sup>b</sup>
% ICM	9.23 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	7.73 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	8.90 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>
% Apoptotic cells	18.56 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	19.46 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	10.10 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup>
% Apoptotic in ICM	79.80 $\pm$ 4.03 <sup>a</sup>	72.45 $\pm$ 4.51 <sup>a</sup>	51.35 $\pm$ 4.74 <sup>b</sup>

Within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ )

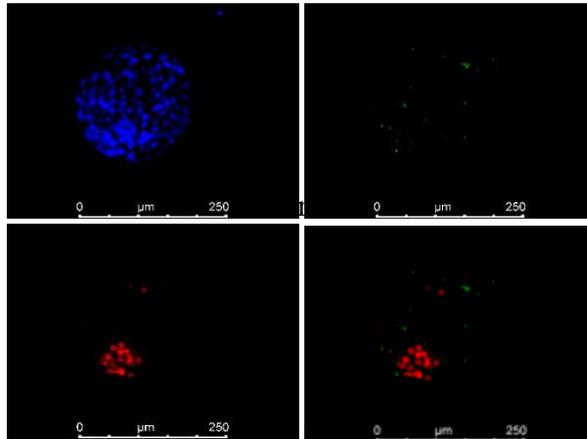
**Negative control**



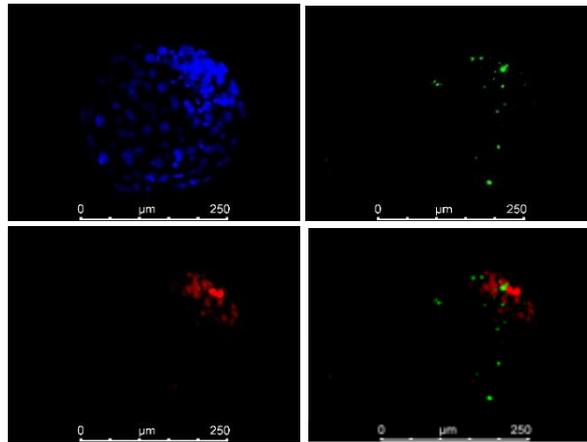
**Positive control**



**Control**



**DHA**



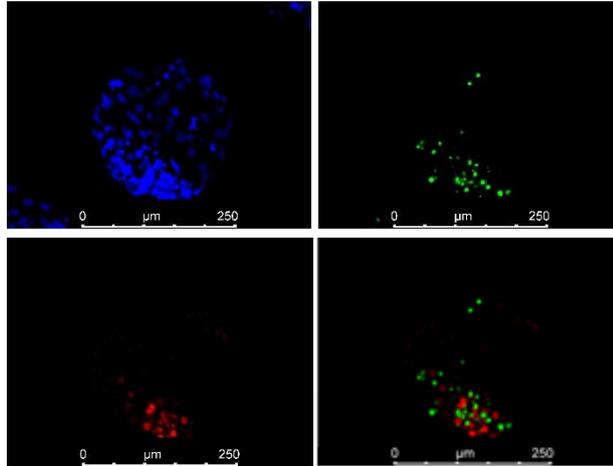
**L-165041**

Fig. 2. Representative embryos of vitrified bovine blastocysts submitted to the TUNEL reaction. Green nuclei fluorescence (TUNEL) was considered with fragmented DNA. DAPI stained all healthy and apoptotic cells with the blue nuclei fluorescence. SOX-2 stained of red the cell of the internal cell mass. The green and red was used for determined the apoptotic cells of the internal cell mass. At 200X magnification. Observations: Control, DHA and L-165041 group.

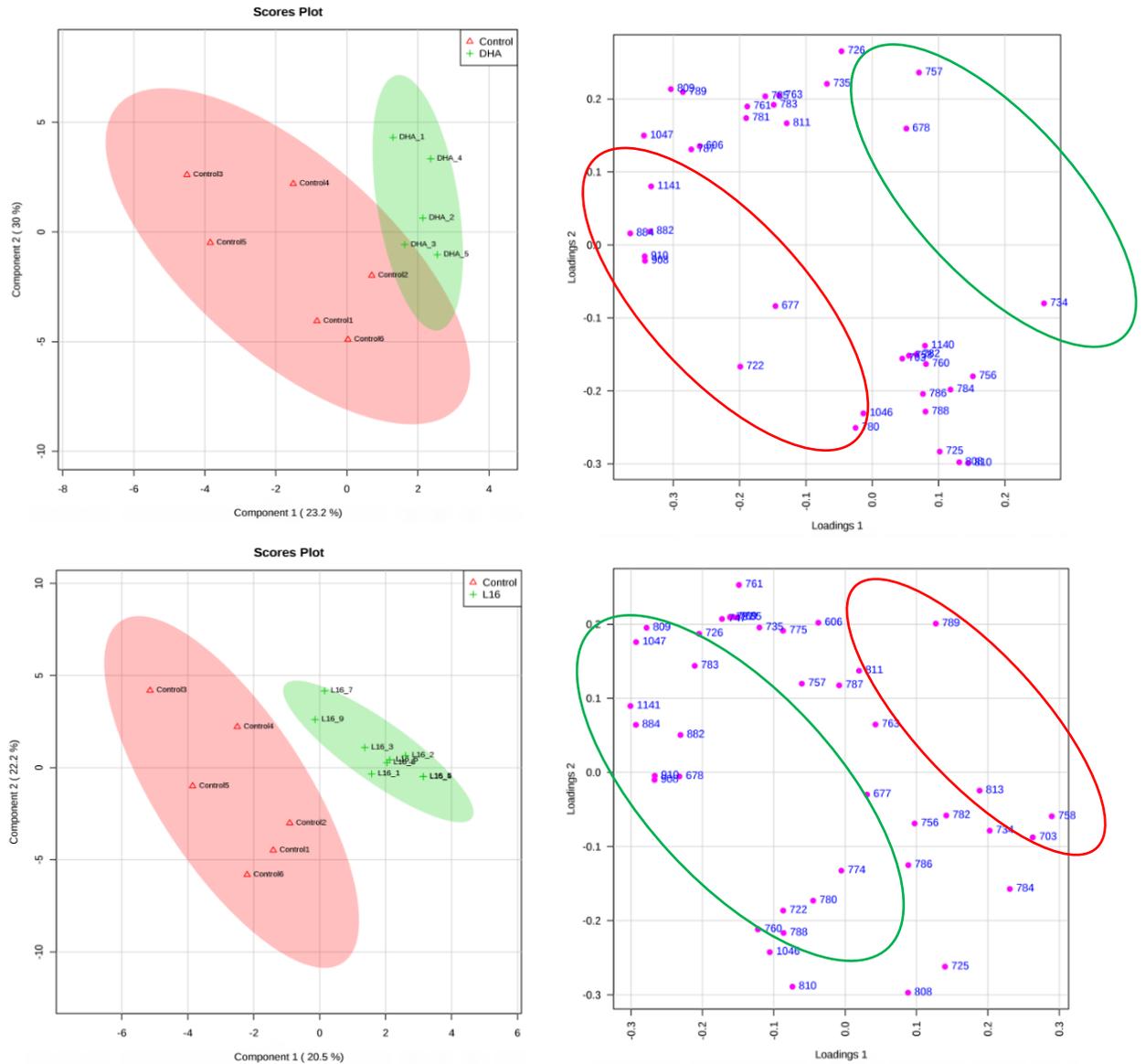


Fig. 3. Two-dimensional PCA plots for MALDI-MS data of treatments Control (n = 6), DHA (n = 5) and L-165041 (n = 9).

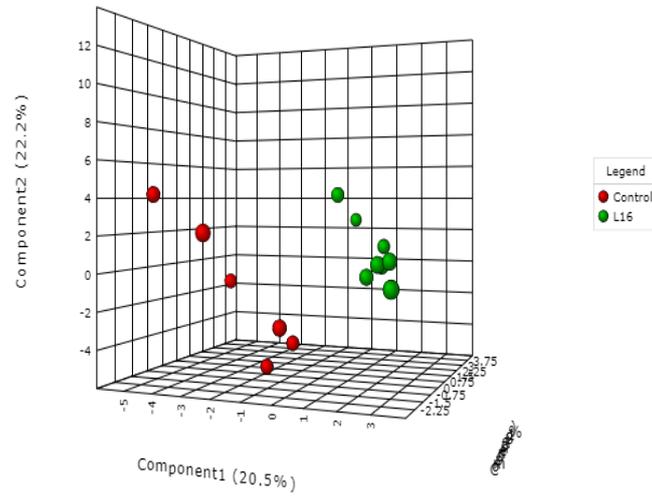
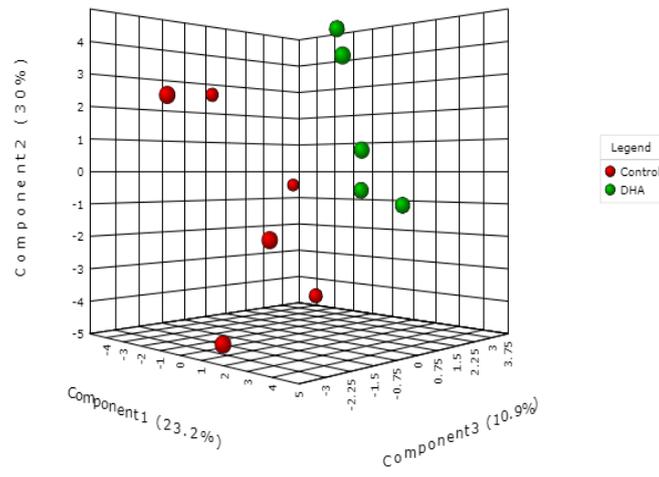


Fig. 4. Three-dimensional principal-component analysis (PCA) plot of treatments Control (n = 6), DHA (n = 5) and L-165041 (n = 9).

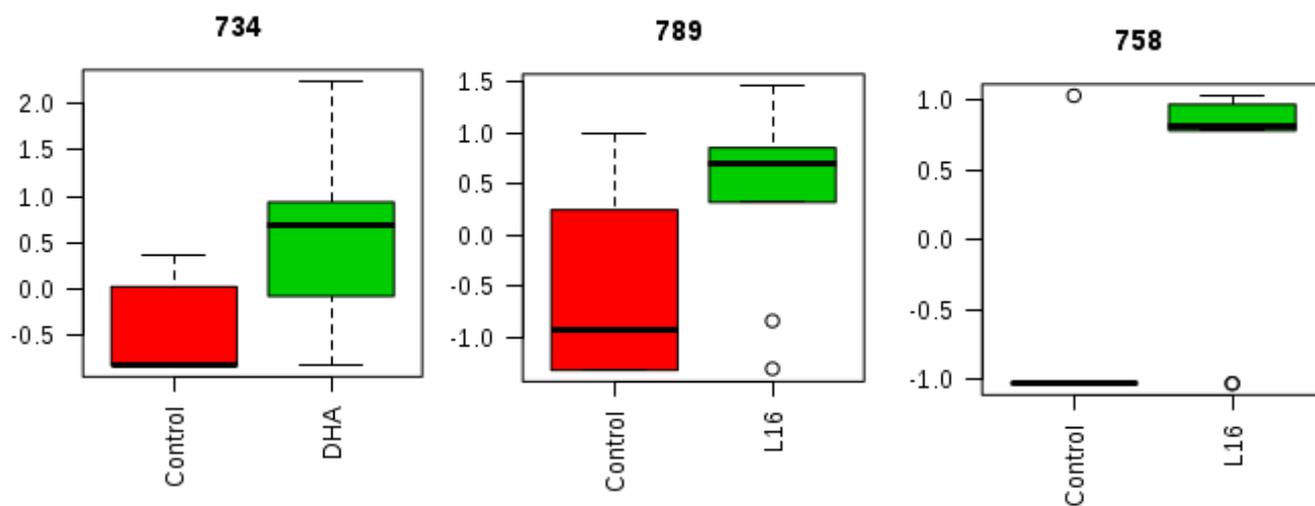


Fig. 5. Bar chart, where the intensity of DHA group ions compared to the control group and L-165041 compared to the control group.

Table 2. Significant PC indicated in PCA via MALDI-MS of individual Controle and L-165041. Overview of MALDI-base selection of prospective lipid markers for cryopreservation survival based in the treatment Control and L-165041.

<i>m/z</i>	Lipid Ion (carbons:unsaturation)	Controle	L-165041	Biomarker
758 +-1Da	[PC (34:2) + H] <sub>+</sub>	↓	↑	Positive
789+- 1Da	[PC (36:1) + H <sup>+</sup> ]	↓	↑	Positive

(<http://lipidsearch.jp> and <http://www.lipidmaps.org>).

Table 3. Significant PC indicated in PCA via MALDI-MS of individual Controle and DHA. Overview of MALDI-base selection of prospective lipid markers for cryopreservation survival based in the treatment Control and DHA.

<i>m/z</i>	Lipid Ion (carbons:unsaturation)	Controle	DHA	Biomarker
734	[PC (32:0)+H]	↓	↑	Not considered

(<http://lipidsearch.jp> and <http://www.lipidmaps.org>).