



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAMILA BORTOLIERO COSTA

**COMPARAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO DE  
VACAS *Bos taurus indicus* CULTIVADOS COM FORSKOLIN  
OU PEPTÍDEO NATRIURÉTICO C**

CAMILA BORTOLIERO COSTA

**COMPARAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* DE VACAS  
*Bos taurus indicus* CULTIVADOS COM FORSKOLIN OU  
PEPTÍDEO NATRIURÉTICO C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina  
2017

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

Costa , Camila Bortoleiro Costa.

Comparação do conteúdo lipídico e expressão gênica de embriões produzidos in vitro de vacas *Bos taurus indicus* cultivados com forskolin ou peptídeo natriurético c / Camila Bortoleiro Costa . - Londrina, 2017.

74 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda Seneda.

Coorientador: Fábio Gouveia Nogueira Nogueira.

Coorientador: Mateus José Sudano Sudano.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal. - Tese. 2. Bovino x Embrião. - Tese. 3. Fertilização in vitro. - Tese. 4. Reprodução animal x Aspectos genéticos. - Tese. I. Seneda, Marcelo Marcondes Seneda . II. Nogueira, Fábio Gouveia Nogueira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CAMILA BORTOLIERO COSTA

**COMPARAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* DE VACAS  
*Bos taurus indicus* CULTIVADOS COM FORSKOLIN OU  
PEPTÍDEO NATRIURÉTICO C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal).

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda  
Universidade Estadual de Londrina-UEL

---

Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

---

Prof. Dr. Mateus José Sudano  
Universidade Federal do Pampa - Unipampa

Londrina, 21 de Fevereiro de 2017.

O presente trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Reprodução Animal (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto a:

- 1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

## **DEDICO**

---

À Deus.

A minha família e ao meu amado marido.

## AGRADECIMENTOS

---

Em primeiro lugar a Deus, por ter me permitido chegar até aqui. Que por muito tempo acreditava que minha fé era algo facilmente mensurável, pois não acreditava no fundo que ela poderia me ajudar a tornar uma pessoa melhor. Hoje vejo que se não fosse essa fé, esta mudança que aconteceu e que continua acontecendo nada do que vivo hoje seria possível. Então muito obrigada Deus pela oportunidade de ser uma pessoa em constante mudança e pelo cuidado que o senhor tem por mim e todos que amo a cada dia.

Agradeço a minha mãe Ana Lucia por todo carinho que dedicou a mim antes mesmo de nascer, aos momentos em que me apoiou e me ensinou a trilhar por caminhos certos. Por mais que tivemos desavenças e por mais fortes que elas foram, sei o quanto nosso amor é forte e nosso laço é eterno. Se hoje sou esta pessoa com princípios, devo quase que exclusivamente a você, por me ensinar o real sentido da vida e do verdadeiro caráter.

Ao meu pai Mauricio por tornar essa conquista possível, não só financeiramente, mas pelo apoio em inúmeros momentos. Pelo carinho e algumas desavenças que me fizeram crescer, que me fizeram enxergar um pouquinho do que a vida realmente é.

Aos meus avós paternos Nairde e Armando, mas principalmente a minha avó Celina e avô Nivaldo, pela dedicação de uma vida sendo meus segundos pais, me aguardando todos os dias de aula com bolinhos de chuva (heheheh como eu amava isso....) , me ensinando a andar de bicicletinha nas ruas de barro de Pirajuí, me ensinando a demonstrar carinho e amor com gestos e não apenas com palavras. Devo o que sou hoje a vocês.

Ao meu marido Marcio, que entrou em minha vida de uma forma sutil, porem foi se mantendo presente a cada dia. Como poderia imaginar que aquele “cara” que conheci em uma festa universitária transformaria minha vida. Muito obrigada pelos momentos em que me deu forças quando estava no chão, nos momentos em que afagou meus cabelos me pedindo calma e maturidade, nos momentos de alegria, em nossas viagens. Enfim, obrigada por existir em minha vida e faze-la cada dia melhor.

Agradeço aos meus irmãos Isadora e João Vitor, que por mais que estivéssemos distantes sempre demonstraram o carinho e entenderam minha ausência em inúmeros momentos e fase da vida.

Agradeço aos meus tios André e Claudia pelo carinho que sempre dedicaram a mim, aos conselhos e aos inúmeros momentos em que desfrutamos juntos. As minhas queridas primas Ana Laura, Mariana e Luiza pelo carinho, risadas e muito amor que sempre demonstraram.

A minha segunda família, que agradeço a Deus por ter sido tão generoso comigo me presenteando com ela. Minha sogra Elisa, meu sogro Márcio. Muito obrigada por todos os momentos que me acolheram, que me aconselharam e demonstraram tanto carinho por mim.

A minha terceira e quarta família (a vantagem de ter familiares separados, são as famílias a mais que ganhamos...hehe), Elizangela, Ricardo, Rosangela, Andréa, Maria José (minha terceira avó), obrigada por todos os conselhos, todas risadas e amor por mim. Obrigada por fazerem parte de minha vida.

As minhas amigas de faculdade Deise, Clarisse, Jéssica e Aretha, que me acompanharam durante faculdade e que levarei a amizade de vocês para o resto da vida.

As minhas amigas de quase infância Bruna e Carol, obrigada pela amizade de vocês mesmo que com desencontros do destino e com a distância, continuamos sempre juntas.

Agradeço ao meu querido orientador Prof Dr. Marcelo Seneda, por acreditar em mim, sempre sendo exemplo de profissionalismo. Pelos momentos não só de orientação, mas de aconselhamentos pessoais. Pela compreensão e amizade nos momentos difíceis. Vou levar para sempre o senhor no coração!!!

À todos os meus amigos do Laboratório REPROA: Andressa, Camila Rosa, Camila Bizarro, Denis, Emanuel, Fábio Morotti, Fábio Moraes, Fabiana, Gustavo, Isabela, Larissa, Luciana, Paulinha e Suellen. Em especial, Camila Bizarro que me ajudou na execução do meu trabalho, desprendendo tardes comigo, ajustando o foco e luminosidade do microscópio e jogando conversa fora hehehe... A Anne que inúmeras vezes me apoiou, me incentivou e ouviu minhas lamentações, demonstrando o valor de uma bela amizade. A querida Paulinha que tornou possível a execução de meu trabalho, que se dedicou juntamente comigo para que tudo acontecesse. Aos finais de semana no laboratório, juntamente com o André e Marcio (aprenderam tudo de FIVE, coitados...) muito obrigada. Muitas saudades sua amiga, dos nossos almoços, nossos lanchinhos fit, nossas corridas no lago. Saiba que nossa amizade será para a vida toda. A Luciana que diversas vezes me incentivou falando que eu estava no caminho certo, muito obrigada. A Kátia e Gustavo, não poderia deixar de agradecer, duas pessoas que foram importantes para que eu ingressasse no mestrado.

A Elisa e Patrícia da Unesp que contribuíram muito para este trabalho, para os resultados de meu experimento. Muito obrigada por toda a ajuda e dedicação.

Aos professores doutores que me ajudaram quanto a execução de diferentes partes do meu trabalho, Dr Bruno Valente Sanches, Dra Christina, Prof. Dr Mateus José Sudano, Prof. Dr Marcelo Fábio Gouveia Nogueira.

Agradeço aos membros da banca de qualificação Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins e Profa. Dra Kátia Silva Santos, pelas importantes contribuições para este trabalho. E aos membros da banca de defesa Prof. Dr Mateus José Sudano, Prof. Dr Marcelo Fábio Gouveia Nogueira por aceitarem participar deste momento importante de minha carreira e dedicarem seu tempo para contribuir com este trabalho.

À Capes, pela bolsa de estudos concedida durante a execução deste trabalho, bem como a Profa. Dra. Ana Paula Bracarense, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UEL, pela preocupação com os alunos e estímulo a nossa formação profissional. À Helenice, secretária da pós, que sempre nos orienta e ajuda com os processos e atividades do programa.

À empresa In Vitro Brasil S/A pela disponibilização dos meios utilizados para a produção dos embriões, tornando essa pesquisa possível.

Enfim, agradeço a todos que de uma maneira ou outra fazem parte dessa conquista, e que me ajudaram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

À todos meu muito obrigada!!!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

ALBERT EINSTEIN

COSTA, Camila Bortoliero. **Comparação do conteúdo lipídico e expressão gênica de embriões produzidos *in vitro* de vacas *Bos taurus indicus* cultivados com Forskolin ou Peptídeo Natriurético C** 2017. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com forskolin e peptídeo natriurético C (NPPC) sobre o desenvolvimento, conteúdo lipídico e níveis de transcritos de genes relacionados com a qualidade e metabolismo celular de embriões *Bos taurus indicus* produzidos *in vitro*. Para o cultivo *in vitro* foram utilizados ovários (n = 420) de 210 fêmeas Nelore, coletados de abatedouro local e transportados em solução salina a 30-35° C até o laboratório. Os oócitos foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*. No dia 5 (D5) de cultivo *in vitro* os embriões foram divididos em três grupos experimentais e adicionadas as substâncias no meio de cultivo; grupo controle, forskolin (10 µM) e NPPC (100 nM). As taxas de blastocisto e eclosão foram avaliadas em D7, D9 e D10. Para a avaliação da concentração lipídica, foram coletados blastocistos (D7; n=10 /grupo) e corados com o corante Preto Sudão B. As expressões dos genes GPX1, SREBF1, POU5F1, AKR1B1, HAND1, HP1, IFNT2 e SCD foram analisadas por qRT-PCR. Para a análise estatística das taxas de cultivo *in vitro* foi utilizado o teste ANOVA do sistema SAS (p=0,09); para o conteúdo lipídico, foi utilizado o teste ANOVA, seguido de teste Tukey (p>0,05); na análise das expressões gênicas, foi utilizado software JMP. As taxas de blastocisto entre os grupos, foram 39,5 % no grupo controle; 37,9 % grupo forskolin e 44,4 no NPPC. As taxas de eclosão em D9 e D10 foram respectivamente, grupo controle (43,5 %; 48,4%), forskolin (55,7%; 62,9%) e NPPC (54,6%; 63,9%; p=0,09). A concentração lipídica nos tratamentos foram de 883 UA (unidade arbitrária) grupo controle; 772 UA grupo forskolin e 881UA no grupo NPPC (p>0,05); concentração lipídica/área (UA x10<sup>-10</sup>/µm<sup>2</sup>) foi de 1,1±0,8 no grupo controle; 0,9±0,7 no grupo forskolin e 1,0±0,6 no grupo NPPC; concentração lipídica/volume (UA x10<sup>-13</sup>/µm<sup>3</sup>) 5,4±4,7; 4,3±4,0 e 4,6±2,9 nos grupos controle, forskolin e NPPC (p>0,05). Em nosso estudo, os genes avaliados demonstraram diferentes respostas de acordo com a substância submetida *in vitro* (p=0,09). Os genes POU5F1, HP1 e HAND1 obtiveram elevadas concentrações de transcritos nos embriões do grupo controle e NPPC. O gene AKR1B1, obteve uma concentração de RNAm semelhante entre os tratamentos, sendo que os embriões tratados com forskolin se assemelharam aos embriões submetidos ao NPPC; e os embriões submetidos ao tratamento com o NPPC obtiveram abundância relativa de transcritos similar ao grupo controle(p=0,09). Os transcritos do gene GPX1 obtiveram concentrações semelhantes no grupo controle, forskolin e NPPC. Genes relacionados com o metabolismo de lipídeos, SREBF1 e SCD, apresentaram diferenças nas concentrações de transcritos. Com relação do gene IFNT2, foi evidenciado maiores concentrações em embriões tratados com forskolin e NPPC. Como conclusão, não houve diferença entre as taxas de blastocisto. As taxas de eclosão em D10 foram maiores nos embriões tratados com forskolin ou NPPC. A concentração lipídica dos embriões submetidos ao cultivo *in vitro* sem qualquer substância, com forskolin ou com NPPC mostrou-se constante. Entretanto, os genes estudados apresentaram diferentes quantidades de transcritos de acordo com o tratamento submetido, mostrando assim efeito do tratamento sob o desenvolvimento inicial dos embriões, metabolismo celular relacionado com obtenção de energia e possível metabolização dos lipídeos.

**Palavras-chave:** *Bos taurus indicus*. Cultivo *in vitro*. Transcritos. Metabolismo celular.

COSTA, Camila Bortoliero. **Comparison of lipid content and gene expression of *in vitro* produced *Bos taurus indicus* embryos treated with Forskolin or Natriuretic Peptid C.** 2017. 74p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) - University State of Londrina, Londrina. 2017.

## ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effect of supplementation of the culture medium with forskolin and natriuretic peptide C (NPPC) on the development, lipid content and transcript levels of genes related to the quality and cellular metabolism of *Bos taurus indicus* embryos *in vitro* produced. For *in vitro* culture, ovaries were used (n = 420) of 210 Nelore females, collected from local slaughterhouse and transported in saline solution at 30-35° C until the laboratory. Oocytes were matured, fertilized and cultured *in vitro*. On day 5 (D5) of *in vitro* culture the embryos were divided into three experimental groups and substances are added to the culture medium; control group, forskolin (10 µM) and NPPC (100 nM). The blastocyst and hatching rates were evaluated in D7, D9 and D10. For the evaluation of the lipid concentration, blastocysts (D7; n=10 /group) and stained with the Sudan Black B. Expressions of genes GPX1, SREBF1, POU5F1, AKR1B1, HAND1, HP1, IFNT2 and SCD analyzed by qRT-PCR. For the statistical analysis of *in vitro* culture rates, the ANOVA test with the system SAS (P=0.09); for the lipid content, the ANOVA test was used, followed by Tukey test (P>0.05); in the analysis of the gene expressions, software JMP was used. The blastocyst rates between the groups 39.5 % in the control group; 37.9 % forskolin group and 44.4% on NPPC. The hatch rates in D9 and D10 were respectively, control group (43.5 %; 48.4%), forskolin (55.7%; 62.9%) and NPPC (54.6%; 63.9%; P=0.09). The lipid concentration in the treatments were 883 AU (arbitrary unit) control group; 772 AU forskolin group and 881 AU with NPPC group (P>0.05); lipid concentration / area (AU x10<sup>-10</sup>/µm<sup>2</sup>) were 1.1±0.8 control group; 0.9±0.7 forskolin group and 1.0±0.6 with NPPC group; lipid concentration /volume (AU x10<sup>-13</sup>/µm<sup>3</sup>) 5.4±4.7; 4.3±4.0 and 4.6±2.9 control group, forskolin and NPPC (P>0.05). In our study, the evaluated genes demonstrated different responses according to *in vitro* submitted substance (P=0.09). The POU5F1, HP1 and HAND1 genes obtained high concentrations of transcripts in the embryos of the control group and NPPC. The AKR1B1 gene, obtained a similar concentration of mRNA between treatments, the forskolin-treated embryos resembled the embryos submitted to NPPC; and the embryos submitted to treatment with NPPC obtained a relative abundance of transcripts similar to the control group (P=0.09). Gene transcripts GPX1 obtained similar concentrations in the control, forskolin and NPPC groups. Genes related to lipid metabolism, SREBF1 and SCD, showed differences in transcript concentrations. In relation the IFNT2 gene, higher concentrations were observed in embryos forskolin and NPPC treated. In conclusion, there was no difference between blastocyst rates. The D10 hatch rates were higher in embryos treated with forskolin or NPPC. The lipid concentration of the embryos submitted to *in vitro* culture without any substance, with forskolin or with NPPC was shown constant. However, the genes studied presented different amounts of transcripts according to the treatment submitted, showing treatment effect under the initial development of the embryos, metabolism related to obtaining energy and possible lipid metabolism.

**Keywords:** *Bos indicus*. Cell metabolism. Transcripts. Expression. *In vitro* culture.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

<b>Tabela 1 -</b>	Nomes e funções dos genes avaliados em embriões bovinos ( <i>Bos taurus indicus</i> ) produzidos <i>in vitro</i> nos grupos controle, forskolin e NPPC.....	69
<b>Tabela 2 -</b>	Taxas de blastocisto e eclosão de embriões bovinos ( <i>Bos taurus indicus</i> ) produzidos <i>in vitro</i> nos grupos controle, forskolin e NPPC (p = 0,09).....	70
<b>Tabela 3 -</b>	Conteúdo lipídico citoplasmático de embriões <i>Bos taurus indicus</i> produzidos <i>in vitro</i> dos diferentes grupos experimentais (controle, forskolin e NPPC). Os dados são apresentados com média dos quadrados mínimos $\pm$ desvio padrão; n = 10 por grupo; p>0,05).....	71

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 -** Possível mecanismo de ação do forskolin em oócitos de bovinos, potente ativador da adenilato ciclase, que estimula a atividade da lipase, quebrando os triglicérides em glicerol e ácidos graxos (AG). Atua no ciclo da proteína quinase (PKA) /cAMP ..... 22

### ARTIGO

- Figura 1 -** Delineamento experimental ..... 64
- Figura 2 -** (A) Imagem de microscopia de campo claro de embriões do grupo Controle (1), grupo forskolin (2) e grupo NPPC (3) corados com corante lipofílico Preto Sudão B. (B) Conversão para escala de cinza para o ensaio semi-quantitativo de conteúdo lipídico. Pontos com coloração escura representam as gotas lipídicas citoplasmáticas. Ampliação original X 600 ..... 65
- Figura 3 -** Abundância relativa de mRNA dos genes GPX1, HAND1 e POU5F1 avaliados em blastocistos (D7) de vacas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* nos grupos controle, forskolin e NPPC; p=0,06) ..... 66
- Figura 4 -** Abundância relativa de mRNA dos genes AKR1B1 e SREBF1 avaliados em blastocistos (D7) de vacas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* nos grupos controle, forskolin e NPPC; p=0,06) ..... 67
- Figura 5 -** Abundância relativa de mRNA dos genes IFNT2, HP1 (p=0,06) e SCD (p=0,08) avaliados em blastocistos (D7) de vacas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* nos grupos controle, forskolin e NPPC ..... 68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta-actin- Beta actina
AG	Ácidos graxos
AKR1B1	Família aldo-ceto redutase 1
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Bovine serum albumin - albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CCOs	Complexo <i>cumulus</i> oócito
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
D	Dia
eCG	Equine chorionic gonadotropin- gonadotrofina coriônica equina
EGF	Epidermal growth factor- fator de crescimento epidermal
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Follicle-stimulating hormone- hormônio folículo estimulante
GPX1	Glutathione peroxidase 1- glutathiona peroxidase 1
GTP	Guanosina trifosfato
HAND1	Heart and neural crest derivatives expressed 1- derivados do miocárdio e da crista neural expressos 1
hCG	Human corionic gonadotrophic- Gonadotrofina coriônica humana
HP1	Heterochromatin protein 1-Alpha - heterochromatina proteína 1-alpha
IFNT2	Interferon tau
LH	Luteinizing hormone - hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
mg	Miligramas
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
NPPA	Natriuretic peptide A - peptídeo natriurético atrial
NPPB	Natriuretic peptide B- peptídeo natriurético tipo B
NPPC	Natriuretic peptide C - peptídeo natriurético C

NPR-1	Natriuretic peptide receptor 1- receptor tipo 1
NPR-2	Natriuretic peptide receptor 2- receptor tipo 2
OPU	Ovum pick up - aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia
PDE3A	Fosfodiasterase 3A
PHE	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV	Prozuidos <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína quinase
POU5F1	POU classe 5 homeobox 1, OCT4
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) - estearil-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
SDHA	Succinate dehydrogenase complex subunit A - Subunidade A do succinato desidrogenase
SFB	Soro fetal bovino
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1 - Elemento regulador do esteroi fator 1 de transcrição
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
µM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES.....	18
2.2	PARTICULARIDADES E ESTRATÉGIAS NO CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS.....	20
2.3	FORSKOLIN .....	21
2.4	PEPTÍDEO NATRIURÉTICO C .....	23
2.5	GENES RELACIONADOS COM O METABOLISMO INICIAL E METABOLISMO ENERGÉTICO EM EMBRIÕES.....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	42
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	43
4.1	OBJETIVO GERAL .....	43
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>5</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	44
5.1	INTRODUÇÃO .....	46
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	47
5.2.1	Animais, Recuperação Oocitária e Maturação in Vitro (miv).....	47
5.2.2	Fecundação in Vitro (fiv).....	48
5.2.3	Cultivo in Vitro (civ) .....	48
5.2.4	Avaliação Semi-Quantitativa para Lipídeos .....	49
5.2.5	Análise de Transcritos de Rnam50	
5.2.6	Análise Estatística.....	51
5.3	RESULTADOS .....	51
5.4	DISCUSSÃO .....	52
5.5	REFERÊNCIAS.....	57
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	72
<b>7</b>	<b>APÊNDICE</b> .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

---

As biotécnicas da reprodução contribuem decisivamente para a indústria da pecuária de corte e leiteira, por proporcionar uma multiplicação mais rápida e eficiente de animais com genética superior, melhorando a eficiência reprodutiva e a produtividade dos rebanhos em um período curto de tempo (LOPES et al., 2012). Dentre as biotécnicas disponíveis, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) destaca-se por ser uma ferramenta eficaz para otimizar o processo de seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores. Desta forma, a PIVE ganha destaque no cenário mundial, sendo produzidos cerca de 671.111 mil de embriões *in vitro* por ano (IETS, 2015).

Além da importância zootécnica, as pesquisas com biotécnicas *in vitro* possuem papel fundamental para permitir o estudo dos mecanismos fisiológicos básicos que ocorrem *in vivo*. Os grandes avanços obtidos na PIVE nos últimos 50 anos são consequência de estudos realizados nas áreas de biologia celular, molecular e genética, que contribuíram para o esclarecimento de eventos relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial e metabolismo celular (GAD et al., 2012).

Apesar dos recentes avanços relacionados com a PIVE, a baixa eficiência nos processos de criopreservação é um obstáculo. A criopreservação mostra-se necessária para a distribuição dos PIVE em larga escala e para a preservação de material genético. Esta baixa eficiência nos processos de criopreservação de embriões *in vitro* pode estar relacionada com diferenças entre as técnicas de produção. Esta menor criotolerância se deve principalmente a maior concentração de lipídeos presentes em embriões *in vitro* em relação aos embriões *in vivo* (MUCCI et al., 2006; CAMARGO et al., 2011). Esta possivelmente relacionada com o meio de cultivo utilizado *in vitro*, devido a utilização do soro fetal bovino (SFB) (MOORE et al., 2007; SUDANO et al., 2011).

Embriões cultivados em meio suplementado com SFB contém maiores concentrações de gotas lipídicas citoplasmáticas que embriões cultivados na ausência de SFB (ABE et al., 2002; Ferreira et al., 2010). Além do uso do SFB, existem diferenças no metabolismo celular de embriões PIV quando comparados a embriões *in vivo* (GHANEM et al., 2011). Desta forma, substâncias como o forskolin (PASCHOAL et al., 2012), etossulfato de fenazina (SUDANO et al., 2011) e L-carnitina (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), juntamente com a utilização de meios “serum free” foram utilizados com o intuito de diminuir a concentração de lipídeos de embriões PIV. Outra opção é a ‘delipidação’ dos embriões PIV com a remoção das gotas citoplasmáticas de lipídeos via micro-manipulação com a utilização de centrífuga em alta rotação. As gotas lipídicas são reunidas em um dos polos do citoplasma e removidas com a ajuda de uma micropipeta (Diez et al., 2001).

Além das diferenças entre embriões PIVE e *in vivo*, é sabido que existem diferenças entre os embriões de *Bos taurus* e *Bos indicus*. Embriões *Bos taurus* possuem maior quantidade de lipídeos comparados a embriões *Bos indicus* (SUDANO et al., 2012), o que pode interferir nas taxas de sobrevivência pós criopreservação.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com forskolin e peptídeo natriurético C (NPPC) sobre o desenvolvimento, conteúdo lipídico e níveis de transcritos de genes relacionados com a qualidade e metabolismo celular de embriões *Bos taurus indicus* produzidos *in vitro*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

No mundo a produção *in vitro* de embriões cresce anualmente, devido à elevada demanda por melhoramento genético. Nas últimas décadas, houve um grande progresso científico com relação às biotécnicas envolvendo embriões mamíferos, sendo a espécie bovina a maior beneficiada com este avanço tecnológico (HASLER, 2014).

O conjunto de procedimentos realizados em laboratório recebe o nome de PIVE (produção *in vitro* de embriões) e consiste das seguintes etapas: colheita, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos, bem como cultivo *in vitro* de estruturas embrionárias. Os oócitos utilizados na PIVE podem ser recuperados por aspiração guiada por ultrassom (Ovum Pick Up; OPU; MACHATY; PEIPPO; PETER, 2012), laparoscopia (LAMBERT et al., 1983) e mediante ovários provenientes de animais de abatedouro. A partir desta biotécnica reprodutiva, oócitos imaturos podem ser utilizados para a produção de embriões *in vitro* (VIANA et al., 2010). Para a recuperação destes oócitos em ovários de abatedouro utilizam-se agulhas hipodérmicas e seringas, formando sistema a vácuo, ou através de bomba de pressão negativa.

Estudos correlacionaram a influência do tamanho folicular na qualidade e competência oocitária para a produção *in vitro*, indicando que folículos maiores geram oócitos com melhor competência na PIVE (LONERGAN et al., 1994, SENEDA et al., 2001; MACHATY; PEIPPO; PETER, 2012). Outro ponto a ser considerado na produção *in vitro* são as peculiaridades entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. O número de oócitos recuperados por OPU em *Bos taurus indicus* pode ser 3 a 4 vezes maior, sendo recuperados em média 18-25 oócitos (PONTES et al., 2009) por colheita, sendo que, em fêmeas *Bos taurus*, a média é

4-14 oócitos (MARTINS et al., 2007). Além disto, é sabido que embriões produzidos *in vivo* de taurinos possuem maior acúmulo de lipídeos comparados aos embriões *Bos indicus*, o que reflete negativamente em processos como a criopreservação, devido à formação de gotas lipídicas citoplasmáticas (SUDANO et al., 2014).

Para a produção *in vitro*, são utilizados meios de cultivo, com o intuito de mimetizar o que ocorre fisiologicamente no organismo. No entanto, o meio de cultivo se apresenta como um possível fator interferente nas taxas finais da produção. Desta forma, estudos comprovaram que o meio de cultivo utilizado *in vitro*, pode ser um fator determinante na qualidade dos blastocistos (RIZOS et al., 2003; SUDANO et al., 2011; SANCHES et al., 2013).

Frequentemente, a morfologia embrionária, as taxas de clivagem e de blastocistos são utilizadas como critérios para a avaliação da competência embrionária (ALIKANI et al., 2002). Porém, com o advento de marcadores moleculares e a utilização da expressão gênica global, pode-se estudar, simultaneamente, a abundância de diferentes transcritos relacionados à qualidade e desenvolvimento embrionário e oocitário (GAD et al., 2012). Sendo assim, torna-se evidente que possa ocorrer comprometimento da competência embrionária sem alterações morfológicas perceptíveis. Pesquisas sugerem que um rigoroso controle de qualidade durante todas as etapas da PIVE seja essencial para obter resultados satisfatórios. Desta forma, alguns fatores podem afetar a qualidade embrionária, incluindo as doadoras de oócitos, o sêmen utilizado, técnicos que realizam os procedimentos e, principalmente, o sistema de cultivo *in vitro* (SUDANO; MARINHO; COSTA et al., 2016).

## 2.2 PARTICULARIDADES E ESTRATÉGIAS NO CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Sabe-se que embriões produzidos *in vitro* são diferentes dos embriões produzidos *in vivo* (POLLARD; LEIBO, 1993; SARAGUSTY; ARAV, 2011), o que também tem sido associado às diferenças nas características físicas e morfológicas desses embriões (ABE et al., 2002; GAD et al., 2012). Embriões PIV são mais sensíveis ao resfriamento e criopreservação, principalmente, devido à diferença na proporção de lipídeos e proteínas nestes dois tipos de embriões (SUDANO et al., 2013). Além do maior acúmulo de lipídeos em embriões PIV (DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013), foi relatada uma maior quantidade de vacúolos e menor número de células totais. Conseqüentemente, disco embrionário menor e maior fragilidade da zona pelúcida em embriões PIV quando comparados aos produzidos *in vivo* (CROSIER et al., 2001; DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013).

Além disso, embriões PIV possuem decréscimo na densidade de mitocôndrias quando comparado a embriões *in vivo* (FARIN; FARIN; PIEDRAHITA, 2004), o que explica uma possível deficiência nos processos metabólicos, culminando no acúmulo de ATP (adenosina trifosfato) e lipídeos intracelulares (BARCELO-FIMBRES; SEIDEL Jr, 2007). Em estudo realizado por Ghanem et al. (2011), foi demonstrado diferentes expressões de genes entre embriões PIV e *in vivo*. No entanto, com relação ao metabolismo mitocondrial, foram encontradas similaridades relativas em 18 genes.

Estas diferenças observadas em embriões PIVE tem sido atribuídas, especialmente, ao cultivo *in vitro*, principalmente pela presença da suplementação com soro fetal bovino (SFB), responsável pela maior quantidade de lipídeos no citoplasma embrionário (RIZOS et al., 2002; MOORE et al., 2007; SUDANO et al., 2011). Porém, além da diferença na quantidade de lipídeos citoplasmáticos, o perfil destes lipídeos também se altera na membrana celular. As

proporções encontradas de fosfatidilcolina e esfingomielina, lipídeos presentes em grandes quantidades nas membranas celulares, diferem entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (SUDANO et al., 2012).

Com o auxílio de transcriptoma dos embriões PIV e *in vivo*, tenta-se justificar as diferenças encontradas nas taxas de cultivo e em outras biotécnicas como a criopreservação (CLEMENTE et al., 2011; DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013).

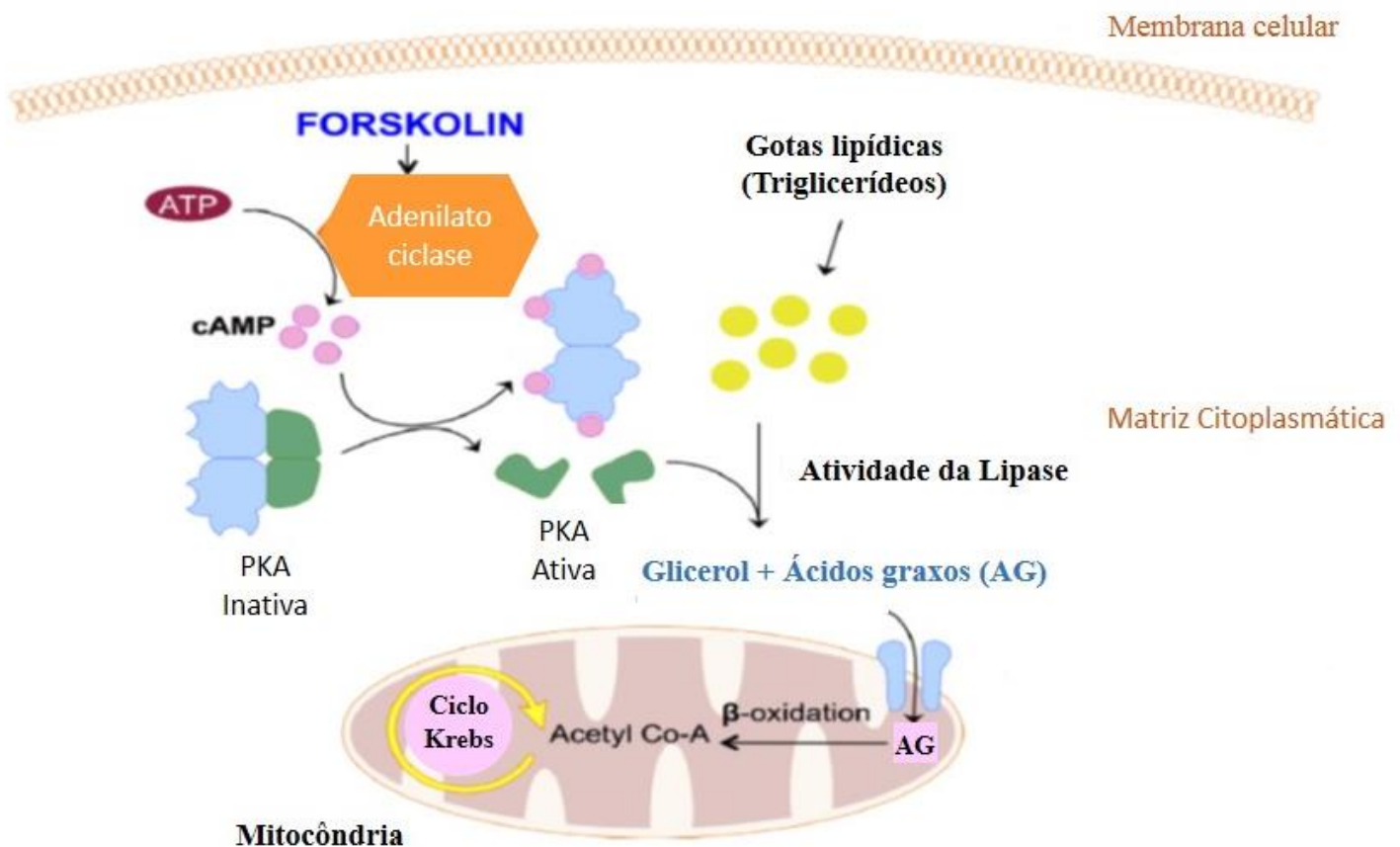
### 2.3 FORSKOLIN

O forskolin é uma substância derivada da planta indiana *Coleus forskohlii*, sendo parte da família dos diterpenos (BILODEAU- GOESEELS, 2006; PASCHOAL et al., 2012). Sua fórmula química é 7 $\beta$ -acetoxo-8,13-epoxo-1 $\alpha$ ,6  $\beta$ ,9 $\alpha$  -trihidroxy-Labd-14-en-11-one (C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>), atuando como ativador da adenilato ciclase, enzima que regula os níveis de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) no interior das células (PASCHOAL et al., 2012; Figura 1).

Em estudo realizado por Men et al. (2006) utilizando 10  $\mu$ M de forskolin no cultivo *in vitro* de embriões suínos, houve redução significativa de lipídeos citoplasmáticos. Além disso, o uso desta substância em embriões bovinos produzidos *in vitro* para criopreservação resultou, após o descongelamento, em taxa de prenhez semelhante à taxa obtida com embriões transferidos a fresco (MARINHO et al., 2015).

Em estudo conduzido por Paschoal et al. (2012), foi relatado que a adição de forskolin no cultivo *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus*, não causou efeito deletério sobre as taxas de cultivo. Porém, no processo de criopreservação, os embriões submetidos a esta substância mostraram-se menos sensíveis à criopreservação, melhorando as taxas de sobrevivência, sem afetar a qualidade embrionária.

**Figura 1** – Possível mecanismo de ação do forskolin em oócitos bovinos, potente ativador da adenilato ciclase, que estimula a atividade da lipase, quebrando os triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos (AG). Atua no ciclo da proteína quinase (PKA) /cAMP.



Fonte: Adaptado de Sudano et al., 2013.

## 2.4 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO C (NPPC)

A existência de fatores atriais diuréticos e a atividade de peptídeos natriuréticos foram primeiramente postulados em 1981 por De Bold e colaboradores. No entanto, somente em 1984 ocorreu o isolamento e a purificação destes fatores revelando sua sequência de aminoácidos em ratos e humanos (KISHIMOTO; ROSSI; GARBERS, 2001). O primeiro fator a ser descoberto foi o peptídeo natriurético atrial ou fator natriurético atrial (NPPA), distribuído, principalmente, pelos átrios cardíacos dentro dos grânulos de miócitos. Sua função, basicamente, é normalizar a volemia sanguínea e a pressão arterial quando a musculatura cardíaca é excessivamente distendida, sendo o mais conhecido e estudado dos peptídeos natriuréticos encontrados.

No ano de 1988, foi descoberto um homólogo com atividade biológica semelhante ao NPPA, o peptídeo natriurético de tipo B (BNP; SUDOH et al., 1988) produzido principalmente nos ventrículos. Após dois anos, em 1990, um terceiro tipo de peptídeo foi isolado e denominado peptídeo natriurético tipo C (NPPC). Inicialmente, foi proposto que ele interagisse somente com o cérebro (MISONO et al., 2011), porém, mais tarde foi evidenciada sua produção em tecidos periféricos, como o endotélio vascular (SUGA et al., 1998), as células musculares lisas e os macrófagos (NARUKO et al., 1996), as células do *cumulus* oócitos (KAWAMURA et al., 2011), entre outros tecidos periféricos, desempenhando uma variedade de funções reguladoras locais (MISONO et al., 2011).

Estes três peptídeos (NPPA, NPPB e NPPC) possuem elevada homologia, sendo que seus respectivos receptores (NPR 1 e 2) estão localizados na superfície da célula alvo (MISONO et al., 2011; DE CESARO et al., 2015). Estes peptídeos apresentam efeitos variados em diferentes tecidos em uma mesma espécie. Desta forma, os NPPA e NPPB

utilizam como comunicação celular o receptor NPR-1, enquanto o NPPC, utiliza como receptor o NPR-2 (POTTER et al., 2009).

O bloqueio da meiose em oócitos ocorre pelo acúmulo de AMPc (adenosina monofosfato cíclica) intracelular (FRANCIOSI et al., 2014) até o momento da maturação, sendo a sua redução um sinal necessário para a maturação oocitária (EYERS et al., 2005). O AMPc é uma molécula sinalizadora intracelular e moduladora no controle da meiose em mamíferos, anfíbios e em alguns invertebrados (BILODEAU-GOESEELS, 2003; DUBEIBE et al., 2017). As células do *cumulus* são responsáveis pela síntese do AMPc que passa para o oócito pelas junções comunicantes (gap junctions; DUBEIBE et al., 2017). Similarmente ao que ocorre *in vivo*, o NPPC já foi utilizado em alguns estudos com o objetivo de elevar os níveis de cAMP intracelular de oócitos na fase de maturação *in vitro* (FRANCIOSI et al., 2014; DE CESARO et al., 2015).

O NPPC se liga em seu receptor de eleição, o NPR-2, presente nas células *cumulus*, estimulando a síntese de guanosina monofosfato cíclico (cGMP). Esta se difunde para o oócito através das junções gap inibindo a fosfodiesterase 3A (PDE3A) e mantendo concentrações elevadas de cAMP. Ocorre diminuição na conversão de cAMP em 5'AMP, com a elevação dos níveis de cAMP fazendo com que a meiose seja bloqueada pelo acúmulo de cAMP intracelular (FRANCIOSI et al., 2014). O NPPC é, principalmente, sintetizado pelas células da granulosa mural e possui receptor presente em grande quantidade nas células do *cumulus* (ZHANG et al., 2010, 2011; KAWAMURA et al., 2011).

A utilização do NPPC, para elevar os níveis de cAMP, ocasionando o bloqueio da meiose em oócitos já é conhecida (ZHANG et al., 2015; DE CESARO et al., 2015). Porém não há relatos sobre a utilização do NPPC na ativação de processos metabólicos em embriões, envolvendo o metabolismo lipídico através do aumento das concentrações de cAMP, com consequente ativação da proteína quinase (PKA).

Desta forma, a partir de estudos evidenciando a ação do NPPC em oócitos de vertebrados, acredita-se ser possível através de receptores presentes na zona pelúcida dos embriões, a interação da molécula NPPC com o embrião.

## 2.5 GENES RELACIONADOS COM O METABOLISMO INICIAL E METABOLISMO ENERGÉTICO EM EMBRIÕES

Com o avanço dos estudos em diferentes áreas da biologia, a avaliação da expressão de genes, relacionados a fisiologia e metabolismo de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* tornou-se fundamental para esclarecer acontecimentos vinculados a seu desenvolvimento (CASTILLO-MARTÍN et al., 2014). Sendo assim, alguns genes relacionados ao metabolismo de substâncias presentes no cultivo *in vitro* e no próprio embrião são importantes para nosso conhecimento.

O gene glutathione peroxidase 1 (glutathione peroxidase 1-GPX1) está vinculado ao desenvolvimento embrionário, relacionado com a redução de hidroperóxidos orgânicos, peróxidos de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013), sendo que o estresse oxidativo também pode influenciar sua expressão (CEKO et al., 2015). Este gene é membro da família de selenoproteínas glutathione peroxidase (GPX), a qual tem sido demonstrada por proporcionar funções antioxidantes (WANG et al., 2016). Juntamente com o selênio (Se), desempenha papel importante em funções como: defesa, formação de hormônios tireoidianos, resposta imune, síntese de DNA, fertilidade e reprodução (CEKO et al., 2015).

O cultivo *in vitro*, tal como outros procedimentos como a vitrificação e aquecimento, foram relatados como influenciadores no estresse de oócitos e blastocistos suínos, devido ao aumento das concentrações de espécies reativas ao oxigênio (ROS), incluindo os níveis de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é então transformado em água por ação da catalase e pela GPX presente no citoplasma e nas mitocôndrias (CASTILLO-MARTÍN et al., 2014).

O gene elemento regulador do esteroide fator 1 de transcrição (sterol regulatory element binding transcription factor 1- SREBF1) e o gene estearil-CoA desaturase delta-9-desaturase (Stearoyl-CoA desaturase delta-9-desaturase; SCD) são elevados na diferenciação celular inicial de embriões (HUTCHINSON et al., 2012) e o acúmulo de lipídeos intracitoplasmáticos nas células pode modular sua expressão gênica. O SREBF1 também está envolvido no metabolismo lipídico por modulação da expressão de genes relacionados com a lipogênese, com elevada importância na maturação *in vitro* (LEE et al., 2016).

O gene aldo-ceto redutase (AKR1B1) está relacionado com o metabolismo da glicose (CEBRIAN-SERRANO et al., 2013), fornecendo energia para a célula. Dode et al. (2006) detectou este gene em embriões bovinos produzidos *in vitro*, relacionado com o metabolismo inicial de possíveis embriões com duas células. A expressão deste gene tem sido associada a falhas no estabelecimento da gestação ou reabsorção do embrião, mostrando importante papel na embriogênese.

Relacionado com a pluripotência em embriões bovinos, o gene POU classe 5 homeobox 1 (POU5F1; Siqueira; Hansen, 2016), se expressa principalmente na massa celular interna (MCI) de blastocistos, sendo utilizado para marcações de embriões em estudos (MORI et al., 2015).

Frequentemente correlacionado com o reconhecimento materno da gestação e com a viabilidade embrionária, quando encontradas altas concentrações de mRNA do gene Interferon tau (IFNT2), pode estar relacionado com o estresse embrionário sofrido através das ROS (RODINA, et al. 2009). Sensível indicador para a qualidade dos embriões PIVE (SCHIFFMACHER; KEEFER, 2013). Elevadas concentrações no período inicial de formação dos embriões pode estar associada a uma qualidade inferior deste embrião. Uma secreção

precoce e elevada de IFNT2 está associada a uma qualidade mais baixa (WRENZYCKI et al., 2001; STINCHOF et al., 2011). Além disso, em comparação direta com os blastocistos gerados *in vivo*, os embriões produzidos *in vitro* mostram um nível de transcrição de IFNT2 aumentado. Em contraste, o estudo realizado por Yao et al (2009) não conseguiu detectar diferenças na expressão de IFNT2 entre embriões gerados *in vitro* e *in vivo* após criopreservação.

O gene heterochromatina proteína 1-alpha (Heterochromatin protein 1-Alpha - HP1) é conhecido por induzir a repressão transcricional e propagação da heterocromatina nos centrômeros (PICHUGIN et al., 2010). Em células somáticas os centrômeros formam blocos globulares de heterocromatina associada a regiões centroméricas contendo proteínas (PRUSOV; ZATZEPINA, 2002). Porém a distribuição de centrômeros pode variar entre espécies, ocorrendo maiores ou menos expressões deste gene. B

O gene derivado do miocárdio e da crista neural expresso 1 (Heart and neural crest derivatives expressed 1- HAND1), está relacionado com os fatores transcricionais do trofoblasto (SCHIFFMACHER; KEEFER, 2013). Sua expressão está vinculada com a diferenciação das células do trofoblasto sendo essencial para o desenvolvimento embrionário (PEARTON et al., 2014).

## REFERÊNCIAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p. 57-66, 2002.

ALIKANI, M.; SADOWY, S.; COHEN, J. Human embryo morphology and developmental capacity. In: A. VAN SOOM, & M. BOERJAN. *Assessment of Mammalian Embryo Quality: Invasive and Non-invasive Techniques* (Eds.). Dordrecht, Netherlands: **Kluwer's Academic Publishers**, p. 1- 31, 2002.

BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL, G. E. JR. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.1406-1418, 2007.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 66, p. 297-306, 2006.

BILODEAU-GOESEELS S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 60, p. 1679-1690, 2003.

CAMARGO, L. S. A.; BOITE, M. C.; WOHLRES-VIANA, S.; MOTA, G. B.; SERAPIAO, R. V.; SA, W. F.; VIANA, J. H. M.; NOGUEIRA, L. A.G. Osmotic challenge and expression

of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, v. 63, p. 256–262, 2011.

CASTILLO-MARTÍN, M.; BONET, S.; MORATÓ, R.; YESTE, M. Supplementing culture and vitrification-warming media with L-ascorbic acid enhances survival rates and redox status of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. **Cryobiology**, v. 68, p. 451–458, 2014.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; GARCÍA-ROSELLO', E.; PERICUESTA, E.; PÉREZ-CEREZALES, S.; GUTIERREZ-ADÁN, A.; COY, P.; SILVESTRE, MA. Effect of the Bovine Oviductal Fluid on In Vitro Fertilization, Development and Gene Expression of In Vitro-Produced Bovine Blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 331–338, 2013.

CEKO, M. J.; HUMMITZSCH, K.; HATZIRODOS, N.; BONNER, W. M.; AITKEN, J. B.; RUSSELL, D. L.; LANE, M.; RODGERS, R. J.; HARRIS, H. H. X-Ray fluorescence imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function. **Metallomics**, v. 7, p. 71-82, 2015.

CLEMENTE, M.; LOPEZ-VIDRIERO, I.; O'GAORA, P.; MEHTA, J. P.; FORDE, N.; GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. **Biology of Reproduction**, v.85, p.285-295, 2011.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1375-1385, 2001.

DE BOLD, A. J.; BORENSTEIN, H. B.; VERESS, A. T.; SONNENBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, v. 28, p. 89–94, 1981.

DE CESARO, M. P.; MACEDO, M. P.; SANTOS, J. T.; ROSA, P. R. A.; LUDKE, C. A.; RISSI, V. B.; GASPERIN, B. G.; GONÇALVES, P. B. D. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 52–59, 2015.

DEMANT, M.; DEUTSCH, D. R.; FROHLICH, T.; WOLF, E.; ARNOLD, G.J. Proteome analysis of early lineage specification in bovine embryos. **Proteomics**, v. 15, p. 688–701, 2015.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; GARDNER, D.K.; PRIEIS, K.; GIBBONS, J.; SEIDEL JR, G.E. Metabolic regulation of in vitro 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.

DIEZ, C.; HEYMAN, Y.; LE BOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J.P. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v. 55, p. 923-936, 2001.

DODE, M. A. N., DUFORT, I., MASSICOTTE, L., SIRARD, M. A., Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 288–297, 2006.

DODE, M.A.N.; LEME, L.O.; SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*: Review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.145-150, 2013.

DUBEIBE, D.F.; CALDAS-BUSSIÈRE, M.C.; MACIEL JR, V.L.; SAMPAIO, W.V.; QUIRINO, C.R.; GONÇALVES, P.B.D.; DE CESARO, M.P.; FAES, M.R.; PAES DE CARVALHO, C.S. L-arginine affects the IVM of cattle cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 88, p. 134–144, 2017.

EYERS, P.A.; LIU, J.; HAYASHI, N.R.; LEWELLYN, A.L.; GAUTIER, J.; MALLER, J.L. Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 24339-24346, 2005.

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v.82, E-Suppl, p.E53-E62, 2004.

FERREIRA, C.R.; SARAIVA, S.A.; CATHARINO, R.R.; GARCIA, J.S.; GOZZO, F.C.; SANVIDO, G.B.; SANTOS, L.F.; LO TURCO, E.G.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; BERTOLLA, R.P.; SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F.V.;

SANGALLI, J.R.; EBERLIN, M.N. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 1218–1227, 2010.

FRANCIOSI, F.; COTICCHIO, G.; LODDE, V.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; FADINI, R.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M. M.; ALBERTINI, D.; LUCIANO, A. M. Natriuretic Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap Junction-Mediated Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91, p. 1–9, 2014.

GAD, A.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M.; TESFAYE, D. Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. **Animal Reproduction Science**, v. 134, p. 76-83, 2012.

GHANEM, N.; SALILEW-WONDIM, D.; GAD, A.; TESFAYE, D.; PHATSARA, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. **Reproduction** 142, 551–564, 2011.

HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, p. 152–169, 2014.

HIRADATE, Y.; HOSHINO, Y.; TANEMURA, K.; SATO, E. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. **Zygote**, p. 1–6, 2013.

IETS, 2013. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals.

**Embryo transfer News Letter**, v.33, 2015.

KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; KAWAMURA, N.; TAKAE, S.; OKADA, A.; KAWAGOE, Y.; MULDER, S.; TERADA, Y.; HSUEH, A. J. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. **Human Reproduction**, v. 26, p. 3094–3101, 2011.

KISHIMOTO, I.; ROSSI, K.; GARBERS, D.L. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. **PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 98, p. 2703–2706, 2001.

LAMBERT, R.D.; BERNARD, C.; RIOUX, J.E.; BÉLAND, R.; D'AMOURS, D.; MONTREUIL, A. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. **Theriogenology**, v. 20, p. 149–61, 1983.

LEE, S.; JIN, J.X.; KHOIRINAYA, C.; KIM, G.A.; LEE, B.C. Lanosterol influences cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro and improves preimplantation development of cloned embryos. **Theriogenology**, v. 85, p. 575–584, 2016.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture in vitro.

**Molecular Reproduction Development**, v. 37, p. 48 -53, 1994.

LOPES, B.C.; MATARIM, D.L.; FRANÇA, M.G.B.; MIZIARA, M.N.; LOPES, P.A.; FRANCO, T. Genética bovina brasileira: mercado internacional e mapeamento das competências e tecnologias mineiras. In: **Edição de Beatriz Cordenonsi Lopes**, p. 110, 2012.

MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. Review. **Theriogenology**, v. 78, p. 937–950, 2012.

MARINHO, L. S. R.; SANCHES, B. V.; ROSA, C. O.; TANNURA, J. H.; RIGO, A. G.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; SENEDA, M. M. Pregnancy Rates to Fixed Embryo Transfer of Vitrified IVP Bos indicus, Bos taurus or Bos indicus X Bos taurus Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 807–811, 2015.

MARTINS, J. R. A.; TAKADA, L.; ABRAHÃO, R.G.; FREITAS, C.P.; CALEGARI, R.S. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promissor para maximizar a produção de embriões bovinos in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.1194-1194, 2007

MEN, H.; AGCA, Y.; RILEY, L.K.; CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology** v. 66, p. 2008-2016, 2006.

MISONO, K. S.; PHILO, J. S.; ARAKAWA, T.; OGATA, C. M.; QIU, Y.; OGAWA, H.; YOUNG, H. S. Structure, signaling mechanism and regulation of natriuretic peptide receptor-guanylate cyclase. **The FEBS Journal**, v. 11, p. 1818–1829, 2011.

MOORE, K.; RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C. J.; KRAMER, J. M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v. 68, p. 1316–1325, 2007.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, p. 1551–1562, 2006.

NARUKO, T.; UEDA, M.; VAN DER WAL, A. C.; VAN DER LOOS, C. M.; ITOH, H.; NAKAO, K.; BECKER, A. E. C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic lesions. **Circulation**, v. 94, p. 3103–3108, 1996.

PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; GUASTALI, M. D.; MAZIERO, R. R. D.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; RASCADO, T. S.; MARTINS JR, A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v. 22, p. 146–157, 2012.

PEARTON, D. J.; SMITH, C. S.; REDGATE, E.; LEEUWEN, J.; DONNISON, M.; PFEFFER, P. L. Elf5 counteracts precocious trophoblast differentiation by maintaining Sox2 and 3 and inhibiting Hand1 expression. **Developmental Biology**, v. 392, p. 344–357, 2014.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S. Comparative cryobiology of in vitro and in vivo derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 287, 1993.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690-697, 2009.

POTTER, L. R.; YODER, A. R.; FLORA, D. R., ANTOS, L. K.; DICKEY, D. M. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. **Handbk. Exp. Pharmacol**, v. 191, p. 341–366, 2009.

PRUSOV, A. N.; ZATSEPINA, O. V. Isolation of the chromocenter fraction from mouse liver nuclei. **Biochemistry**, v. 67, p. 423–431, 2002.

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 320-327, 2002.

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

SANCHES, B.V.;MARINHO, L. S. R.; FILHO, B. D. O.; PONTES, J. H. F.; BASSO, A. C.; MEIRINHOS, M. L. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; FERREIRA, C. R.; SENEDA, M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived Bos indicus embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, p. 372–377, 2013.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, p. 1-19, 2011.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M. de Oliveira, JA, Vantini, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43, 2001.

SCHIFFMACHER, A. T.; KEEFER, C. L. CDX2 Regulates Multiple Trophoblast Genes in Bovine Trophectoderm CT-1 Cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, p. 826–839, 2013.

SIQUEIRA, L. G. B.; HANSEN, P. J. Sex differences in response of the bovine embryo to colony-stimulating factor 2. **Reproduction**, v. 152, p. 645–654, 2016.

STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BRÜNING, K.; WRENZYCKI, C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76, p. 1433–1441, 2011.

SUDANO, M. J.; CAIXETA, E. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS, A.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 1129-1141, 2014.

SUDANO, M. J.; MARINHO, L. S. R.; COSTA, C. B.; CANCIAN, R. Cryopreservation of bovine embryos. In: SENEDA, M. M.; SILVA-SANTOS K. C.; MARINHO, L. S. R. **Biotechnology of Animal Reproduction**. 1ª Edição, Nova Science Publishers, Inc, New York, p. 193-216, 2016.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; MAZIERO, R. R. D.; RASCADO, T. S.; GUASTALI, M. D.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; MONTEIRO, B. A.; MARTINS JR, A.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Animal Reproduction**, v.10, p.160-167, 2013.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *bos taurus indicus* and *bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 87, p. 1–11, 2012.

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

SUDOH, T.; KANGAWA, K.; MINAMINO, N.; MATSUO, H. A new natriuretic peptide in porcine brain. **Nature**, v. 332, p. 78–81, 1988.

SUGA, S.; ITOH, H.; KOMATSU, Y.; ISHIDA, H.; IGAKI, T.; YAMASHITA, J.; DOI, K.; CHUN, T. H.; YOSHIMASA, T.; TANAKA, I. Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide by interaction between endothelial cells and macrophages. **Endocrinology**, v. 139, p. 1920–1926, 1998.

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

TSUJI, T., KIYOSU, C., AKIYAMA, K., KUNIEDA, T., 2012. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, p. 795–802, 2012.

VIANA J.H.M.; PALHAO M.P.; SIQUEIRA, L.G.B.; FONSECA J.F.; CAMARGO L.S.A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 73, p. 966–972, 2010.

WANG, Q.; HUANG, J.; ZHANG, H.; LEI, X.; DU, Z.; XIAO, C.; CHEN, S.; REN, F. Selenium Deficiency-Induced Apoptosis of Chick Embryonic Vascular Smooth Muscle Cells and Correlations with 25 Selenoproteins. **Biological Trace Element Research**, 2016.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A. JR.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v.16, p. 893–901, 2001.

YAO, N.; WAN, P. C.; HAO, Z. D.; GAO, F. F.; YANG, L.; CUI, M. S.; WU, Y.; LIU, J. H.; LIU, S.; CHEN, H.; ZENG, S. M. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 132–139, 2009.

ZHANG, M.; SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; XIA, G.; EPPIG, J. J. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natri-uretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v. 152, p. 4377–4385, 2011.

ZHANG, M.; SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; XIA, G.; EPPIG, J. J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v. 330, p. 366–369, 2010.

ZHANG, W.; YANG, Y.; LIU, W.; CHEN, Q.; WANG, H.; WANG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; XIA, G. Brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide maintain porcine oocyte meiotic arrest. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, p. 71–81, 2015.

### 3. HIPÓTESE

---

A adição de Forskolin ou Peptídeo Natriurético C (NPPC) influencia a expressão gênica e a síntese de lipídios de embriões *Bos taurus indicus* produzidos *in vitro*.

## 4. OBJETIVOS

---

### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do Forskolin e do Peptídeo Natriurético C (NPPC) no cultivo *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus*.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar as taxas de blastocisto e eclosão de embriões *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* na presença ou ausência de Forskolin ou NPPC;
- Comparar a concentração lipídica de embriões *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro*, por meio da coloração Preto Sudão B na presença ou ausência de Forskolin ou NPPC;
- Comparar a expressão dos genes GPX1, SREBF1, POU5F1, AKR1B1, HAND1, HP1, IFNT2, SCD em embriões *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* na presença ou ausência Forskolin ou NPPC.

## 5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

---

### COMPARAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* DE VACAS *Bos taurus indicus* CULTIVADOS COM FORSKOLIN OU PEPTÍDEO NATRIURÉTICO C

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná,

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com forskolin e peptídeo natriurético C (NPPC) sobre o desenvolvimento, conteúdo lipídico e níveis de transcritos de genes relacionados com a qualidade e metabolismo celular de embriões *Bos taurus indicus* produzidos *in vitro*. Para o cultivo *in vitro* foram utilizados ovários (n = 420) de 210 fêmeas Nelore, coletados de abatedouro local e transportados em solução salina a 30-35° C até o laboratório. Os oócitos foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*. No dia 5 (D5) de cultivo *in vitro* os embriões foram divididos em três grupos experimentais e adicionadas as substâncias no meio de cultivo; grupo controle, forskolin (10 µM) e NPPC (100 nM). As taxas de blastocisto e eclosão foram avaliadas em D7, D9 e D10. Para a avaliação da concentração lipídica, foram coletados blastocistos (D7; n=10 /grupo) e corados com o corante Preto Sudão B. As expressões dos genes GPX1, SREBF1, POU5F1, AKR1B1, HAND1, HP1, IFNT2 e SCD foram analisadas por qRT-PCR. Para a análise estatística das taxas de cultivo *in vitro* foi utilizado o teste ANOVA do sistema SAS (p=0,09); para o conteúdo lipídico, foi utilizado o teste ANOVA, seguido de teste Tukey (p>0,05); na análise das expressões gênicas, foi utilizado software JMP. As taxas de blastocisto entre os grupos, foram 39,5 % no grupo controle; 37,9 % grupo forskolin e 44,4 no NPPC. As taxas de eclosão em D9 e D10 foram respectivamente, grupo controle (43,5 %; 48,4%), forskolin (55,7%; 62,9%) e NPPC (54,6%; 63,9%; p=0,09). A concentração lipídica nos tratamentos foram de 883 UA (unidade arbitrária) grupo controle; 772 UA grupo

forskolin e 881UA no grupo NPPC ( $p>0,05$ ); concentração lipídica/área ( $UA \times 10^{-10}/\mu m^2$ ) foi de  $1,1 \pm 0,8$  no grupo controle;  $0,9 \pm 0,7$  no grupo forskolin e  $1,0 \pm 0,6$  no grupo NPPC; concentração lipídica/volume ( $UA \times 10^{-13}/\mu m^3$ )  $5,4 \pm 4,7$ ;  $4,3 \pm 4,0$  e  $4,6 \pm 2,9$  nos grupos controle, forskolin e NPPC ( $p>0,05$ ). Em nosso estudo, os genes avaliados demonstraram diferentes respostas de acordo com a substância submetida *in vitro* ( $p=0,09$ ). Os genes POU5F1, HP1 e HAND1 obtiveram elevadas concentrações de transcritos nos embriões do grupo controle e NPPC. O gene AKR1B1, obteve uma concentração de RNAm semelhante entre os tratamentos, sendo que os embriões tratados com forskolin se assemelharam aos embriões submetidos ao NPPC; e os embriões submetidos ao tratamento com o NPPC obtiveram abundância relativa de transcritos similar ao grupo controle ( $p=0,09$ ). Os transcritos do gene GPX1 obtiveram concentrações semelhantes no grupo controle, forskolin e NPPC. Genes relacionados com o metabolismo de lipídeos, SREBF1 e SCD, apresentaram diferenças nas concentrações de transcritos. Com relação do gene IFNT2, foi evidenciado maiores concentrações em embriões tratados com forskolin e NPPC. Como conclusão, não houve diferença entre as taxas de blastocisto. As taxas de eclosão em D10 foram maiores nos embriões tratados com forskolin ou NPPC. A concentração lipídica dos embriões submetidos ao cultivo *in vitro* sem qualquer substância, com forskolin ou com NPPC mostrou-se constante. Entretanto, os genes estudados apresentaram diferentes quantidades de transcritos de acordo com o tratamento submetido, mostrando assim efeito do tratamento sob o desenvolvimento inicial dos embriões, metabolismo celular relacionado com obtenção de energia e possível metabolização dos lipídeos.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*, cultivo *in vitro*, transcritos, metabolismo celular.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) possui destaque no cenário mundial, sendo produzidos cerca de 546.628 mil de embriões *in vitro* por ano (IETS, 2015). Com a crescente comercialização de embriões, torna-se necessária a criopreservação destes embriões. Porém a criopreservação apresenta-se como uma das áreas com maiores desafios, devido a inconstância de resultados (MARINHO et al., 2015).

Esta baixa eficiência nos processos de criopreservação de embriões *in vitro*, pode estar relacionada com diferentes fatores como a maior concentração de lipídeos presentes em embriões *in vitro*, comparado aos embriões *in vivo* (MUCCI et al., 2006; CAMARGO et al., 2011); meios utilizados no cultivo *in vitro*, tais como soro fetal bovino (SFB; MOORE et al., 2007; SUDANO et al., 2011); diferenças no metabolismo celular de embriões produzidos *in vitro* (GHANEM et al., 2011); e, ainda, diferença entre embriões derivados de animais *Bos taurus* e *Bos indicus* (SUDANO et al., 2012).

Desta forma, substâncias como forskolin (PASCHOAL et al., 2012), etossulfato de fenazina (SUDANO et al., 2011) e L-carnitina (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), juntamente com a utilização de meios “serum free” foram utilizados com o intuito de diminuir a concentração de lipídeos de embriões PIV. O Peptídeo Natriurético C (NPPC) também é uma substância utilizada na maturação *in vitro* e sua ação amplamente estudada está relacionada com o bloqueio da meiose em oócitos através do acúmulo de cAMP (adenosina monofosfato cíclica) intracelular (FRANCIOSI et al., 2014). Porém não há relatos sobre a utilização do NPPC na ativação de processos metabólicos, envolvendo o metabolismo lipídico através do aumento das concentrações de cAMP, com consequente ativação da proteína quinase (PKA).

Com o avanço dos estudos em diferentes áreas da biologia, a avaliação da expressão de genes, relacionados a fisiologia e metabolismo de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* tornou-se fundamental para esclarecer acontecimentos vinculados a seu desenvolvimento (CASTILLO-MARTÍN et al., 2014). Sendo assim, genes relacionados ao metabolismo de substâncias presentes no cultivo *in vitro* e no próprio embrião são importantes para nosso conhecimento.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com forskolin e peptídeo natriurético C (NPPC) sobre o desenvolvimento, conteúdo lipídico e níveis de transcritos de genes relacionados com a qualidade e metabolismo celular de embriões *Bos taurus indicus* produzidos *in vitro*.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Animais, recuperação oocitária e maturação *in vitro* (MIV)

Ovários (n = 420) de 210 fêmeas *Bos taurus indicus* foram coletados em abatedouro local e transportados em solução salina 0,9% a 30-35°C até o laboratório (trajeto de duração média de 20 minutos). Os complexo *cumulus* oophorus (CCOs) foram aspirados de folículos antrais utilizando-se agulhas hipodérmicas 21-gauges (30x8 mm) acopladas a seringas de 10 ml. Somente os CCOs circundados por um mínimo de 3 camadas de células do *cumulus* e com citoplasma homogêneo (graus 1 e 2, SENEDA et al., 2001) foram selecionados para a MIV, totalizando 1300 CCOs cultivados. Grupos de 10 a 15 CCOs foram cultivados por 20 a 24 horas, em 100 µL de meio de maturação, atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em ar e umidade saturada a 38.5°C. O meio de maturação consistiu de TCM-199 bicarbonato, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 5 µg de hormônio luteinizante, 0,5 µg de hormônio

folículo estimulante, 1 µg de estradiol, 2,2 µg de piruvato e 50 µg de gentamicina/mL de meio (In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, SP).

### 5.2.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

Após maturação, os CCOs foram lavados em meio TCM-199 tamponado com Hepes e transferidos para gotas de 100 µL do meio de fecundação, que consistia em Tris-buffered medium (TBM) suplementado com 8 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos e 1 mM de glutamina (In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, SP).

Para a fecundação, foi utilizado sêmen de um único touro armazenado em nitrogênio líquido, descongelado a 35°C e selecionado de acordo com o método de Percoll (PARRISH et al., 1995), e a concentração espermática foi ajustada para a obtenção de uma concentração final de  $1 \times 10^6$  spz vivos/gota de 10 a 15 CCOs. Espermatozoides e CCOs foram incubados por 22 horas em meio de fecundação sob óleo mineral a 38.5°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. O dia da fertilização foi considerado o dia zero (D0).

### 5.2.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

Para o cultivo *in vitro*, os prováveis zigotos foram submetidos à remoção das células do *cumulus* por pipetagens sucessivas e foram incubados em meio SOF (Synthetic oviduct fluid) suplementado com 8 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos, sob óleo mineral, a 38.5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada. Após três (D3) e cinco (D5) dias de cultivo foi realizada a substituição de 50% do meio de cultivo por meio fresco (1° *feeding*) com o mesmo meio utilizado inicialmente. No dia 5 (D5), os embriões foram divididos aleatoriamente em três grupos (Figura 1). Os embriões do grupo controle permaneceram no meio SOF glicosado

(2° feeding) sem adição de outras substâncias, os embriões do Grupo Forskolin foram expostos a 10  $\mu$ M de forskolin (7b-acetoxy-8,13-epoxy-1a,6b,9a-trihydroxy-14-en-11-one, C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub>; MARINHO et al., 2015) e os embriões do Grupo NPPC foram expostos a 100 nM de peptídeo natriurético C (FRANCIOSI et al., 2014). As taxas de clivagem, blastocisto e eclosão foram avaliada em D3, D7, D9 e D10, respectivamente.

#### 5.2.4 Avaliação semi-quantitativa para lipídeos

Blastocistos expandidos dos Grupos controle, forskolin e NPPC (D7; n=10 /grupo) foram selecionados aleatoriamente durante as repetições experimentais e corados com Preto Sudão B, um corante lipofílico, conforme descrito por Sudano et al. (2012). Os embriões foram fixados em solução de formaldeído a 10% (diluído em PBS- pH 7,4), por 2 horas, em temperatura ambiente, lavados em água destilada com 0,05% de álcool polivinil (PVA) e transferidos para gotas com etanol 50%. Após 2 minutos, os embriões foram transferidos para gotas com solução de Preto Sudão 1% (w/v) diluído em etanol 70% por 1-2 minutos. Posteriormente foram lavados em três banhos de 5 minutos em etanol 50%. Em seguida, foram lavados em água destilada com 0,05% PVA (álcool polivinílico). Para a montagem das lâminas, foram utilizados 10  $\mu$ L de glicerol, seguida de avaliação por microscopia de luz. Para a estimativa do conteúdo lipídico, foram feitas imagens e submetidas ao Software Image J 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). As imagens dos embriões foram convertidas em escala de cinza e foram delimitados para obtenção da área ( $\mu$ m<sup>2</sup>) pela intensidade média de cinza (unidade arbitrária). Os cálculos da intensidade de cinza por área (unidades arbitrárias/  $\mu$ m<sup>2</sup>), a mesma foi convertida em intensidade de cinza por volume (unidade arbitrária /  $\mu$ m<sup>3</sup>), usando a fórmula: intensidade de cinza / volume = (intensidade de cinza/ área)<sup>1,5</sup>.

### 5.2.5 Análise de transcritos de RNAm

A análise de transcritos de RNAm em embriões foi realizada utilizando o ensaio com a sonda TaqMan (20X, Applied Biosystems), específico para espécie *Bos taurus*. A abundância de RNAm de 47 genes foi analisada, no entanto 8 genes de maior interesse para nosso estudo foram selecionados conforme indicado na Tabela 1, de acordo com as categorias funcionais. Antes do ciclo térmico de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time quantitative Polymerase Chain Reaction – qRT-PCR), cada amostra foi submetida a um processo de pré-amplificação específico da sequência, como segue: mistura de ensaio de 1,25 µL (o ensaio TaqMan foi reunido até uma concentração final de 0,2X para cada um dos 47 ensaios), 2,5 µL de TaqMan PreAmp Master Mix Applied Biosystems) e 1,25 µL de cDNA. As reações foram ativadas a 95°C, durante 10 minutos, seguido de desnaturação a 95°C, durante 15 segundos, e reaquecimento e amplificação a 60°C, durante 4 minutos, durante 14 ciclos. Estes produtos pré-amplificados foram diluídos 5 vezes antes da análise RT-qPCR.

Para a análise da expressão gênica, a solução de amostra preparada consistiu em 2,25 µL de cDNA (produtos pré-amplificados), 2,5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2X, Applied Biosystems) e 0,25 µL de Reagente de carregamento de amostra 20X (Fluidigm); e a solução de ensaio: 2,5 µL de 20X TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) e 2,5 µL de Reagente de carregamento de ensaio 2X (Fluidigm). O *chip* 96.96 Dynamic Array™ Integrated Fluidic Circuits (Fluidigm) foi usado para a coleta de dados. Após a impregnação, o *chip* foi carregado com 5 µL de cada solução de ensaio e 5 µL de cada solução de amostra. O ciclo térmico de qPCR foi realizado no sistema Biomark HD (Fluidigm, São Francisco Sul, CA, EUA), utilizando o protocolo TaqMan GE 96x96 Standard, que consistiu de 5 minutos de ativação enzimática inicial a 95°C, seguido de 40

ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (95°C, por 15 segundos, seguido por 60°C, por 60 segundos). Todas as análises foram realizadas em duplicado e os valores de Ct foram calculados a partir da plataforma do sistema (Biomark Real-time PCR Analysis, Fluidigm). A beta actina (ACTB) e a succinato desidrogenase (SDHA) foram selecionadas como os genes de manutenção mais estáveis (gene ‘housekeeping’). Os valores de expressão relativos para cada gene foram calculados com o método de  $\Delta\Delta C_t$  utilizando uma amostra de controle como calibrador (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

### 5.2.6 Análise estatística

Para as taxas de blastocistos e eclosão, foram utilizados teste de regressão logística e teste ANOVA com auxílio do comando de contraste da probabilidade das diferenças (Glimmix) no sistema SAS ( $p=0,09$ ). Para a análise de conteúdo lipídico pela técnica de preto Sudão, foi utilizado o teste ANOVA, seguido de Tukey (Action 3.2 versão do R 3.0.2. Campinas, SP, Brasil). Na análise das abundâncias dos transcritos de RNAm com sonda TaqMan e plataforma Biomark, foi utilizado o software JMP (Versão 7.0, Inst. SAS, USA).

## 5.3 RESULTADOS

### *Cultivo in vitro*

Foram cultivados 1300 prováveis zigotos, obtendo taxa de clivagem (D3) de 82,6% (1300/1573). As taxas de blastocisto (D7) foram 39,5 % (177/447) no grupo controle; 37,9 % (164/432) grupo forskolin e 44,4 (187/421) no NPPC; as taxas de eclosão em D9 e D10 foram

respectivamente, grupo controle (43,5 %; 48,4%), forskolin (55,7%; 62,9%) e NPPC (54,6%; 63,9%;  $p=0,09$ ; Tabela 2).

#### *Conteúdo lipídico pela técnica do Preto Sudão*

O conteúdo lipídico através da conversão das imagens para escala de cinza, mensurando a intensidade de cinza; intensidade de cinza/ volume e intensidade de cinza/área (Figura 2), dos embriões *Bos taurus indicus*, produzidos *in vitro* dos grupos Controle, Forskolin e NPPC estão apresentados na Tabela 3 ( $p>0,05$ ).

#### *Análise de transcritos de RNAm*

A abundância relativa dos transcritos de RNAm para os genes GPX1, SREBF1, POU5F1, AKR1B1 e HAND1, em embriões *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* variou entre os tratamentos (grupos controle, forskolin e NPPC;  $p=0,06$ ; Figura 3; Figura 4; Figura 5).

### **5.4 DISCUSSÃO**

No presente estudo foi avaliada a influência do forskolin ou NPPC no cultivo *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus*, sobre as taxas de cultivo, conteúdo lipídico e níveis de transcritos de RNAm para genes relacionados com metabolismo embrionário inicial e energético.

Em nosso estudo as taxas de blastocisto dos grupos controle, forskolin e NPPC não apresentaram diferenças estatísticas. No entanto, com relação as taxas de eclosão no dia 10

(D10) de cultivo, foi observado que os embriões tratados com forskolin e NPPC obtiveram maior número de embriões eclodidos, quando comparados ao grupo controle.

Isto demonstra que estas substâncias podem ser utilizadas no cultivo *in vitro* sem que ocorra um demérito na produção, não interferindo negativamente nas taxas blastocisto. Resultados similares foram encontrados em outros estudos avaliando taxas de prenhez e melhor resposta após processo de congelamento, que observaram que a adição de forskolin no cultivo *in vitro* não interferiu negativamente as taxas de produção, porém no processo de criopreservação os embriões apresentaram melhores taxas após o descongelamento e maiores taxas de prenhez (SANCHES et al., 2013; PASCHOAL et al., 2012). No entanto com relação as taxas de eclosão, notou-se um maior número de embriões que eclodiram no dia 10 de cultivo em embriões tratados com forskolin e NPPC, fato este que pode estar relacionado com uma competência embrionária superior destes embriões, que estariam aptos para a implantação no útero materno.

Considerando a coloração com o corante lipofílico preto Sudão B, não foi observada diferença nas concentrações lipídicas entre os grupos controle, forskolin e NPPC. A concentração de lipídeos e sua localização no citoplasma de embriões já foi relatado em outros estudos (TOMINAGA et al., 2000; SUDANO et al., 2012), porém este é o primeiro estudo a comparar o efeito do forskolin ou NPPC sob a concentração lipídica de embriões bovinos cultivados *in vitro*. Em estudo realizado por Sudano et al. (2012), houve a comparação entre embriões *Bos taurus indicus* (Nelore) com *Bos taurus taurus* (Simmental), observando diferença entre as concentrações de lipídeos por área e lipídeos por volume. No entanto, não podemos comparar nossos resultados com os resultados de outros estudos, pois fatores como substância utilizada, dias de exposição do embrião a substância e utilização de uma substância nova, o NPPC, que não há relatos sobre seu efeito na fase de cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Um importante fator a ser considerado, é a concentração das substâncias

adicionadas no cultivo. A utilização de 10  $\mu$ M de forskolin já foi comprovada sua ação em embriões produzidos *in vitro* (SANCHES et al., 2013) possivelmente diminuindo a concentração de lipídeos e elevando as taxas de prenhez. No entanto a concentração utilizada de 100 nM de NPPC, não foi utilizada anteriormente no período de cultivo *in vitro* de embriões, apenas utilizada no período de maturação de embriões de diferentes espécies (TSUJI et al., 2012; HIRADATE et al., 2013; FRANCIOSI et al., 2014; DE CESARO et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Em nosso estudo, os genes avaliados demonstraram diferentes respostas de acordo com a substância submetida *in vitro*. A abundância de transcritos dos genes relacionados com pluripotência, repressão e propagação da heterocromatina nos centrômeros, juntamente com fatores transcricionais do trofoblasto como POU5F1, HP1 e HAND1 obtiveram elevadas concentrações nos embriões do grupo controle e NPPC. Fato este demonstra uma possível melhoria principalmente na divisão celular, no material genético, evidenciando multiplicação celular inicial dos embriões.

O gene AKR1B1, relacionado com o fornecimento de energia para a célula através do metabolismo da glicose (CEBRIAN-SERRANO et al., 2013), obteve uma concentração de RNAm semelhante entre os tratamentos, sendo que os embriões tratados com forskolin se assemelharam aos embriões submetidos ao NPPC; e os embriões submetidos ao tratamento com o NPPC obtiveram abundância relativa de transcritos similar ao grupo controle. Em um estudo realizado por Dode et al. (2006) foi detectado este gene em embriões bovinos produzidos *in vitro*, relacionado com o metabolismo inicial de possíveis embriões com duas células.

Relacionado com a redução de hidroperóxidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio, o gene GPX1 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013) mostrou concentrações semelhantes no grupo controle, forskolin e NPPC. Este gene é característico de embriões produzidos *in*

*vitro* pois está associado com o estresse ambiental no qual o embrião *in vitro* é exposto (LEESE, et al., 2008; SUDANO et al., 2013) levando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse oxidativo.

Com relação a genes relacionados com o metabolismo de lipídeos pelas células, sendo encontrados em alta concentração na fase inicial de diferenciação celular de embriões (HUTCHINSON et al., 2012), SREBF1 e SCD, apresentaram diferenças nas concentrações de transcritos comparando os tratamentos submetidos, demonstrando assim uma possível variação na metabolização de lipídeos de acordo com os embriões avaliados.

Frequentemente correlacionado com o reconhecimento materno da gestação e com a viabilidade embrionária, quando encontradas altas concentrações de mRNA do gene IFNT2, pode estar relacionado com o estresse embrionário sofrido através das ROS (RODINA, et al. 2009; SCHIFFMACHER; KEEFER, 2013). No entanto, um estudo realizado por Yao et al (2009) não conseguiu detectar diferenças na expressão de IFNT2 entre embriões gerados *in vitro* e *in vivo* após criopreservação.

Em nosso estudo foi evidenciado maiores concentrações de transcritos deste gene em embriões tratados com forskolin e NPPC. Embora os estudos citados anteriormente vinculem altas concentrações de IFNT2 a pior qualidade embrionária, em nosso estudo não pode ser afirmado este fato, pois os embriões submetidos as duas substâncias mantiveram seu desenvolvimento normal.

Estudos já foram realizados utilizando o NPPC na maturação *in vitro* de oócitos de diferentes espécies (TSUJI et al., 2012; HIRADATE et al., 2013; FRANCIOSI et al., 2014; DE CESARO et al., 2015; ZHANG et al., 2015), no entanto, não há estudos que demonstram a ação do NPPC no metabolismo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Sua ação no bloqueio da meiose já foi estudado em oócitos de suínos, ratos e bovinos (HIRADATE et al., 2013; FRANCIOSI et al., 2014; DE CESARO et al., 2015; ZHANG et al., 2015), porém foi

relatado também seu efeito em outros tecidos do sistema reprodutivo como no oviduto de ratas, no flagelo de espermatozoides, aumentando as concentrações de cálcio e auxiliando na fecundação (KONG et al., 2017).

Seu mecanismo hipotético de ação, proposto por nosso estudo, vislumbra a diminuição de lipídeos intracitoplasmáticos nos embriões, através de possíveis receptores de NPPC presentes na zona pelúcida dos embriões, com consequência, o aumento das concentrações de guanosina monofosfato cíclica (cGMP), inibição da fosfodiesterase 3A (PDE3A). Com a inibição da PDE3A, ocorreria elevações dos níveis de cAMP, ativação da proteína quinase. A proteína quinase exerceria função sobre a atividade da lipase, com consequência, os triglicerídeos seriam desdobrados em glicerol e ácidos graxos, ocorrendo uma ‘delipidação’ na célula.

Em conclusão, a utilização do Forskolin e NPPC no cultivo *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus* evidenciou diferenças nos genes relacionados ao metabolismo inicial e lipídico. Sendo o efeito destas substâncias benéfico para o cultivo *in vitro* de embriões bovinos. As taxas de blastocistos mantiveram-se constantes porém as taxas de eclosão no dia 10 de cultivo obteve resultados promissores no embriões tratados com forskolin e NPPC. A concentração lipídica nos embriões não diferiu com a utilização do forskolin e NPPC, no entanto este é o primeiro estudo a comparar a utilização do NPPC no cultivo *in vitro* para ativação de processos metabólicos já conhecidos com a utilização do Forskolin.

## 5.5 REFERÊNCIAS

BARCELO´ -FIMBRES, M.; SEIDEL JR, G. E. Effects of Either Glucose or Fructose and Metabolic Regulators on Bovine Embryo Development and Lipid Accumulation In Vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p.1406–1418, 2007.

CAMARGO, L. S. A.; BOITE, M. C.; WOHLRES-VIANA, S.; MOTA, G. B.; SERAPIAO, R. V.; SA, W. F.; VIANA, J. H. M.; NOGUEIRA, L. A.G. Osmotic challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, v. 63, p. 256–262, 2011.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; GARCÍA-ROSELLO´, E.; PERICUESTA, E.; PÉREZ-CEREZALES, S.; GUTIERREZ-ADÁN, A.; COY, P.; SILVESTRE, MA. Effect of the Bovine Oviductal Fluid on In Vitro Fertilization, Development and Gene Expression of In Vitro-Produced Bovine Blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 331–338, 2013.

DE CESARO, M. P.; MACEDO, M. P.; SANTOS, J. T.; ROSA, P. R. A.; LUDKE, C. A.; RISSI, V. B.; GASPERIN, B.G.; GONÇALVES, P.B. D. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 159, p. 52–59, 2015.

DODE, M. A. N., DUFORT, I., MASSICOTTE, L., SIRARD, M. A., Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 288–297, 2006.

FRANCIOSI, F.; COTICCHIO, G.; LODDE, V.; TESSARO, I.; MODINA, C. S.; FADINI, R.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M.M.; ALBERTINI, D.F.; LUCIANO, A. M. Natriuretic Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap Junction-Mediated Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 91, p. 1–9, 2014.

GHANEM, N.; SALILEW-WONDIM, D.; GAD, A.; TESFAYE, D.; PHATSARA, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. **Reproduction** 142, 551–564, 2011.

HUTCHINSON, I. A.; HENNESSY, A. A.; WATERS, S. M.; DEWHURST, R. J.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T. Effect of supplementation with different fat sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle. **Theriogenology**, v. 78, p. 12–27, 2012.

IETS, 2013. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo transfer News Letter**, v.33, 2015.

KONG, N.; Xu, X.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Hao, X.; Zhao, Y.; Qiao, J.; Xia, G.; Zhang, M. Natriuretic peptide type C induces sperm attraction for fertilization in mouse. **Scientific Reports Nature**, January, 2017.

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

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MARINHO, L.S.R.; SANCHES, B.V.; ROSA, C.O.; TANNURA, J.H.; RIGO, A.G.; BASSO, A.C.; PONTES, J.H.F.; SENEDA, M.M. Pregnancy Rates to Fixed Embryo Transfer of Vitrified IVP Bos indicus, Bos taurus or Bos indicus 3 Bos taurus Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 807–811, 2015.

MEN, H.; AGCA, Y.; RILEY, L.K.; CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology** v. 66, p. 2008-2016, 2006.

MOORE, K.; RODRÍGUEZ-SALLABERRY, C. J.; KRAMER, J. M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v. 68, p. 1316–1325, 2007.

MORI, M.; HAYASHI, T.; ISOZAKI, Y.; TAKENOUCI, N.; SAKATANI, M. Heat shock decreases the embryonic quality of frozen-thawed bovine blastocysts produced in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, p. 423-429, 2015.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, p. 1551–1562, 2006.

NORRIS, R. P.; RATZAN, W. J.; FREUDZON, M.; MEHLMANN, L. M.; KRALL, J.; MOVSESIAN, M. A.; WANG, H.; KE, H.; NIKOLAEV, V. O.; JAFFE, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, p. 1869–1878, 2009.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

PASCHOAL, D. M.; MAZIERO, R. R. D.; SUDANO, M. J.; GUASTALI, M. D.; VERGARA, L. E.; CROCOMO, L. F.; LIMA-NETO, J. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; MONTEIRO, B. A.; RASCADO, T. S.; Martins Jr, A.; LEAL, C. L. V.; Landim-Alvarenga, F. C. In vitro embryos production after oocytes treatment with forskolin. **Zygote**, v. 24, p. 161–171, 2015.

PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; GUASTALI, M. D.; MAZIERO, R. R. D.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; RASCADO, T. S.; MARTINS JR, A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v. 22, p. 146–157, 2012.

PICHUGIN, A.; BOURHIS, D. L.; ADENOT, P.; LEHMANN, G.; AUDOUAR, C.; RENARD, J. P.; VIGNON, X.; BEAUJEAN, N. Dynamics of constitutive heterochromatin: two contrasted kinetics of genome restructuring in early cloned bovine embryos. **Reproduction**, v. 139, p. 129–137, 2010.

RODINA, T. M.; COOKE, F. N.; HANSEN, P. J.; EALY, A. D. Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 173-188, 2009.

SANCHES, B.V.; MARINHO, L. S. R.; FILHO, B. D. O.; PONTES, J. H. F.; BASSO, A. C.; MEIRINHOS, M. L. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; FERREIRA, C. R.; SENEDA, M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, p. 372–377, 2013.

SASSEVILLE, M.; ALBUZ, F. K.; CÔTÉ, N.; GUILLEMETTE, C.; GILCHRIST, R. B.; RICHARD, F. J. Characterization of Novel Phosphodiesterases in the Bovine Ovarian Follicle. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 415–425, 2009.

SCHIFFMACHER, A. T.; KEEFER, C. L. CDX2 Regulates Multiple Trophoblast Genes in Bovine Trophectoderm CT-1 Cells. **Molecular Reproduction & Development**, v. 80, p. 826–839, 2013.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, 2001, 67:37-43.

SUDANO, M. J.; ESTER, A. F.; CAIXETA, B. S.; PASCHOAL, D. M.; MARTINS JR, A. C.; MACHADO, R. D.; BURATINI, J. E.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 1129-1141, 2013.

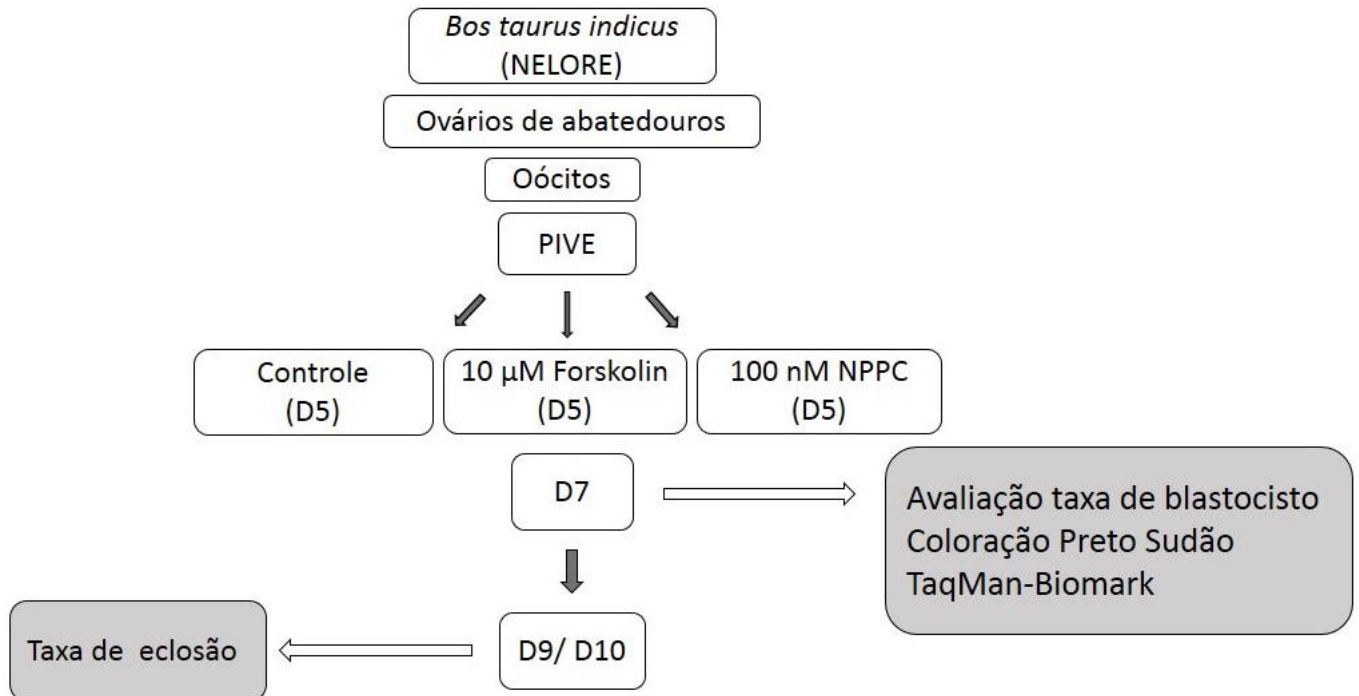
SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; RASCADO, T. S.; MAGALHÃES, L. C.; CROCOMO, L. F.; DE LIMA-NETO, J. F.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Lipid content and apoptosis of in vitroproduced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v.75, p. 1211-1220, 2011.

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M. N.; LANDIM ALVARENGA F. D. C. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 87, p. 1–11, 2012.

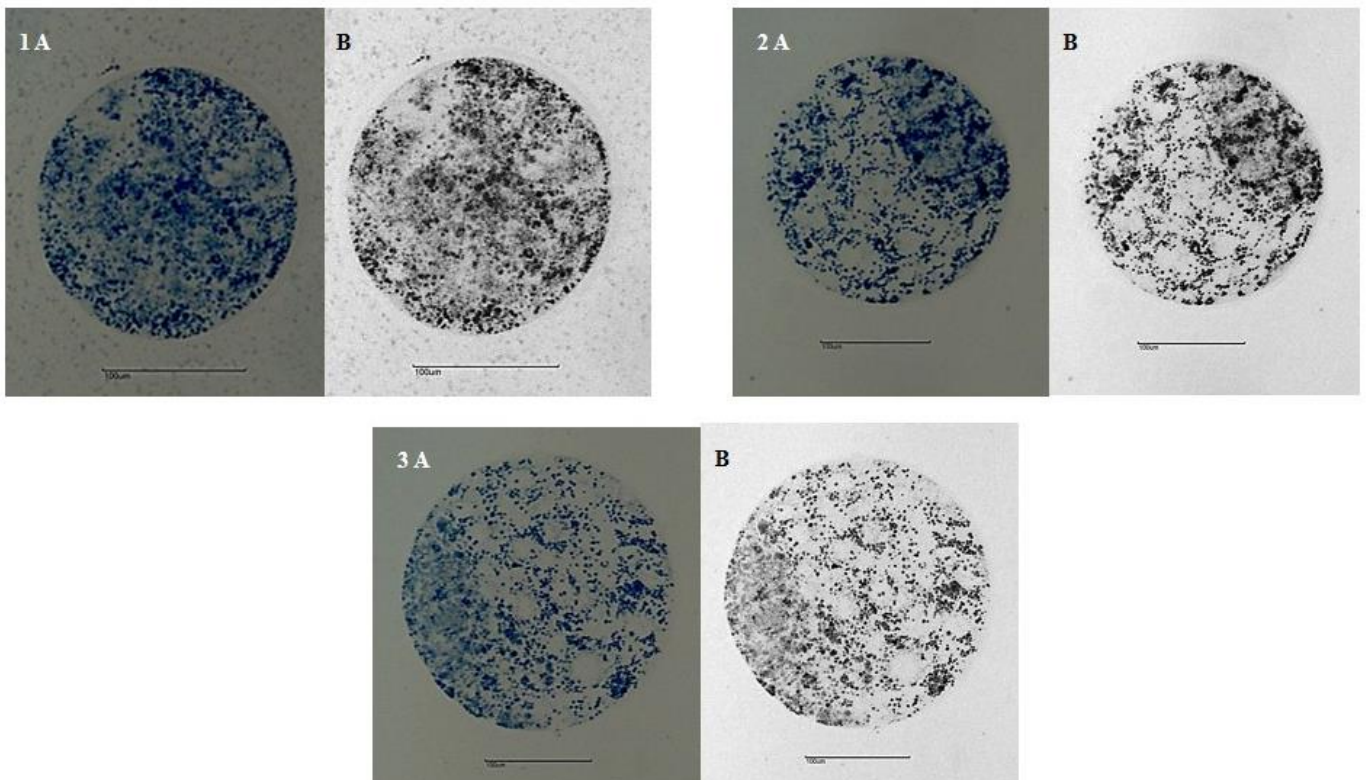
SUTTON-MCDOWALL, M.L.; FEIL, D.; ROBKER, R.L.; THOMPSON, J.G.; DUNNING, K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, p. 1632-1641, 2012.

TOMINAGA, K.; SHIMIZU, M.; OYAMAS, S.; IZAIKES, Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16cell embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 1669-1680, 2000.

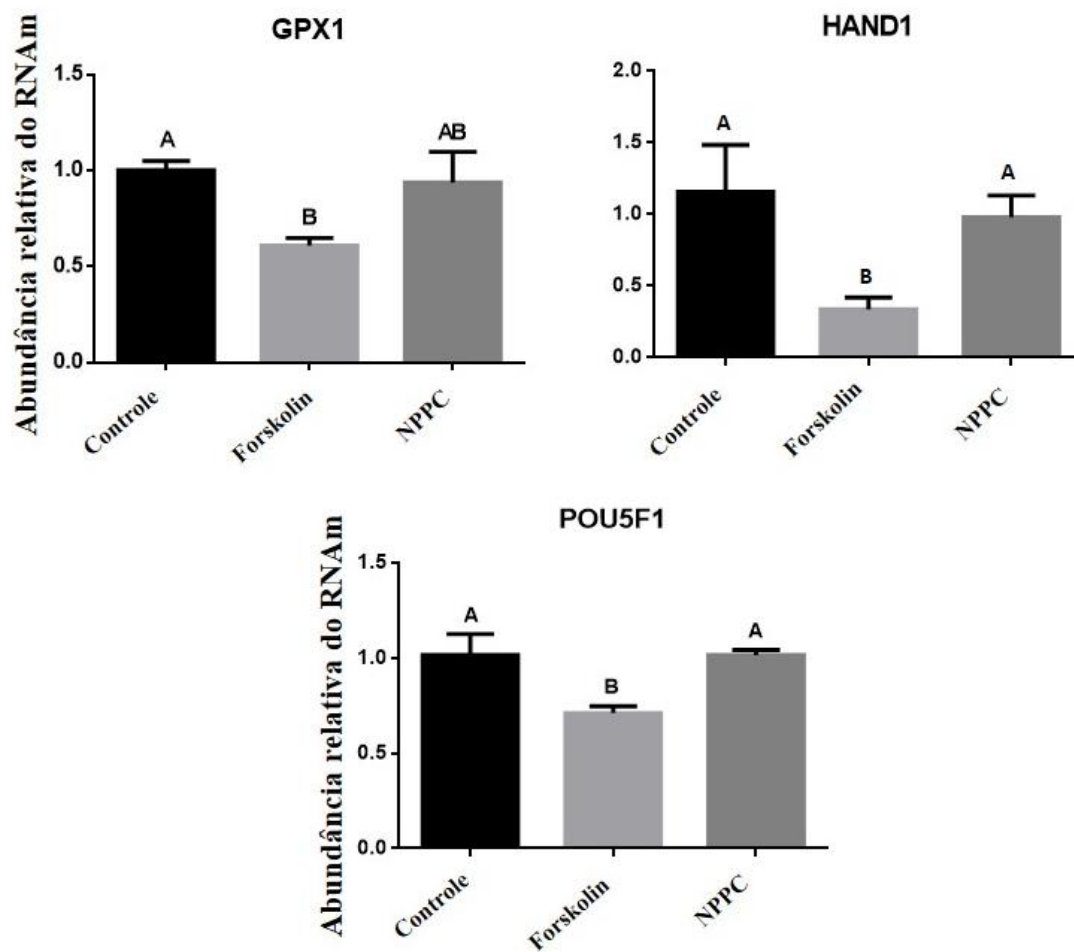
ZHANG, W.; YANG, Y.; LIU, W.; CHEN, Q.; WANG, H.; WANG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; XIA, G. Brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide maintain porcine oocyte meiotic arrest. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, p. 71–81, 2015.

**Figura 1-** Delineamento experimental.

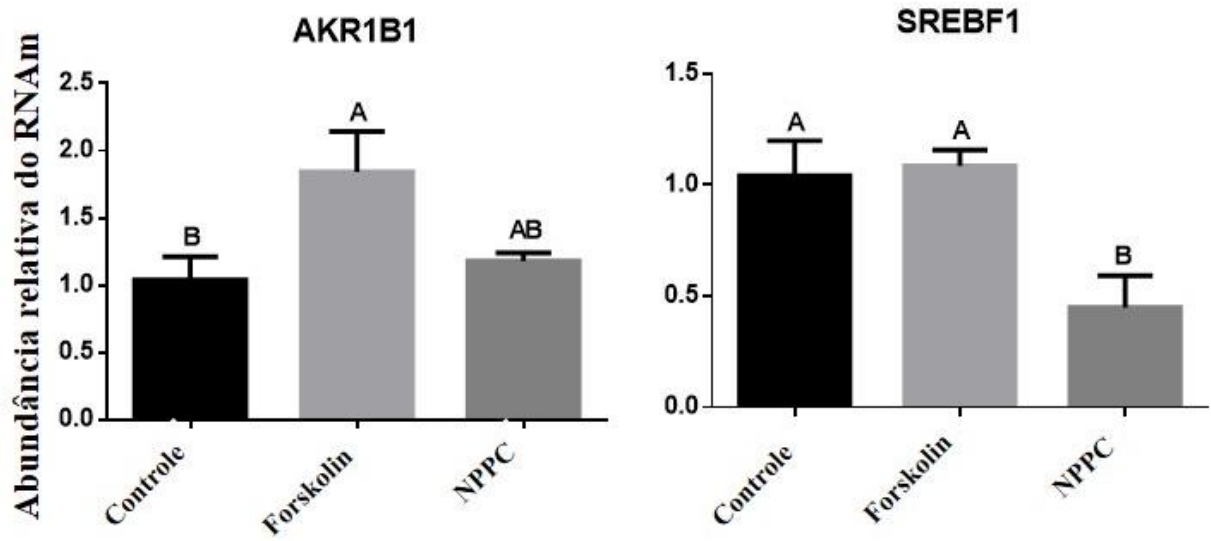
**Figura 2-** (A) Imagem de microscopia de campo claro de embriões do grupo Controle (1), grupo forskolin (2) e grupo NPPC (3) corados com corante lipofílico Preto Sudão B. (B) Conversão para escala de cinza para o ensaio semi-quantitativo de conteúdo lipídico. Pontos com coloração escura representam as gotas lipídicas citoplasmáticas. Ampliação original X 600.



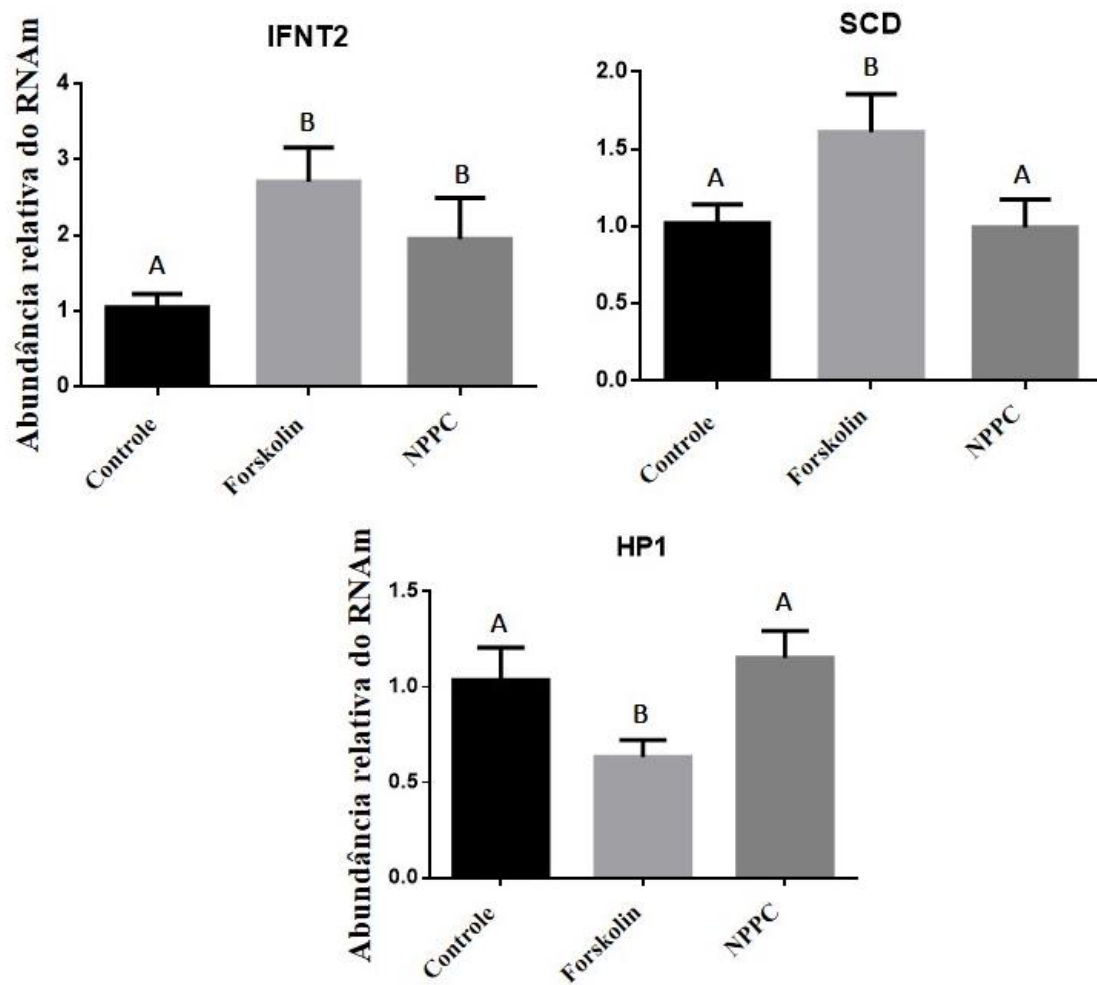
**Figura 3-** Abundância relativa de mRNA dos genes GPX1, HAND1 e POU5F1 avaliados em blastocistos (D7) de vacas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* nos grupos controle, forskolin e NPPC;  $p=0,06$ )



**Figura 4-** Abundância relativa de mRNA dos genes AKR1B1 e SREBF1 avaliados em blastocistos (D7) de vacas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* nos grupos controle, forskolin e NPPC; p=0,06).



**Figura 5-** Abundância relativa de mRNA dos genes IFNT2, HP1 ( $p=0,06$ ) e SCD ( $p=0,08$ ) avaliados em blastocistos (D7) de vacas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* nos grupos controle, forskolin e NPPC.



**Tabela 1-** Nomes e funções dos genes avaliados em embriões bovinos (*Bos taurus indicus*) produzidos *in vitro* nos grupos controle, forskolin e NPPC.

<b>Sigla do gene</b>	<b>Definição</b>	<b>Função</b>
ACTB	actin, beta	“Housekeeping”
SDHA	succinate dehydrogenase complex subunit A	“Housekeeping”
IFNT2	interferon tau	Interação materno-fetal
GPX1	glutathione peroxidase 1	Desenvolvimento
HAND1	heart and neural crest derivatives expressed 1	Diferenciação e implantação
HP1	heterochromatin protein 1-Alpha	Homodimerização e interação da cromatina
AKR1B1	aldo-keto reductase family 1	Metabolismo
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	Metabolismo
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1	Metabolismo
POU5F1	POU class 5 homeobox 1, OCT4	Pluripotência

**Tabela 2-** Taxas de blastocisto e eclosão de embriões bovinos (*Bos taurus indicus*) produzidos *in vitro* nos grupos controle, forskolin e NPPC ( $p = 0,09$ ).

<b>Grupo</b>	<b>Blastocistos %(n)</b>	<b>Eclosão D9 %(n)</b>	<b>Eclosão D10 %(n)</b>
Controle	39,5 (177/447)	43,5 (40/92)	48,4 (45/92) <sup>b</sup>
Forskolin	37,9 (164/432)	55,7 (39/70)	62,9 (44/70) <sup>a</sup>
NPPC	44,4 (187/421)	54,6 (39/72)	63,9 (46/72) <sup>a</sup>
<b>TOTAL</b>	<b>40,6 (528/1300)</b>	<b>50,4 (118/234)</b>	<b>57,7 (135/234)</b>

\*O número de embriões avaliados nas taxas de eclosão (D9 e D10) foram reduzidos devido a sua utilização para outras técnicas realizadas no estudo.

<sup>abc</sup>Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $p = 0,09$ ).

**Tabela 3-** Conteúdo lipídico citoplasmático de embriões *Bos taurus indicus* produzidos in vitro dos diferentes grupos experimentais (controle, forskolin e NPPC). Os dados são apresentados com média dos quadrados mínimos  $\pm$  desvio padrão; n = 10 por grupo; p>0,05).

<b>Parâmetro</b>	<b>Controle</b>	<b>Forskolin</b>	<b>NPPC</b>
Intensidade de cinza	883 $\pm$ 5,2	772 $\pm$ 4,8	881 $\pm$ 3,7
Intens. cinza/ área ( $\times 10^{-10}/\mu\text{m}^2$ )	1,1 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,6
Intens. cinza/ volume ( $\times 10^{-13}/\mu\text{m}^3$ )	5,4 $\pm$ 4,7	4,3 $\pm$ 4,0	4,6 $\pm$ 2,9

## 6. CONCLUSÕES

---

- A utilização de forskolin ou NPPC no cultivo *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus* não influenciou as taxas de blastocisto (D7) e eclosão (D9), porém as taxas de eclosão no dia 10 (D10) foram superiores nos embriões tratados com forskolin ou NPPC;
- O conteúdo lipídico citoplasmático não diferiu entre os embriões cultivados *in vitro* nos diferentes tratamentos (controle, forskolin e NPPC);
- Os níveis de transcritos dos genes GPX1, SREBF1, POU5F1, AKR1B1, HAND1, HP1, IFNT2 e SCD, sofreram influência dos tratamentos submetidos, demonstrando diferença entre suas abundâncias relativas de acordo com a substância utilizada.

## 7. APÊNDICE

---

Os seguintes artigos foram realizados durante o período do mestrado:

1) BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S. M.; SILVA, C. B.; LINDQUIST, A. G.; BERGAMO, L. Z.; COSTA, C. B.; MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of equine preantral ovarian follicles. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 1, p. 243-250, 2016.

2) CAMPOS, J. T.; MOROTTI, F.; BERGAMO, L. Z.; COSTA, C. B.; SENEDA, M. M. Pregnancy rate evaluation in lactating and non-lactating Nelore cows subjected to fixed-time artificial insemination using injectable progesterone. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 4, p. 1991-1996, 2016.

3) CAMPOS, J. T.; MOROTTI, F.; COSTA, C. B.; BERGAMO, L. Z.; SENEDA, M. M. Evaluation of pregnancy rates of *Bos indicus* cows subjected to different synchronization ovulation protocols using injectable progesterone or intravaginal device. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 6, 4149-4156, 2016.

4) MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; LUNARDELLI, P. A.; COSTA, C. B.; BERGAMO, L. Z.; BARREIROS, T. R. R.; SANTOS, G. M. G.; SENEDA, M. M. Injectable progesterone for timed artificial insemination in cattle (Submetido para: *Animal Reproduction*, novembro – 2016).

5) MAX, M. C.; SILVA, C. B.; GONZÁLEZ, S. M.; LINDQUIST, A. G.; BÚFALO, I.; GOMES, R. G.; MOROTTI, F.; COSTA, C. B.; BARREIROS, T. R. R.; LISBOA, L. A.;

SENEDA, M. M. The development and integrity of equine preantral follicles cultured in vitro with follicle stimulating hormone (FSH) supplementation (Submetido para: *Reproduction in Domestic Animals*, novembro – 2016).