



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA OLIVEIRA ROSA

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES:
AVANÇOS NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS**

Londrina
2019

CAMILA OLIVEIRA ROSA

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES:
AVANÇOS NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutora em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2019

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

Rosa, Camila Oliveira.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES: AVANÇOS NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS / Camila Oliveira Rosa. - Londrina, 2019.
116 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Inseminação Artificial em Tempo Fixo - Tese. 2. Produção in vitro de embriões - Tese. 3. Reprodução de bovinos - Tese. 4. Produção Animal - Tese. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CAMILA OLIVEIRA ROSA

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO E PRODUÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES:
AVANÇOS NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Luciana Simões Rafagnin Marinho
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Profa. Dra. Roberta Garbelini Gomes Zanin
Centro Universitário Filadélfia - Unifil

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
Universidade Estadual do Norte do Paraná-UENP

Londrina, 22 de fevereiro de 2019.

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 Doutora 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**
- 3. In Vitro Brasil S.A.**

DEDICATÓRIA

À Deus.
A minha eterna e amada avó Helena.
Ao meu amado esposo e familiares.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, fonte imensurável de amor, por ter me permitido chegar onde estou e alcançar algo que um dia considerei inatingível, sempre me mostrando que para Ele nada é impossível. Agradeço pela minha vida, pelas inúmeras bençãos recebidas, pelo amparo nos momentos difíceis e por ter conduzido-me sempre pelo melhor caminho. Certamente, tudo que sou e que alcancei só foi possível por acreditar em Deus!

Ao meu querido orientador professor Dr. Marcelo Marcondes Seneda por sempre acreditar no meu potencial, por toda orientação acadêmica e pessoal, pelo conhecimento, apoio e oportunidades que foram proporcionadas ao longo deste período. Também quero destacar nossa amizade e o exemplo de pessoa e profissionalismo que você é. Seguramente, tenho você como exemplo de vida e seus ensinamentos sempre colaboraram para que a cada dia eu me tornasse uma pessoa melhor.

Aos membros da banca de qualificação (Prof^ª. Dra. Katia Cristina Silva-Santos, Prof. Dr. Fábio Morotti e Prof^ª. Dra. Wanessa Blaschi) agradeço pelas importantes sugestões e contribuições. Aos membros da banca de defesa (Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiro, Prof^ª. Dra. Luciana Rafagnin Marinho e Prof^ª. Dra. Roberta Garbelini Gomes Zanin) agradeço por aceitarem participar deste momento importante na minha carreira profissional, dedicando tempo e conhecimento para contribuir com este trabalho.

À Capes, pela bolsa de estudos concedida durante a execução deste trabalho, bem como a Prof^ª. 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 querida Helenice, secretária do programa de Pós-graduação em Ciência Animal, que sempre nos orienta e ajuda com os processos e atividades do programa.

A todos os colegas, pós-graduandos e estagiários, do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA), que durante os 6 anos de pós-graduação foram a minha segunda família, pelo companheirismo, pelas conversas, risadas e bons momentos vividos. Principalmente aqueles que ajudaram durante a execução dos meus experimentos, sem a ajuda de vocês não seria possível, com certeza todos foram muito importantes e serei eternamente grata por isso. Não poderia deixar de agradecer de forma especial as minhas amigas Camila Bizarro, Camila Bortolheiro, Suellen M. Gonzalez, Amanda

Zangirolamo e Andressa Lindquist, pela colaboração durante a execução da minha tese, amizade e carinho durante esses anos de pós-graduação.

Aos colaboradores externos que tiveram parte na execução destes trabalhos, bem como ao Laboratório de Micromanipulação Embrionária da UNESP - Campus Assis nas pessoas do Prof. Dr. Marcelo Nogueira e Patricia Kubo Fontes. À empresa In Vitro Brasil S/A pela disponibilização dos meios utilizados para a produção dos embriões. À empresa Prosemen Indústria e Comércio de Produtos Veterinários na pessoa de Renato Castanho Francisco. Ao Departamento de Química e Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Analítica da Purdue University – EUA nas pessoas da Prof. Dra. Christina Ramires Ferreira e Dra. Camila Lima.

Aos amigos que a Universidade Estadual de Londrina me proporcionou durante toda a minha trajetória de pós-graduação, com certeza a amizade e companheirismo me ajudaram a nunca desistir e sempre me deram forças para continuar persistindo no meu sonho. De maneira especial à Hanna Prochno, Francine Giotto, Juliana Mareze, Marcelle Mareze, Gustavo Gonçalves, José Marcondes, Fernanda Zandonadi, Bruna Terci e Vanessa Holsbach, com certeza a amizade de vocês deixou tudo mais leve.

A toda minha família, principalmente aos meus pais Romaldo Rosa e Marilena R. dos Santos, que nunca mediram esforços para minha formação, sempre me incentivando a sonhar cada vez mais alto. De forma especial agradeço à minha mãe pelo exemplo de dedicação, de honestidade, de bondade, de vida e pela luta constante em prol da minha formação e educação. Sem dúvida, todas as conquistas do passado, do presente e do futuro pertencem a vocês.

Aos meus irmãos Diego Rodrigues dos Santos, Carina Oliveira Rosa e Laura Oliveira Rosa pelos momentos de apoio e companheirismo. Agradeço por entenderem e apoiarem as minhas escolhas e compreenderem que muitas vezes a privação do convívio diário seria necessária para minha formação. E aos meus sobrinhos, Maria Heloisa e Lorenzo, pelo carinho e momentos de felicidade. Não poderia deixar de registrar o meu eterno agradecimento à minha amada avó Helena, que infelizmente hoje não está mais entre nós, mas que sempre me apoiou sem medidas na busca da realização dos meus sonhos e tornou deles os seus.

Finalmente, agradeço a Deus por ter colocado o meu esposo Robson Ueno no meu caminho. Nossa trajetória é longa, são onze anos desde o início da nossa história e a cada dia que passa, tenho mais certeza de que fiz a escolha certa. Apesar dos momentos difíceis, juntos conquistamos forças para vencer a luta diária da vida e tenho a plena certeza

de que tudo que alcançamos é fruto de nossa determinação e companheirismo. Obrigada por todo amor, amizade, lealdade, pelos conselhos, por ser o meu pilar de sustentação e principalmente pelo apoio imensurável em todas as minhas decisões. Gratidão à Deus pelo nosso amor e pela nossa vida!

Meu muito obrigada!!

“Dê ao mundo o melhor de você.
Mas isso pode não ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.
Veja você que, no final das contas,
é tudo entre VOCÊ e DEUS.
Nunca foi entre você e os outros.”

MADRE TERESA DE CALCUTÁ

RESUMO

ROSA, Camila Oliveira. 2019. **Inseminação artificial em tempo fixo e produção *in vitro* de embriões**: avanços na reprodução de bovinos. 2019. 116 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

O objetivo deste trabalho foi estudar estratégias para incrementar a eficiência das biotecnologias de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e produção *in vitro* de embriões (PIVE), através da: I) Utilização da diluição de sêmen pós-descongelamento na IATF e PIVE; II) Suplementação do meio de maturação e cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de Peptídeo Natriurético C (NPPC); e III) Avaliação do perfil lipídico de embriões *Bos indicus* produzidos *in vitro* com diferentes quantidades de folículos antrais. No experimento I foram utilizadas palhetas de sêmen de um único touro com fertilidade previamente conhecida foram utilizadas no grupo controle e grupo diluição (diluição de uma palheta em duas utilizando o produto comercial Prosemen[®]). A taxa de concepção foi semelhante ($P = 0,517$) entre o diluidor (52,11%) e controle (55,48%), mas o grupo com diluente apresentou uma redução no número de doses utilizadas por concepção (0,95 diluidor vs. 1,80 controle; $P < 0,001$). Não foi observado diferença na PIVE, taxa de fertilização oocitária, motilidade total e progressiva na análise espermática. No experimento II foi avaliado a suplementação com NPPC na maturação *in vitro* (MIV; 50 nM, 100 nM ou 150 nM) ou no cultivo *in vitro* (CIV; 50 nM, 100 nM ou 150 nM) em comparação a um grupo controle (sem suplementação). As taxas de blastocistos não diferiram entre os grupos ($P \geq 0,05$). Para os genes analisados observamos diferença somente na expressão de REST, gene relacionado a pluripotência e desenvolvimento embrionário, com maior expressão no grupo 150 nM MIV. Para os genes relacionados ao metabolismo (AKR1B1, SCD e SREBF1), maturação oocitária e desenvolvimento folicular (BMP15 e GDF9), sinalização Celular, estresse oxidativo e térmico (FOXO3, HSF1 e HSPA1A), pluripotência (POU5F1 e NANOG), desenvolvimento embrionário (HAND1, GPX1, STAT3 e VEGFA), interação materno-fetal (IFNT2 e PTGS2/COX-2), regulação epigenética (Dnmt3 α e Dnmt3 β) e receptor do NPPC (NPR2) não foi demonstrado diferença entre os grupos. Adicionalmente, foi demonstrado pela primeira vez a expressão do receptor de NPPC (NPR2) em embriões. No experimento III foi investigar se a quantidade de folículos antrais (FAs) influencia o perfil lipídico (análise do perfil lipídico pela técnica DESI-MS) de embriões produzidos *in vitro* de fêmeas *Bos taurus indicus*. Para o cultivo *in vitro* foram utilizados ovários ($n = 498$) de 249 fêmeas Nelore, coletados de abatedouro local e transportados em solução salina a 30-35° C até o laboratório. Os animais foram classificados em grupo de baixa (≤ 31 ; média menos DP) e alta quantidade de FAs (≥ 92 ; média mais DP). As taxas de clivagem e blastocisto, não apresentaram diferenças entre os grupos (78,9% e 41,7% no grupo de alta; $n = 419$ oócitos; 79,5% e 40,3% no grupo de baixa; $n = 357$ oócitos; $P \geq 0,05$). O perfil lipídico de embriões derivados de vacas com maior quantidade de FAs apresentaram uma maior concentração de lipídios triacilgliceróis e menor de derivados de colesterol e diacilgliceróis, quando comparados aos embriões de vacas com menor quantidade de FAs. Em conclusão, I) o uso do diluidor pós-descongelamento reduziu o número de doses por concepção, reduzindo o custo por prenhez na IATF; II) Embora as taxas de blastocisto não tenham diferido entre os grupos, o gene REST relacionado a pluripotência e desenvolvimento embrionário teve maior expressão em 150MIV, fornecendo referências para a melhoria dos resultados de MIV; III) Nossos resultados demonstraram diferenças no perfil lipídico nos embriões PIV quando analisamos diferentes quantidades de FAs, porém não foi possível avaliar sua interferência significativa nas taxas de clivagem e blastocistos.

Palavras-chave: Diluidor de sêmen. Embriões produzidos *in vitro*. Folículos antrais. Perfil lipídico. Peptídeo natriurético tipo C.

ABSTRACT

ROSA, Camila Oliveira. **Timed artificial insemination and in vitro embryo production: Advances in reproduction cattle.** 2019. 116 p. Thesis (Doctoral Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

The objective of this study was to evaluate strategies to increase the efficiency of biotechnology Timed Artificial Insemination (TAI) and in vitro embryo production (IVP) through: I) Use of post-thaw dilution of semen in IATF and IVP; II) Supplementation of the in vitro culture and maturation medium with different concentrations of Natriuretic Peptide C (NPPC); and III) Influence of the amount of antral follicles on the lipid profile of embryos *Bos indicus* produced in vitro. In the experiment I were used semen straws of a single bull with previously known fertility were used in the control group and dilution group (dilution of one straw in two using commercial product Prosemen[®]). The conception rate was similar ($P = 0.517$) between the diluent (52.11%) and control group (55.48%), but the diluent group showed a reduction in the number of doses used per conception (0.95 diluent vs 1.80 control, $P < 0.001$). No difference was observed in IVP, oocyte fertilization rate, total and progressive motility in sperm analysis. In Experiment II, NPPC supplementation in vitro maturation (IVM; 50 nM, 100 nM or 150 nM) or in vitro culture (IVC; 50 nM, 100 nM or 150 nM) was evaluated in comparison to a control group (without supplementation). Blastocyst rates did not differ between groups ($P \geq 0.09$). For the genes analyzed, we observed a significant difference only in the expression of REST, a gene related to pluripotency and embryonic development, with higher expression in the 150 nM IVM group. For the genes related to metabolism (AKR1B1, SCD and SREBF1), oocyte maturation and follicular development (BMP15 and GDF9), cell signaling, oxidative and thermal stress (FOXO3, HSF1 and HSPA1A), pluripotency (POU5F1 and NANOG), embryonic development HAND1, GPX1, STAT3 and VEGFA), maternal-fetal interaction (IFNT2 and PTGS2 / COX-2), epigenetic regulation (Dnmt3 α and Dnmt3 β) and NPPC receptor (NPR2) showed no difference between groups. Additionally, the expression of the NPPC receptor (NPR2) in embryos has been demonstrated for the first time. In experiment III it was investigated if the number of antral follicles (AFs) influences the lipid profile (DESI-MS lipid profile analysis) of embryos produced in vitro of *Bos taurus indicus* females. For in vitro culture, ovaries ($n = 498$) of 249 Nelore females were collected from a local slaughterhouse and transported in saline at 30-35° C until laboratory. The animals were classified as low (≤ 31 , mean less *SD*) and high number of AFs (≥ 92 , mean plus *SD*). The cleavage and blastocyst rates did not differ between the groups (78.9% and 41.7% in the high group, $n = 419$ oocytes, 79.5% and 40.3% in the low group, $n = 357$ oocytes; $P \geq 0,05$). The lipid profile of embryos derived from cows with higher AFs presented a higher lipid concentration triacylglycerols and lower cholesterol derivatives and diacylglycerols when compared to the embryos of cows with a lower amount of AF. In conclusion, I) the use of the post-thaw diluent reduced the number of doses per conception, reducing the pregnancy cost in TAI; II) Although blastocyst rates did not differ between groups, the REST gene related to pluripotency and embryonic development had greater expression in 150MIV, provide references for the improvement of IVM results; III) Our results demonstrate differences in the lipid profile in the PIV embryos when we analyzed different amounts of AFs, but it was not possible to evaluate their significant interference in the rates of cleavage and blastocysts.

Keywords: Antral follicles. In vitro embryo production. Lipid profile. Natriuretic peptide type C. Semen diluent.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I

- Figure 1** -The hormonal protocol used for ovulation synchronization in Nelore cows from both experimental groups. EB: estradiol benzoate, P4: progesterone, eCG: equine chorionic gonadotropin, PGF2 α : prostaglandin, EC: estradiol cypionate, TAI: timed artificial insemination. 55
- Figure 2** -Computed analysis (CASA) of total sperm motility, from conventional dose of bovine semen diluted with extender (-----) *versus* control (-----). 60
- Figure 3** -Computed analysis (CASA) of total sperm progressive motility, from conventional dose of bovine semen diluted with extender (-----) *versus* control (-----). 61

ARTIGO II

- Figura 1** -Delineamento utilizado para a divisão dos grupos experimentais para a produção *in vitro* dos embriões bovinos *Bos indicus* (Nelore) de acordo com a suplementação de peptídeo natriurético C (NPPC) na maturação *in vitro* (MIV) ou cultivo *in vitro* (CIV), bem como das técnicas utilizadas para avaliação do efeito da suplementação. 72
- Figura 2** -Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a pluripotência em embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação *in vitro* ou no cultivo *in vitro*. 79
- Figura 3** -Abundância relativa de RNAm de genes relacionados ao metabolismo inicial e metabolismo lipídico em embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação *in vitro* ou no cultivo *in vitro*. 80
- Figura 4** -Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a maturação oocitária e desenvolvimento em embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação *in vitro* ou no cultivo *in vitro*. 81

Figura 5 -Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a sinalização celular, estresse oxidativo e térmico em embriões de vaca Nelore (<i>Bos indicus</i>) produzidos <i>in vitro</i> sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação <i>in vitro</i> ou no cultivo <i>in vitro</i>	82
Figura 6 -Abundância relativa de RNAm de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário nos embriões de vaca Nelore (<i>Bos indicus</i>) produzidos <i>in vitro</i> sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação <i>in vitro</i> ou no cultivo <i>in vitro</i>	83
Figura 7 -Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a interação materno-fetal em embriões de vaca Nelore (<i>Bos indicus</i>) produzidos <i>in vitro</i> sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação <i>in vitro</i> ou no cultivo <i>in vitro</i>	84
Figura 8 -Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a regulação epigenética em embriões de vaca Nelore (<i>Bos indicus</i>) produzidos <i>in vitro</i> sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação <i>in vitro</i> ou no cultivo <i>in vitro</i>	85

ARTIGO III

Figura 1 -Plotagem tridimensional de pontuação dos íons lipídicos selecionados de embriões do grupo de vacas com alta (vermelho) e baixa (verde) quantidade de folículos antrais. As variâncias explicadas são mostradas entre parênteses (PC2 vs PC1).....	103
--	-----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

- Table 1** - Setup used in HTR-IVOS 14.0 for the evaluation of bovine spermatozoa 55
- Table 2** - Body condition scoring (BCS), conception rate, total dose of semen per group and conception in Nelore cows submitted to timed artificial insemination using conventional undiluted doses (one dose per cow; the control group) or diluted doses (one diluted dose with Prosemen for two cows; the extender group)..... 59
- Table 3** - Rate of cleavage, blastocyst formation, and hatching of bovine embryos *in vitro* produced from oocytes fertilized with conventional undiluted doses (the control group) or diluted doses (the extender group). 59
- Table 4** - Oocyte fertilization rate after 18 h of *in vitro* fertilization with or without semen dilution (control vs. extender), by comparing the number of pronuclei by the fluorescence staining technique with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). 60

ARTIGO II

- Tabela 1** - Genes de maior interesse selecionados para análise detalhada da comparação da produção *in vitro* de embriões bovinos *Bos indicus* (Nelore) de acordo com a suplementação de peptídeo natriurético C (NPPC) na maturação *in vitro* (MIV) ou cultivo *in vitro* (CIV) e nas concentrações de 50 nM, 100 nM ou 150 nM. 77
- Tabela 2** - Comparação da produção *in vitro* de embriões bovinos *Bos indicus* (Nelore) de acordo com a suplementação de peptídeo natriurético C (NPPC) na maturação *in vitro* (MIV) ou cultivo *in vitro* (CIV) e nas concentrações de 50 nM, 100 nM ou 150 nM. 78

ARTIGO III

- Tabela 1** - Taxas de clivagem e blastocisto produzidos *in vitro* a partir de oócitos provenientes de vacas Nelore com Alta (≥ 92 FAs) e Baixa (≤ 31 FAs) quantidade de folículos antrais. 99

Tabela 2 - Valores de m/z dos íons selecionados os quais apresentaram diferentes concentrações na comparação dos embriões derivados de animais classificados com alta vs baixa quantidade de folículos antrais (FAs), tentativa de atribuição e fold-change dos íons avaliados no modo positivo do DESI-MS em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*..... 101

Tabela suplementar 1 - Valores de m/z dos íons utilizados na análise estatística, formula molecular, descrição dos íons e tentativa de atribuição dos íons detectados em modo positivo pela técnica de DESI-MS MS em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Abreviações: EC ésteres de colesterol e derivados; DAG. diacilgliceróis; TAG. triacilgliceróis..... 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta-actin- Beta actina
AKR1B1	Aldo-Ceto Redutase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
BMP15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BSA	Bovine serum albumin - albumina sérica bovina
CCOs	Complexo <i>cumulus</i> oócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
D	Dia
Dnmt3 α	DNA-metiltransferase 3 alpha
Dnmt3 β	DNA-metiltransferase 3 beta
eCG	Equine chorionic gonadotropin- gonadotrofina coriônica equina
EGF	Epidermal growth factor- fator de crescimento epidermal
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FOXO3	<i>Forkhead Box O3</i>
FSH	Follicle-stimulating hormone- hormônio folículo estimulante
GDF9	Fator De Crescimento E Diferenciação 9
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPX1	Glutathione Peroxidase 1
HAND1	Derivado do Miocárdio e da Crista Neural Expresso-1
hCG	Human corionic gonadotrophic- Gonadotrofina coriônica humana
HSF1	Fator de Transcrição de Choque Térmico tipo 1
HSPA1A	Choque Térmico 70kDa Proteína 1 ^a
IFTN2	Interferon Tau tipo 2
LH	Luteinizing hormone hormônio luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NANOG	Nanog <i>Homeobox</i>
NPPC	Natriuretic peptide C peptídeo natriurético C
NPR2	Receptor Peptídeo Natriurético tipo 2
PHE	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIV	Produzidos <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões

POU5F1/OCT4	POU Classe 5 <i>Homeobox</i> 1/Fator de Transcrição de Ligação ao Octâmero 4
PTGS2/COX-2	Prostaglandina-Endoperóxido Sintase 2/Ciclo-Oxigenase-2
REST	Fator de transcrição silenciador
SCD	<i>Stearoyl-Coa Desaturase</i>
SFB	Soro fetal bovino
SREBF1	Fator de Transcrição de Ligação ao Elemento Regulador do Esterol 1
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular tipo A

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Inseminação Artificial em Tempo Fixo.....	23
2.2	Aplicabilidade do Diluidor de sêmen pós-descongelamento	24
2.3	Produção In Vitro de Embriões e suas particularidades.....	25
2.4	Peptídeo Natriurético C (NPPC)	27
2.5	Genes relacionados à pluripotência, apoptose, ao estresse oxidativo, metabolismo, desenvolvimento e à qualidade embrionária	29
2.6	Influência da quantidade de folículos antrais na reprodução	34
2.7	Impacto do conteúdo lipídico nos embriões.....	35
	REFERÊNCIAS	37
3.	HIPÓTESES	49
4.	OBJETIVOS	50
4.1.	Objetivos Gerais	50
4.2	Objetivos Específicos	50
5.	ARTIGO I	52
	Abstract	52
5.1	Introduction	53
5.2	Materials and methods.....	54
5.2.1	<i>Experimental Design</i>	54
5.2.2	<i>Timed Artificial Insemination</i>	54
5.2.3	<i>In Vitro Embryo Production</i>	55
5.2.4	<i>Fertilization Rate</i>	56
5.2.5	<i>Sperm Evaluation</i>	57
5.2.6	<i>Statistical Analysis</i>	58
5.3	Results	58
5.4	Discussion	61
	REFERENCES	65

6.	ARTIGO II	67
	RESUMO	67
	ABSTRACT	68
6.1	Introdução.....	69
6.2	Material e Métodos.....	71
6.2.1	<i>Delineamento Experimental</i>	71
6.2.2	<i>Animais</i>	73
6.2.3	<i>Produção in vitro de embriões</i>	73
6.2.4	<i>Extração de RNA e transcrição reversa</i>	74
6.2.5	<i>PCR em tempo-real (qPCR) no Fluidigm Biomark™ HD system</i>	75
6.2.6	<i>Análise Estatística</i>	77
6.3	Resultados	78
6.3.1	<i>Produção in vitro de embriões</i>	78
6.3.2	<i>Análise de transcritos de RNAm</i>	79
6.4	Discussão.....	85
	REFERÊNCIAS	89
7.	ARTIGO III	94
	RESUMO	94
	ABSTRACT	95
7.1	Introdução.....	96
7.2	Material e Métodos.....	97
7.2.1	<i>Animais</i>	97
7.2.2	<i>Classificação dos animais de acordo com a número de folículos antrais</i>	97
7.2.3	<i>Produção in vitro de embriões</i>	98
7.2.4	<i>Análise do perfil lipídico pela técnica de DESI-MS</i>	98
7.2.5	<i>Análise Estatística</i>	99
7.3	Resultados	99
7.3.1	<i>Cultivo in vitro</i>	99
7.3.2	<i>Perfil lipídico pelo DESI-MS</i>	100
7.4	Discussão.....	105
	REFERÊNCIAS	108

8.	CONCLUSÕES	114
9.	ANEXOS	115

1. INTRODUÇÃO

A crescente exigência mundial para produção de alimentos seguros e de forma sustentável tem requerido da pecuária bovina adaptações, buscando o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva dos animais em áreas cada vez menores. Ainda que numericamente expressiva, a pecuária brasileira tem grande potencial de aumentar a sua produtividade e eficiência em termos percentuais e isto torna-se mais evidente quando comparamos com outros países mais eficientes.

Biotécnicas da reprodução, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) são instrumentos importantes para o melhoramento genético dos rebanhos de bovinos. 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.

A PIVE destaca-se por ser uma ferramenta eficaz para otimizar o processo de seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores, sendo produzidos cerca de 632 mil embriões *in vitro* por ano (PERRY et al., 2017). A indústria brasileira de embriões sofreu mudanças notáveis nos últimos anos, a maioria delas associada à adoção de tecnologias *in vitro*. Em bovinos, houve um aumento de 5 vezes na produção de embriões, e a produção *in vitro* substituiu em grande parte a superovulação (MOET) como a técnica de escolha para a produção de embriões (VIANA et al., 2017).

A IATF tem demonstrado resultados impactantes para os sistemas de produção de bovinos de corte, diminuindo o período da estação reprodutiva, produzindo lotes de bezerros uniformes e diminuindo a mão de obra necessária para a observação de estros (MUTH-SPURLOCK et al., 2016).

Para que os sistemas de produção pecuária sejam cada vez mais viáveis economicamente, diversas estratégias são empregadas para melhorar a eficiência reprodutiva e reduzir os custos por concepção nos protocolos de IATF (PFEIFER et al., 2017) e de produção *in vitro* de embriões (VIANA et al., 2017). De acordo com Edwards et al. (2015), sem levar em consideração os custos de mão de obra, o valor da dose de sêmen congelado pode corresponder em até 70% do custo total de um protocolo de IATF. A fim de desfrutar ao máximo a capacidade reprodutiva do touro, diversos diluidores são pesquisados e utilizados antes do procedimento de congelação, contudo, poucas pesquisas são descritas visando reduzir o custo da dose de sêmen já congelada por meio do uso de diluidores após a

1 descongelamento para fracionamento da dose de sêmen e conseqüentemente diminuir os custos
2 por prenhez. Nesse contexto, o Experimento 1 teve com intuito avaliar se a diluição das doses
3 de sêmen pós-descongelamento pode alcançar um resultado na IATF, PIVE e na cinética
4 espermática tão eficiente quanto o uso de doses não diluídas, diminuindo assim o custo com
5 sêmen por concepção.

6 Além da importância comercial e zootécnica, as pesquisas com biotécnicas
7 *in vitro* possuem papel fundamental para permitir o estudo dos mecanismos fisiológicos
8 básicos que ocorrem *in vivo*. Os grandes avanços obtidos na PIVE nos últimos 50 anos são
9 consequência de estudos realizados nas áreas de biologia celular, molecular e genética, que
10 contribuíram para o esclarecimento de eventos relacionados ao desenvolvimento embrionário
11 inicial (SOARES et al., 2017; BOTIGELLI et al., 2018; KHAN et al., 2018).

12 Apesar dos recentes avanços relacionados com a PIVE e dessa ascensão do
13 seu uso, a média de eficiência de produção de embriões é de 30% (PONTES et al., 2011).
14 Desta forma diversos estudos estão sendo realizados para melhorar a eficiência da técnica,
15 como melhora na seleção das doadoras (MOROTTI et al., 2017a), na maturação oocitária (DE
16 CESARO et al., 2015; ZHANG et al., 2016), fertilização (ZHANG et al., 2017), cultivo
17 (ZANGIROLAMO et al., 2017; KHAN et al., 2018) e criopreservação dos embriões
18 (MARINHO et al., 2015). Com esse intuito foi proposto o Experimento 2 que utilizou a
19 suplementação do meio com Peptídeo Natriurético C (NPPC), que já foi descrito por atuar no
20 mecanismo de retomada precoce da meiose nos oócitos (ZHANG et al., 2015). A interação
21 NPPC e células do *cumulus* já é conhecida, no entanto a relação NPPC-embrião possui
22 poucos relatos (SCHWARZ et a., 2017; BOTIGELLI et al., 2018). Desta forma, no
23 Experimento 2 avaliamos a suplementação do meio em diferentes concentrações e momentos
24 do protocolo de PIVE (maturação e cultivo), comparando a taxa de produção de embriões e o
25 seu mecanismo de atuação através da expressão gênica.

26 O número de folículos antrais (FAs) presentes no ovário das fêmeas tem
27 sido relacionado ao desempenho reprodutivo de bovinos e suas biotecnologias, como a taxa
28 de produção *in vitro* de embriões (MOROTTI et al., 2017ab; ROSA et al., 2018). São
29 descritos por influenciar características reprodutivas, como a qualidade do oócito (IRELAND
30 et al., 2009; ROSA et al., 2018) e de embriões produzidos *in vitro* (PONTES et al., 2011;
31 SANTOS et al., 2016). Sendo assim propomos o Experimento 3, que teve a finalidade de
32 avaliar a influência da quantidade de FAs sob o perfil lipídico de embriões produzidos *in vitro*
33 a partir de oócitos recuperados de vacas com baixa e alta quantidade de folículos antrais. Os
34 lipídios estão envolvidos no metabolismo inicial dos embriões e fornecem energia para seu

1 desenvolvimento (SUDANO et al., 2016), porém o excesso pode afetar negativamente seu
2 metabolismo e consequentemente a taxa de produção embrionária (WU et al., 2011).

3 Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar estratégias para
4 incrementar a eficiência das biotecnologias de IATF e PIVE, através da: I) Utilização da
5 diluição de sêmen pós-descongelamento na IATF e PIVE; II) Suplementação do meio de
6 maturação e cultivo *in vitro* com NPPC; e III) Análise do perfil lipídico de embriões
7 produzidos *in vitro* a partir de oócitos de vacas com baixa ou alta quantidade de folículos
8 antrais.

9

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

A Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) representa uma das estratégias com maior impacto da expansão no fornecimento de melhorias genéticas e aumento da eficiência reprodutiva com menor custo (MARQUES et al. 2018). O uso de inseminação artificial (IA) e transferência de embriões mostraram crescimento significativo nos últimos anos. De acordo com Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA; 2017), o número de doses comercializadas de sêmen aumentou de 7 milhões em 2003 para cerca de 14 milhões em 2017. Como resultado, a porcentagem de vacas e novilhas submetidas à IA aumentou de 6% para 12%. Este crescimento foi principalmente possível devido ao uso generalizado da IATF, que cresceu de apenas 1% de toda IA realizada no país em 2002 para 85% da IA em 2017 (BARUSELLI et al., 2017).

A IATF é uma técnica desenvolvida para suprir os principais desafios da inseminação artificial tradicional, que são as falhas de detecção de cios e a incapacidade de atingir fêmeas em anestro (BARUSELLI et al., 2002). Com o conhecimento da fisiologia do ciclo estral dos bovinos tornou-se possível o controle das fases de desenvolvimento folicular, graças à utilização de estratégias farmacológicas específicas. O controle farmacológico do ciclo estral facilita não só o manejo reprodutivo, como também permite a aplicação das biotecnologias da reprodução nos rebanhos, proporcionando uma produção mais eficiente (SÁ FILHO et al., 2008).

Nesta perspectiva, esta biotécnica tem permitido o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos leiteiros e de corte, através da aplicação de hormônios exógenos para induzir a sincronização do estro e a ovulação de vários animais do rebanho em um período pré-determinado (BARUSELLI et al., 2004). A IATF pode ser empregada em vacas cíclicas ou em anestro e iniciada independentemente da fase do ciclo estral (BÓ et al., 2003). A IATF quando usada no início da estação reprodutiva, aumenta claramente o desempenho reprodutivo comparado ao serviço natural (BARUSELLI et al., 2018).

Muitos protocolos de sincronização de ovulação foram estudados em vacas (BARUSELLI et al., 2002; SALES et al., 2011). Resumidamente, estes protocolos baseiam-se na sincronização da emergência da onda de crescimento folicular pela administração simultânea de progesterona e estradiol (BÓ et al., 2002). No final de um protocolo, é necessário reduzir as concentrações de progesterona circulante pela remoção do dispositivo de

1 progesterona (fonte exógena) e a administração de prostaglandina para promover a regressão
2 do corpo lúteo (fonte endógena), para que a ovulação possa ocorrer. Bem como, é necessário
3 promover o crescimento final do folículo e induzir uma ovulação sincronizada, permitindo a
4 inseminação em um momento predeterminado (BARUSELLI et al., 2002).

5 Apesar da alta proporção de vacas sendo sincronizadas nos protocolos
6 de IATF, este mercado ainda exhibe considerável potencial para expansão. Após um
7 procedimento IATF, obtêm-se aproximadamente 40 a 60% de taxa de concepção (SÁ FILHO
8 et al., 2009/ 2010; BÓ et al., 2013; MARQUES et al., 2018). Especificamente em vacas
9 nelores em lactação, foram demonstradas taxas entre 52% e 61,8% de prenhez (SÁ FILHO et
10 al., 2010; SALES et al., 2012; BARUSELLI et al., 2017; THOMAS et al., 2017). Estes
11 resultados podem variar dependendo de fatores como o protocolo hormonal empregado,
12 categoria de fêmeas, escore de condição corporal, condição ovariana, manejo nutricional,
13 além dos aspectos relacionados touros e sêmen (SEIDEL & SCHENK, 2008, SÁ FILHO et
14 al., 2013; MARQUES et al., 2015).

15 A utilização do manejo de ressincronização é uma estratégia que vem
16 aumentando a eficiência da IATF. Baruselli et al. (2018) demonstraram que vacas Nelore
17 múltiparas (n=1.505) submetidas a três programas consecutivos de IATF com intervalo de 32
18 dias entre inseminações, apresentaram taxa de concepção na primeira de 64,0% (288/450), na
19 segunda de 66,0% (198/300) e 65,4% (494/755) na terceira IATF ($P > 0,05$). O uso de três
20 IATF consecutivo com 32 dias de intervalo entre inseminações resulta em eficiência
21 satisfatória em termos de desempenho reprodutivo, sem o uso de repasse dos touros. O uso de
22 estratégias como esta se faz necessário para diminuição do custo da prenhez para aumento da
23 rentabilidade com o uso da técnica (BARUSELLI et al., 2018), além disso permitindo que
24 maioria dos genótipos dos produtos sejam provenientes de touros geneticamente superiores
25 (CREPALDI et al., 2014).

26

27 2.2 APLICABILIDADE DO DILUIDOR DE SÊMEN PÓS-DESCONGELAMENTO

28

29 Com a descoberta do uso do glicerol como crioprotetor há 50 anos, o
30 armazenamento de sêmen foi revolucionado. Essa importante inovação possibilitou que os
31 espermatozoides pudessem ser congelados por um período prolongado e depois usados com
32 sucesso na inseminação artificial (HOLT, 2000) e em programas de PIVE (AMBROSE et al,
33 1999) permitindo uma melhora na seleção genética em bovinos (AIRES et al., 2003).

1 A diluição do sêmen é imprescindível antes de submetê-lo à
2 congelamento. Um diluidor desejável deverá prover energia e nutrientes, fornecer ação
3 tamponante para compensar as alterações no pH causado pela formação de ácido lático,
4 fornecer proteção contra o resfriamento rápido e choque térmico, manter a pressão osmótica
5 ideal e o balanço de eletrólitos para o meio, inibir o crescimento de microorganismos, além de
6 aumentar o volume de sêmen para que possa ser usado em mais fêmeas (CONCANNON &
7 BATTISTA, 1989; HERMAN et al., 1996; VISHWANATH & SHANNON, 2000; AIRES et
8 al., 2003).

9 O ganho genético associado ao uso do IATF e PIVE está intimamente
10 ligado à criopreservação do sêmen de touros com alto mérito genético (LAYEK et al., 2016).
11 Para aumentar a viabilidade econômica dos sistemas de produção pecuária, várias estratégias
12 têm sido propostas para melhorar a eficiência reprodutiva e reduzir os custos de concepção
13 nas biotecnologias reprodutivas (WHITTIER et al., 2013; PFEIFER et al., 2017). Segundo
14 Edwards et al. (2015), sem considerar os custos de mão de obra, o valor da dose de sêmen
15 congelado pode abranger 70% do custo total de um protocolo de IATF, ficando evidente que a
16 diminuição do custo do sêmen é um destes viés, mas sem acarretar prejuízos ao mérito
17 genético do sêmen.

18 Silveira et al. (2013) demonstraram a vantagem do uso de um diluidor
19 de sêmen incluído após a descongelamento de doses comerciais no protocolo de IATF em vacas
20 Nelore, diluindo cada dose comercial em 4 (1:4) e obtiveram uma taxa de 1,97
21 concepções/dose. Ou seja, diluindo uma palheta de sêmen para o uso em quatro fêmeas,
22 diminuindo o custo do sêmen por prenhez. Entretanto, no trabalho citado, no momento da
23 inseminação foi realizado exame ultrassonográfico para identificação do ovário com folículo
24 dominante e avaliação do diâmetro folicular para depósito do sêmen na região mediana do
25 corno uterino ipsilateral ao ovário com folículo pré-ovulatório. Situação essa que é de difícil
26 aplicabilidade em programas em larga escala. Desta forma, apesar de demonstrado a
27 eficiência da diluição do sêmen pós-descongelamento (SILVEIRA et al., 2013), as pesquisas
28 relacionadas ao uso de diluidor pós-descongelamento ainda são bem escassas, principalmente
29 relacionada a sua aplicabilidade prática nos programas em larga escala.

30 31 2.3 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES E SUAS PARTICULARIDADES

32
33 No mundo a produção *in vitro* de embriões (PIVE) cresce anualmente,
34 devido à elevada demanda por melhoramento genético. Nas últimas décadas, houve um

1 grande progresso científico com relação às biotécnicas envolvendo embriões mamíferos,
2 sendo a espécie bovina a maior beneficiada com este avanço tecnológico (HASLER, 2014;
3 PERRY, 2017; VIANA et al., 2017). Na bovinocultura, a PIVE tem se mostrado uma
4 importante ferramenta, principalmente com relação à possibilidade de utilização de sêmen
5 sexado com taxas expressivas de prenhez (PEIPPO et al., 2009; 2010) e, sêmen de alto valor
6 comercial, aliado ao baixo custo na produção de embriões (MARINHO & SENEDA, 2012).

7 A PIVE é um conjunto de procedimentos realizados em laboratório,
8 incluindo etapas de maturação, fertilização e cultivo, pelos quais oócitos imaturos são
9 utilizados para a produção de embriões (VIANA et al., 2010). A América do Sul é líder
10 mundial na PIVE, uma biotecnologia de multiplicação rápida e que tem crescido
11 significativamente nos últimos anos (MARINHO et al., 2013; PERRY, 2017; VIANA et al.,
12 2017).

13 Para a produção *in vitro* são utilizados meios específicos para maturação,
14 fertilização e cultivo *in vitro*, com o intuito de mimetizar o que ocorre fisiologicamente no
15 organismo. No entanto, os meios utilizados podem ser um fator determinante na produção e
16 qualidade dos blastocistos (RIZOS et al., 2003; SUDANO et al., 2011; SANCHES et al.,
17 2013; SOARES et al., 2017).

18 Dados de Silva et al. (2013) demonstraram taxas de blastocistos de 34,6%
19 para oócitos de fêmeas Jersey (*Bos taurus*) e 39,5% para vacas Nelore (*Bos indicus*). O
20 número de oócitos recuperados por OPU em *Bos taurus indicus* pode ser 3 a 4 vezes maior
21 em relação a *Bos taurus* (PONTES et al., 2009). A partir de oócitos de fêmeas Nelore Pontes
22 et al., (2009), relataram uma taxa de blastocistos de 41,4%. Entretanto, Pontes et al. (2011)
23 demonstraram uma taxa de 37,29% de embriões para a mesma raça.

24 Os embriões produzidos *in vitro* são diferentes dos embriões produzidos *in*
25 *vivo* (POLLARD & LEIBO, 1994; SARAGUSTY & ARAV, 2011), o que também tem sido
26 associado às diferenças nas características físicas e morfológicas desses embriões (GAD et al.,
27 2012). A maturação de oócitos é um passo crítico para a PIVE e sua eficiência é
28 comprometida pela cultura de sistemas que não substituem adequadamente as condições
29 fisiológicas (RIZOS et al., 2002; FARIN et al., 2007).

30 No embrião *in vivo*, fatores intrafolículos mantêm a parada meiótica e o
31 oócito permanece em o estágio da vesícula germinativa até o pico pré-ovulatório de LH, que
32 induz a retomada da meiose e expansão do *cumulus* (GILCHRIST, 2011). No entanto, quando
33 o oócito é removido do folículo antes do aumento do LH, como na técnica de OPU (PONTES
34 et al., 2011) a retomada espontânea da meiose ocorre antes da conclusão da maturação

1 citoplasmática, e isso compromete o desenvolvimento competência (GILCHRIST, 2011;
2 SANCHEZ & SMITZ; 2012;). Além disso, embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis
3 ao resfriamento e criopreservação, principalmente, devido ao maior acúmulo de lipídeos nos
4 embriões *in vitro* e à diferença na proporção de proteínas nestes dois tipos de embriões
5 (CAMARGO et al., 2011; DODE et al., 2013; SUDANO et al., 2013).

6 A quantidade de folículos antrais nas vacas doadora de oócitos para a
7 produção *in vitro* de embriões, também foi relatada por influenciar as taxas de PIVE. Santos
8 et al. (2016) compararam diversos parâmetros relacionados a PIVE entre vacas Nelore
9 descritas com alta (≥ 40 oócitos), média (18-25 oócitos) e baixa (≤ 7 oócitos) quantidade de
10 CCOs recuperados por OPU. Considerando, respectivamente, as fêmeas de alta, média e
11 baixa, a percentagem de oócitos viáveis foi de 80%, 69% e 71%; taxa de clivagem de 79%,
12 74% e 71%; taxa de blastocistos de 42%, 32% e 13%; e a percentagem de embriões
13 vitrificáveis de 81%, 77% e 58%, demonstrando o impacto na efetividade da técnica quando
14 utilizado este critério para seleção das doadoras de CCOs.

15 A morfologia embrionária, as taxas de clivagem e blastocisto são utilizadas
16 como critérios para a avaliação da competência embrionária (ALIKANI et al., 2002;
17 MARINHO et al., 2015). Porém, com o advento de marcadores moleculares e a utilização da
18 expressão gênica global, pode-se estudar, simultaneamente, a abundância de diferentes
19 transcritos relacionados à qualidade e desenvolvimento embrionário e oocitário (GAD et al.,
20 2012; ROSA et al., 2018). Desta forma, tornando-se evidente que possa ocorrer
21 comprometimento da competência embrionária sem alterações morfológicas ou de taxas de
22 produção embrionária perceptíveis. O rigoroso controle de qualidade durante todas as etapas
23 da PIVE torna-se essencial para obter resultados satisfatórios.

24 Diversos fatores podem afetar a qualidade embrionária, incluindo as
25 doadoras de oócitos, o sêmen utilizado, técnicos que realizam os procedimentos e,
26 principalmente, o sistema de produção *in vitro* (MARINHO et al., 2015; SILVA-SANTOS et
27 al., 2014c,d; ZHANG et al., 2015; SILVA et al., 2017; MOROTTI et al., 2017a).
28 Considerando o exposto, é nítida a necessidade de estudos que minimizem a influência destes
29 fatores na eficiência da PIVE bovinos.

30

31 2.4 PEPTÍDEO NATRIURÉTICO C (NPPC)

32

33 O peptídeo natriurético tipo C (NPPC) foi descrito por interagir com o
34 cérebro (MISONO et al., 2011), tecidos periféricos como o endotélio vascular (SUGA et al.,

1 1998), as células musculares lisas e os macrófagos (NARUKO et al., 1996), as células do
2 *cumulus* oócitos (KAWAMURA et al., 2011), entre outros tecidos periféricos,
3 desempenhando uma variedade de funções reguladoras locais (MISONO et al., 2011).

4 Existem três peptídeos (NPPA, NPPB e NPPC) e que possuem elevada
5 homologia, sendo que seus respectivos receptores (NPR 1 e 2) estão localizados na superfície
6 da célula alvo (MISONO et al., 2011; DE CESARO et al., 2015). Estes peptídeos apresentam
7 efeitos variados em diferentes tecidos em uma mesma espécie. Desta forma, os NPPA e
8 NPPB utilizam como comunicação celular o receptor NPR-1, enquanto o NPPC, utiliza como
9 receptor o NPR-2 (POTTER et al., 2009).

10 No processo de maturação do oócito o bloqueio da meiose ocorre pelo
11 acúmulo de AMPc (adenosina monofosfato cíclica) intracelular (FRANCIOSI et al., 2014) até
12 o momento da maturação, sendo a sua redução um sinal necessário para a maturação oocitária
13 (EYERS et al., 2005). O AMPc é uma molécula sinalizadora intracelular e moduladora no
14 controle da meiose em mamíferos, anfíbios e em alguns invertebrados (BILODEAU-
15 GOESEELS, 2003; DUBEIBE et al., 2017). As células do *cumulus* são responsáveis pela
16 síntese do AMPc que passa para o oócito pelas junções comunicantes (gap junctions;
17 DUBEIBE et al., 2017). Similarmente ao que ocorre *in vivo*, o NPPC já foi utilizado em
18 tratamento pré-maturação com o objetivo de elevar os níveis de AMPc intracelular de oócitos
19 na fase de maturação *in vitro* para diminuir a retomada precoce da meiose (FRANCIOSI et
20 al., 2014; SOARES et al., 2017).

21 A retomada espontânea da meiose ocorre antes da conclusão da maturação
22 citoplasmática comprometendo o desenvolvimento competência (SANCHEZ & SMITZ 2012;
23 SOARES et al., 2017), situação esse que ocorre nos CCOs aspirados para PIVE. Portanto,
24 estratégias para manter a parada meiótica até a maturação citoplasmática pode melhorar o
25 desenvolvimento embrionário.

26 Também se sabe que a AMPc está envolvida em inúmeras atividades
27 celulares e que a modulação dos níveis AMPc nas células embrionárias já foi associada com a
28 redução do seu depósito lipídico (PASCHOAL et al., 2017). Os lipídios são de extrema
29 importância para o metabolismo inicial dos embriões, fornecendo energia para seu
30 desenvolvimento (SUDANO et al., 2016), mas seu excesso pode afetar negativamente o
31 metabolismo e consequentemente a produção dos embriões PIV (WU et al., 2011).

32 Recentemente, Botigelli et al. (2018) utilizaram a suplementação de 100 nM
33 de NPPC por 24 horas na maturação *in vitro* para a produção *in vitro* de embriões, porém não
34 obteve diferença nas taxas de clivagem e blastocistos. Entretanto houve uma diminuição do

1 acúmulo lipídico citoplasmático e maior expressão do transcrito PTX3 após o tratamento com
2 NPPC nos CCOs. O gene PTX3 está envolvido na fisiologia das células do *cumulus* e também
3 utilizado como um marcador não invasivo da qualidade dos CCOs (ASSIDI et al., 2008;
4 UYAR et al., 2013; HAMMOND et al., 2015). Apesar da diminuição do acúmulo lipídico
5 citoplasmático nos CCOs na MIV, esse perfil não se manteve durante o CIV, uma vez que não
6 foi encontrada diferença no conteúdo lipídico citoplasmático dos embriões entre os grupos
7 (BOTIGELLI et al., 2018).

8 Diversas substâncias já foram adicionadas no meio de cultivo *in vitro* com o
9 objetivo de diminuir a concentração lipídica (SUDANO et al., 2011; PASCHOAL et al.,
10 2012; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), e a modulação dos níveis AMPc nas células
11 embrionárias já foi associada com a redução do seu depósito lipídico (PASCHOAL et al.,
12 2017). A utilização da suplementação de 100 nM de NPPC no cultivo *in vitro* de embriões
13 *Bos taurus indicus*, evidenciou diferenças em genes relacionados ao metabolismo inicial e
14 lipídico (IFNT2, SREBF1 e SCD), sinalizando uma possível atuação benéfica da
15 suplementação de NPPC no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (ZANGIROLAMO et al.,
16 2017), entretanto ainda restam algumas lacunas sobre a atuação do NPPC na produção *in*
17 *vitro*.

18

19 2.5 GENES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA, APOPTOSE, AO ESTRESSE OXIDATIVO, 20 METABOLISMO, DESENVOLVIMENTO E À QUALIDADE EMBRIONÁRIA

21

22 Com o avanço dos estudos em diferentes áreas da biologia, a avaliação da
23 expressão de genes relacionados a fisiologia dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*
24 tornou-se fundamental para esclarecer acontecimentos vinculados a seu desenvolvimento
25 (CASTILLO-MARTÍN et al., 2014; BOTIGELLI et al., 2018). Sendo assim, a análise de
26 alguns genes relacionados à pluripotência, resistência ao estresse oxidativo e a apoptose, ao
27 metabolismo inicial e energético, desenvolvimento e à qualidade embrionária são de extrema
28 importância para a compreensão sobre a fisiologia dos embriões *in vitro* após suplementação
29 no meio de maturação e cultivo *in vitro*, bem como do mecanismo de atuação das substâncias
30 utilizadas.

31 O gene glutathione peroxidase 1 (GPX1) está vinculado ao desenvolvimento
32 embrionário, relacionado com a redução de hidro peróxidos orgânicos, peróxidos de
33 hidrogênio (H₂O₂; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013), sendo que o estresse oxidativo
34 também pode influenciar sua expressão (CEKO et al., 2015). Este gene é membro da família

1 de seleno proteínas Glutathione Peroxidase (GPX), a qual tem sido demonstrada por
2 proporcionar funções antioxidantes (WANG et al., 2017). Juntamente com o selênio (Se),
3 desempenha papel importante em funções como: defesa, formação de hormônios tireoidianos,
4 resposta imune, síntese de DNA, fertilidade e reprodução (CEKO et al., 2015).

5 A maturação e cultivo *in vitro*, tal como outros procedimentos como a
6 vitrificação e aquecimento, foram relatados como influenciadores no estresse de oócitos e
7 blastocistos suínos, devido ao aumento das concentrações de espécies reativas ao oxigênio
8 (ROS), incluindo os níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂ é então transformado
9 em água por ação da catalase e pela GPX presente no citoplasma e nas mitocôndrias
10 (CASTILLO-MARTÍN et al., 2014), devido as suas funções antioxidantes.

11 Os genes fator de transcrição de ligação ao elemento regulador do estero 1
12 (SREBF1) e Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) são elevados na diferenciação celular inicial de
13 embriões (HUTCHINSON et al., 2012) e o acúmulo de lipídeos intracitoplasmáticos nas
14 células pode modular sua expressão gênica. O SREBF1 também está envolvido no
15 metabolismo lipídico por modulação da expressão de genes relacionados com a lipogênese,
16 com elevada importância na maturação *in vitro* (LEE et al., 2016).

17 O gene aldo-ceto redutase (AKR1B1) está relacionado com o metabolismo
18 da glicose (CEBRIAN-SERRANO et al., 2013), fornecendo energia para a célula. Dode et al.
19 (2006) detectou este gene em embriões bovinos produzidos *in vitro*, relacionado com o
20 metabolismo inicial de possíveis embriões com duas células. A expressão deste gene tem sido
21 associada a falhas no estabelecimento da gestação ou reabsorção do embrião, mostrando
22 importante papel na embriogênese.

23 A estimativa da qualidade embrionária e da possibilidade de implantação
24 uterina pode ser analisada pelos transcritos prostaglandina-endoperóxido sintase 2/Ciclo-
25 oxigenase-2 (PTGS2/COX2). Estas prostaglandinas estão envolvidas na modulação do local
26 de implantação endometrial (EL-SAYED et al., 2006; AVILION et al., 2003). A família COX
27 é composta por COX1, COX2 e COX3. A COX2 é sintetizada no citoplasma e desempenha
28 um papel fundamental na inflamação celular, sua inibição é importante para reduzir e
29 controlar a inflamação celular, atuando no desenvolvimento e na qualidade dos blastocistos *in*
30 *vitro* (KHAN et al., 2018). A expressão do Fator de crescimento endotelial vascular tipo A
31 (VEGFA) também tem efeito potencial na implantação embrionária, sendo importante para a
32 formação vasos sanguíneos (ZHANG et al., 2009; BISHOP et al. 2017).

33 O gene Derivado do Miocárdio e da Crista Neural Expresso-1 (HAND1),
34 está relacionado com os fatores transcricionais do trofoblasto (SCHIFFMACHER &

1 KEEFER, 2013). Sua expressão está vinculada com a diferenciação das células do trofoblasto
2 sendo essencial para o desenvolvimento embrionário (PEARTON et al., 2014).

3 O complexo do Fator de Transcrição Silenciador (REST) desempenha um
4 papel central na regulação da expressão gênica através da transcrição de diversos mecanismos
5 e alterações ocasionais nas modificações da cromatina, particularmente durante os estágios
6 iniciais de desenvolvimento. Os locais de ligação ao REST regularam diferentes categorias de
7 genes funcionais (SEKI et al., 2014)

8 O Fator de Transcrição Silenciador Tipo 1 (REST1), pode atuar como um
9 centro para o recrutamento de múltiplas enzimas modificadoras da cromatina, descobrindo
10 interdependências entre enzimas individuais que afetam a regulação do gene (OOI & WOOD,
11 2007). Em humanos, o REST tem um papel na regulação do crescimento e nas primeiras
12 decisões de diferenciação em células-tronco embrionárias (THAKORE-SHAH et al., 2015).

13 Estudos em células troncos embrionárias humanas mostraram que REST é
14 diretamente regulado pelos fatores centrais de transcrição de pluripotência como POU Classe
15 5 *Homeobox* 1 (POU5F1), Região Sexual Determinante Y - *Box* 2 (SOX2) e Nanog
16 *Homeobox* (NANOG; BOYER et al., 2005; LOH et al., 2006), sendo os níveis de REST
17 também importante para a regulação da sobrevivência (THAKORE-SHAH et al., 2015).

18 Os genes *homeobox* são um grupo de genes com uma sequência de DNA
19 comum, que estão envolvidos na segmentação do corpo e na diferenciação celular durante o
20 desenvolvimento embrionário. (ALLOUBA et al., 2015). A expressão do gene NANOG é um
21 fator transcricional que contém um homeodomínio e expresso em células pluripotenciais de
22 embriões pré-implantação e pós-implantação precoce, e células-tronco embrionárias
23 (YAMAGUCHI et al., 2005), funcionando como um participante importante na manutenção
24 da pluripotência das células-tronco (ALLOUBA et al., 2015). Também relacionado com a
25 pluripotência em embriões bovinos, o gene POU5F1 (SIQUEIRA & HANSEN, 2016), se
26 expressa principalmente na massa celular interna de blastocistos, sendo utilizado para
27 marcações de qualidade de embriões (MORI et al., 2015).

28 Os Fatores de Transcrição do *Forkhead Box* (FOXO) estão presentes
29 durante a maturação do oócito e no desenvolvimento do embrião *in vivo*, e tem função
30 fundamental na regulação do desenvolvimento do embrião *in vitro* sob condições de estresse
31 (KUSCU et al., 2015). Os FOXOs regulam a expressão de genes envolvidos em mecanismos
32 como a apoptose, resistência ao estresse oxidativo, reparo de DNA, metabolismo de glicose,
33 homeostases de energia e diferenciação (WEBB et al., 2014; KUSCU et al., 2015). O

1 *Forkhead Box O3* (FOXO3) também pode estar participando do mecanismo compensatório
2 lipídico em embriões (XIOUNG et al.; 2012; BOTIGELLI et al., 2018).

3 O Interferon Tau (IFNT2) que é frequentemente correlacionado com o
4 reconhecimento materno da gestação e com a viabilidade embrionária, também é descrito
5 como indicador para a qualidade dos embriões PIVE (SCHIFFMACHER & KEEFER, 2013).
6 Entretanto, quando encontradas altas concentrações de mRNA do gene podem estar
7 relacionado com o estresse embrionário sofrido através das ROS (RODINA, et al. 2009) e
8 associado a qualidade inferior deste embrião (WRENZYCKI et al., 2001; STINCHOF et al.,
9 2011). A comparação direta com os blastocistos gerados *in vivo*, os embriões produzidos *in*
10 *vitro* mostram um nível de transcrição de IFNT2 aumentado. Em contraste, o estudo realizado
11 por Yao et al (2009) não conseguiu detectar diferenças na expressão de IFNT2 entre embriões
12 gerados *in vitro* e *in vivo* após criopreservação.

13 A Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP15) e o Fator de Crescimento e
14 Diferenciação 9 (GDF9) são fatores de crescimento derivados do oócito do tipo TGF β
15 envolvidos na foliculogênese ovariana como reguladores críticos de muitos processos
16 celulares da granulosa e taxa de ovulação (MONESTIER et al., 2014). O BMP15 e o Fator de
17 Crescimento de Fibroblastos 10 (FGF10) aumentam a expansão do cumulus, a captação de
18 glicose e a expressão de genes na cascata ovulatória durante a maturação *in vitro* de
19 complexos cumulus-oócitos bovinos (HUSSEIN et al., 2006; 2011; SUDIMAN et al., 2014).

20 Os fatores relacionados ao Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
21 (STAT) estão envolvidos nas vias de sinalização de numerosas citocinas para regular o
22 crescimento e a diferenciação de células de mamíferos (MAJ & CHELMONSKA-SOYTA
23 2007). O gene Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT3) é conhecido por
24 mediar a sinalização de citocinas e regular a maturação citoplasmática e nuclear do oócito,
25 estimular a proliferação e diferenciação celular e mediar a apoptose celular (RAWLINGS,
26 ROSLER, & HARRISON, 2004; DANG-NGUYEN et al., 2014). A ativação de STAT3 em
27 blastocistos bovinos está associada à diferenciação da massa celular interna (MENG et al.
28 2015), também melhora a sobrevivência celular e reduz a apoptose em embriões de
29 camundongos (SHEN et al. 2009).

30 O gene Choque Térmico 70kDa Proteína 1A (HSPA1A) também tem papel
31 na prevenção da apoptose sob várias condições de estresse, como estresse por calor (COSTA
32 & ARNDT, 2000). A resposta ao choque térmico, caracterizada pelo aumento da expressão de
33 proteínas de Choque Térmico (HSPs), é induzida pela exposição de células e tecidos a
34 condições que causam estresse agudo ou crônico (PIRKKALA et al., 2001).

1 O gene que codifica as HSPs é induzido após um estresse térmico graças à
2 ativação do Fator de Transcrição do Choque Térmico (HSF), esta resposta celular e protetora
3 se dá para a adaptação ao estresse térmico nos organismos (DAI et al., 2013; LAL et al.,
4 2015). Le Masson & Christians, (2011) também relataram que mesmo na ausência de
5 qualquer estresse, o gene Fator de Transcrição de Choque Térmico Tipo 1 (HSF1) regula o
6 gene HSPA1 em oócitos e embriões precoces. Enfatizando o papel das HSF maternas e
7 paternas na expressão regulada pelo desenvolvimento de HSPA1 observada quando ocorre a
8 ativação do genoma zigótico.

9 Durante o desenvolvimento embrionária inicial, a metilação da citosina é
10 catalisada por DNA Metiltransferases (citosina-5; DNMTs). O DNMT tipo 1 (DNMT1) copia
11 a metilação na nova fita de DNA em locais de citosina-guanina hemimetilados após a
12 replicação do DNA, que medeia a herança epigenética nas células em divisão. Em contraste, o
13 DNA (citosina-5) metiltransferase 3 α e β (DNMT3 α e o DNMT3 β) medeiam a metilação de
14 novo através da segmentação de citosina-guanina não-metilados. O nocaute do DNMT1 e
15 DNMT3 β em camundongos leva à letalidade na metade da gestação, indicando que a
16 metilação DNA é essencial para o desenvolvimento (AUCLAIR et al., 2014). Os padrões de
17 metilação do DNA são estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário inicial no
18 epiblasto e estabelecimento e manutenção de um genoma hipermetilado são cruciais para o
19 desenvolvimento embrionário além da gastrulação. Desta forma, o DNMT3 α e o DNMT3 β
20 possuem funções específicas e sobrepostas em metilação embrionária, mas que não foi
21 investigada ainda de forma sistemática (AUCLAIR et al., 2014).

22 Os peptídeos natriuréticos (NPs) são conhecidos por regular eventos
23 reprodutivos. Os três peptídeos (NPPA, NPPB e NPPC) possuem elevada homologia, sendo
24 que seus respectivos receptores (NPR 1 e 2) estão localizados na superfície da célula alvo
25 (MISONO et al., 2011; DE CESARO et al., 2015). Estes peptídeos apresentam efeitos
26 variados em diferentes tecidos em uma mesma espécie. Desta forma, os NPPA e NPPB
27 utilizam como comunicação celular o receptor NPR-1, enquanto o NPPC, utiliza como
28 receptor o NPR-2 (POTTER et al., 2009).

29 Os NPPA e NPPC e seus três receptores são expressos em CCOs de bovinos
30 e aumentam os níveis de GMPc em células do cumulus (DE CESARO et al., 2015; ROSA et
31 al., 2018). As células da granulosa de folículos próximos ao estágio de desvio também
32 expressam o RNAm para os três receptores NP (NPR1, NPR2e NPR3), mas não para os
33 precursores de NP (NPPA, NPPB e NPPC; CESARO et al., 2018). A presença da expressão
34 dos receptores dos NPs foi relatada nas células do cumulus e da granulosa de oócitos bovinos

1 (CESARO et al., 2015; 2018; ROSA et al., 2018), entretanto, não existem dados na literatura
2 sobre a expressão destes receptores em embriões bovinos e de outras espécies.

3 4 2.6 INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE FOLÍCULOS ANTRAIIS NA REPRODUÇÃO

5
6 O número de folículos antrais (FAs) é uma característica altamente
7 variável no ovário da fêmea bovina (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2008; 2011;
8 EVANS et al., 2012), porém existe uma alta repetibilidade no mesmo indivíduo (SILVA-
9 SANTOS et al., 2014c; MOROTTI et al., 2017).

10 Devido a esta característica de alta repetibilidade, foi demonstrado ser
11 possível classificar as fêmeas em baixa, intermediária ou alta contagem de folículos antrais de
12 acordo com o número de folículos ≥ 3 mm) identificados no ultrassom, independentemente da
13 estação do ano, do número de ondas de crescimento folicular por ciclo, da idade e do status
14 lactacional (BURNS et al., 2005; SILVA-SANTOS et al., 2014c). Desta forma, utilizando
15 apenas um exame ultrassonográfico de rotina é possível identificar a classificação das fêmeas
16 de acordo com a contagem dos FAs.

17 O número de folículos antrais e sua relação com a fertilidade tem sido foco
18 de inúmeros estudos e de alta importância para o desempenho reprodutivo de bovinos e suas
19 biotecnologias (SILVA-SANTOS et al., 2014 a,b; SANTOS et al., 2016; MOROTTI et al.,
20 2017ab). Os FAs foram descritos como um marcador fenotípico de características
21 reprodutivas, como os níveis circulantes de hormônio anti-Mülleriano (AMH; STOJSIN-
22 CARTER et al., 2016), testosterona (MARTINEZ et al., 2016), oócito qualidade (IRELAND
23 et al., 2009; ROSA et al., 2018), resposta a tratamentos de superovulação (IRELAND et al.,
24 2007), número e qualidade de embriões produzidos *in vitro* (PONTES et al., 2011; SANTOS
25 et al., 2016), diâmetro folicular (MOROTTI et al., 2018) e taxas de prenhez (MARTINEZ et
26 al., 2016; MOSSA et al., 2012).

27 Há uma grande variabilidade no número de embriões produzidos por
28 doadora, tanto no método *in vivo* quanto *in vitro* (PONTES et al., 2009; 2010; 2011). Esta
29 variabilidade está relacionada principalmente à eficiência na taxa de recuperação de oócitos e
30 à resposta superovulatória, fatores estes dependentes do número de folículos antrais da
31 doadora e que podem afetar significativamente o sucesso na produção de embriões
32 (IRELAND et al., 2007; 2011; SILVA-SANTOS et al., 2014a,b,c; SANTOS et al., 2016).

33 Apesar da inquestionável vantagem quantitativa (maior número de
34 embriões) em selecionar a doadora com base na CFA, o impacto deste critério sobre outros

1 aspectos da fertilidade e da produtividade em bovinos de corte e de leite ainda possui lacunas,
2 particularmente nos animais *Bos indicus* (MOROTTI et al., 2015; 2017; WATANABE et al.,
3 2017).

4 5 2.7 IMPACTO DO CONTEÚDO LIPÍDICO NOS EMBRIÕES

6
7 Os lipídios têm sido intensivamente estudados em muitas células de
8 mamíferos. Nos oócitos e embriões bovinos, os lipídios citoplasmáticos mais abundantes são
9 os triacilglicerídeos que são armazenados em gotículas lipídicas (TAG; FERGUSON &
10 LEESE, 1999). Os lipídios intracelulares representam uma importante fonte de energia para
11 oócitos e embriões pré-implantação (FERGUSON & LEESE, 1999). Recentemente, Schwarz
12 et al. (2018) descreveram as influências dos níveis de GMPc no conteúdo lipídico em oócitos,
13 embriões e em transcritos relacionados ao metabolismo energético. No entanto, poucos
14 estudos foram realizados avaliando os efeitos dos moduladores de GMPc sobre o
15 metabolismo lipídico (SCHWARZ et al., 2017; DEL COLLADO et al., 2014).

16 Diversos estudos são realizados visando redução do acúmulo de lipídios nos
17 embriões PIV, sendo pesquisadas modificações dos meios de cultura para possibilitar a
18 melhoria no desempenho e na qualidade embrionária, bem como, melhorar a criotolerância
19 (SUDANO et al., 2012; DEL COLLADO et al., 2016; BOTIGELLI et al., 2018).

20 O acúmulo excessivo de gotículas lipídicas intracelulares durante o
21 desenvolvimento embrionário *in vitro* causa danos à qualidade dos embriões, possivelmente
22 aumentando a sua sensibilidade ao estresse oxidativo e à criopreservação (RIZOS et al., 2002;
23 PEREIRA et al., 2008). Sendo o meio de cultura potencialmente o principal responsável ao
24 acúmulo de lipídios (DINNYES et al., 2009).

25 Dentre as técnicas analíticas para análise lipídica de oócitos e embriões
26 estão a espectrometria de massa (EM; SILVA-SANTOS et al., 2014d) e a Ionização por
27 eletrospray por dessorção acoplada ao espectrofotômetro de massa (DESI-MS; FERREIRA et
28 al., 2012). Porém, a técnica de DESI-MS fornece uma maior precisão dos lipídeos
29 encontrados nos oócitos e embriões (SUDANO et al., 2011; PASCHOAL et al., 2017;
30 LASKOWSKI et al., 2018). Desta forma, diversas abordagens focam na redução do acúmulo
31 de lipídios em embriões de PIV através de modificações nos meios de cultura, visando
32 melhorias no desempenho e qualidade embrionária.

33 Certamente, muitos aspectos relacionados na presente revisão necessitam de
34 mais investigações, apesar do grande progresso na IATF e PIVE nos últimos anos a eficiência

1 destas biotécnicas ainda possuem um grande potencial de avanço, seja no aperfeiçoamento da
2 metodologia empregada ou nas estratégias para diminuição de custos, assim tornando cada
3 vez mais vantajoso a sua utilização. Além disso, várias lacunas relacionadas à influência do
4 número de FAs precisam de melhor compreensão, a fim de permitir ajustes na seleção dos
5 rebanhos e melhorar a eficiência das biotécnicas reprodutivas.

6

7

1 **REFERÊNCIAS**

- 2
3 AIRES, V.A., HINSCH, K.D., SCHLOESSER, F.M. BOGNER, K., MUELLER-
4 SCHLOESSER, S., HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk based and
5 soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, 60,
6 269-279, 2003.
7
8 ALIKANI, M., SADOWY, S., COHEN, J. Human embryo morphology and developmental
9 capacity. In: A. VAN SOOM, & M. BOERJAN. Assessment of Mammalian Embryo Quality:
10 Invasive and Non-invasive Techniques (Eds.). Dordrecht, Netherlands: **Kluwer Acad. Pub.**,
11 p. 1- 31, 2002.
12
13 ALLOUBA, M.H., ELGUINDY, A.M., KRISHNAMOORTHY, N., YACOUB, M.H.,
14 AGUIB, Y.E. Nanog: A pluripotency homeobox (master) molecule. **Glob Cardiol Sci Pract.**
15 (3):36, 2015.
16
17 AMBROSE, J.D., DROST, M., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J., LEIBFRIED-
18 RUTLEDGE, M.L., THATCHER, M.J., KASSA, T., BINELLI, M., HANSEN, P.J.,
19 CHENOWETH, P.J., THATCHER, W.W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and
20 frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **J**
21 **Dairy Sci**, 82:2369-2376, 1999.
22
23 ASSIDI, M., DUFORT, I., ALI, A., HAMEL, M., ALGRIANY, O., DIELEMANN, S.,
24 SIRARD, M.A. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine
25 cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in
26 vitro. **Biol Reprod**, 79:209–22, 2008.
27
28 **Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA)**. 2017. Disponível em:
29 <<http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>>. Acesso em: 28 de Junho de 2018.
30
31 AUCLAIR, G., GUIBERT, S., BENDER, A., WEBER, M. Ontogeny of CpG island
32 methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in
33 the mouse. **Genome Biol**, 15:545, 2014.
34
35 AVILION, A.A., NICOLIS, S.K., PEVNY, L.H., PEREZ, L., VIVIAN, N., LOVELL-
36 BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function.
37 **Genes Dev**, 17:126–40, 2003.
38
39 BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T. Efeito de diferentes protocolos
40 de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes.
41 **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 26, 218-221, 2002.
42
43 BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of
44 hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical
45 climates. **Anim. Reprod. Sci.**, 82-83, 479-486, 2004.
46
47 BARUSELLI, P. S., BATISTA, E. O. S., VIEIRA, L. M., e SOUZA, A. H. BARUSELLI, P.
48 S. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. **Anim.**
49 **Reprod.**, 12, 3, 487-497, 2015.
50

- 1 BARUSELLI, P. S., FERREIRA RM, COLLI MHA, ELLIFF FM, SÁ FILHO MF, VIEIRA
2 L, FREITAS BG. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in
3 reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Anim Reprod**, 14:558-571, 2017.
4
- 5 BARUSELLI, P. S., FERREIRA R.M., SÁ FILHO, M.F., BÓ, G.A. Review: using artificial
6 insemination vs natural service in beef herds. **Animal**, 12:1-8, 2018.
7
- 8 BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear
9 maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**, 60, 1679-1690,
10 2003.
11
- 12 BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of
13 nuclear maturation in bovine oocytes. **Theriogenology**, 66, 297-306, 2006.
14
- 15 BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S., MAPLETOFT, R.J. Synchronization techniques to increase the
16 utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Anim Reprod**, 10:137-142.
17 2013.
18
- 19 BISHOP, C.V., LEE, D.M., SLAYDEN, O.D., LI, X. Intravenous neutralization of vascular
20 endothelial growth factor reduces vascular function/permeability of the ovary and prevents
21 development of OHSS-like symptoms in rhesus monkeys. **J. Ovarian Res.** 6;10(1):41, 2017.
22
- 23 BOTIGELLI, R.C., RAZZA, E.M., PIOLTINE, E.M., FONTES, P.K., SCHWARZ, K.R.L.,
24 LEAL, C.L.V., NOGUEIRA, M.F.G. Supplementing in vitro embryo production media by
25 NPPC and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene expression of bovine
26 cumulus-oocyte complexes and embryos. **Reprod Biol.**,18(1):66-75, 2018.
27
- 28 BOYER, L.A., LEE, T.I., COLE, M.F., JOHNSTONE, S.E., LEVINE, S.S., ZUCKER, J.P.,
29 GUENTHER, M.G., KUMAR, R.M., MURRAY, H.L., JENNER, R.G., GIFFORD, D.K.,
30 MELTON, D.A., JAENISCH, R., YOUNG, R.A. Core transcriptional regulatory circuitry in
31 human embryonic stem cells. **Cell**, 122, 947–956, 2005.
32
- 33 CAMARGO, L.S.A., BOITE, M.C., WOHLRES-VIANA, S., MOTA, G.B., SERAPIAO, R.
34 V., SA, W.F., VIANA, J.H.M., NOGUEIRA, L.A.G. Osmotic challenge and expression of
35 aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, 63,
36 256–262, 2011.
37
- 38 CÁNEPA, M.J., ORTEGA, N.M., MONTELEONE, M.C., MUCCI, N., KAISER, G.G.,
39 BROCCO, M., MUTTO, A. Expression profile of genes as indicators of developmental
40 competence and quality of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine
41 embryos. **PLoS One**. 30;9(9), 2014.
42
- 43 CASTILLO-MARTÍN, M., BONET, S., MORATÓ, R., YESTE, M. Supplementing culture
44 and vitrification-warming media with L-ascorbic acid enhances survival rates and redox status
45 of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. **Cryobiology**, 68,
46 451–458, 2014.
47
- 48 CEBRIAN-SERRANO, A., SALVADOR, I., GARCÍA-ROSELLO, E., PERICUESTA, E.,
49 PÉREZ-CEREZALES, S., GUTIERREZ-ADÁN, A., COY, P., SILVESTRE, MA. Effect of

- 1 the Bovine Oviductal Fluid on In Vitro Fertilization, Development and Gene Expression of In
2 Vitro-Produced Bovine Blastocysts. **Reprod. Domest. Anim.**, 48, 331–338, 2013.
- 3
- 4 CEKO, M. J.; HUMMITZSCH, K.; HATZIRODOS, N.; BONNER, W. M.; AITKEN, J. B.;
5 RUSSELL, D. L.; LANE, M.; RODGERS, R. J.; HARRIS, H. H. X-Ray fluorescence
6 imaging and other analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive
7 function. **Metallomics**, v. 7, p. 71-82, 2015.
- 8
- 9 CREPALDI, G.A., FREITAS, B.G., VIEIRA, L.M., SÁ FILHO, M.A., GUERREIRO, B.M.,
10 BARUSELLI, P.S. Reproductive efficiency of Nelore females submitted to three consecutive
11 FTAI programs with 32 days of interval between inseminations. **Anim. Reprod.**, 11 (3) 355,
12 2014. (Abstract).
- 13
- 14 DE CESARO, M. P.; MACEDO, M. P.; SANTOS, J. T.; ROSA, P. R. A.; LUDKE, C. A.;
15 RISSI, V. B.; GASPERIN, B. G.; GONÇALVES, P. B. D. Natriuretic peptides stimulate
16 oocyte meiotic resumption in bovine. **Anim. Reprod. Sci.**, 159, 52–59, 2015.
- 17
- 18 DEL COLLADO, M., BOTIGELLI, R.C., SCHWARZ, K.R.L., ELIAS, C., LEAL, C.L.V.,
19 ANDRADE, A.F.C., et al. Effects of sildenafil or snap supplementation, or, both, during in
20 vitro maturation on lipid and reactive oxygen species accumulation in bovine oocytes and
21 embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, 213–213. 2014.
- 22
- 23 DEL COLLADO, M., SARAIVA, N.Z., LOPES, F.L., GASPAR, R.C., PADILHA, L.C.,
24 COSTA, R.R., et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum
25 supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes
26 and lipid accumulation in bovine embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, 28:1721–32. 2016.
- 27
- 28 DODE, M. A. N., DUFORT, I., MASSICOTTE, L., SIRARD, M. A., Quantitative expression
29 of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Mol. Reprod.**
30 **Dev.**, 73, 288–297, 2006.
- 31
- 32 DODE, M.A.N., LEME, L.O., SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos
33 produzidos *in vitro*: Review. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 37, 145-150, 2013.
- 34
- 35 DUBEIBE, D.F., CALDAS-BUSSIÈRE, M.C., MACIEL JR, V.L., SAMPAIO, W.V.,
36 QUIRINO, C.R., GONÇALVES, P.B.D., DE CESARO, M.P., FAES, M.R., PAES DE
37 CARVALHO, C.S. L-arginine affects the IVM of cattle cumulus-oocyte complexes.
38 **Theriogenology**, 88, 134–144, 2017.
- 39
- 40 EDWARDS, S.A.A., BO, G.A., CHANDRA, K.A., ATKINSON, P.C., MCGOWAN, M.R.
41 Comparison of the pregnancy rates and costs per calf born after fixed-time artificial
42 insemination or artificial insemination after estrus detection in *Bos indicus* heifers
43 **Theriogenology**, 83, 114–120, 2015.
- 44
- 45 EL-SAYED, A., HOELKER, M., RINGS, F., SALILEW, D., JENNEN D. Large-scale
46 transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after
47 transfer to recipients. **Physiol Genomics**, 28, 84-96, 2006.
- 48

- 1 EYERS, P.A., LIU, J., HAYASHI, N.R., LEWELLYN, A.L., GAUTIER, J., MALLER, J.L.
2 Regulation of the G(2)/M transition in *Xenopus* oocytes by the cAMP-dependent protein
3 kinase. **J. Biol. Chem.**, 280, 24339-24346, 2005.
4
- 5 FRANCIOSI, F., COTICCHIO, G., LODDE, V., TESSARO, I., MODINA, S. C., FADINI,
6 R., DAL CANTO, M., RENZINI, M. M., ALBERTINI, D., LUCIANO, A. M. Natriuretic
7 Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap Junction-Mediated
8 Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. **Biol. Reprod.**, 91, 1–9, 2014.
9
- 10 GAD, A., SCHELLANDER, K., HOELKER, M., TESFAYE, D. Transcriptome profile of
11 early mammalian embryos in response to culture environment. **Anim. Reprod. Sci.**, 134, 76-
12 83, 2012.
13
- 14 GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities
15 for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reprod. Fertil Dev.**, 23:23–31.
16 2011.
17
- 18 HAMMOND, E.R., STEWART, B., PEEK, J.C., SHELLING, A.N., CREE, L.M. Assessing
19 embryo quality by combining non-invasive markers: early time-lapse parameters reflect gene
20 expression in associated cumulus cells. **Hum. Reprod.**, 30:1850–60, 2015.
21
- 22 HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal
23 *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences.
24 **Theriogenology**, 81, 152–169, 2014.
25
- 26 HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and
27 individual differences. **Theriogenology**, 57, 47-58, 2000.
28
- 29 HUSSEIN, T.S., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B. Os fatores secretados por oócitos
30 aumentam a competência de desenvolvimento do oócito. **Dev. Biol.**, 296: 514-521, 2006.
31
- 32 HUSSEIN, T.S., DE SUTTON-MCDOWALL, M.L., GILCHRIST, R.B., THOMPSON, J.G.
33 Efeitos temporais de fatores exógenos-segregados do oócito na competência desenvolvendo do
34 oócito bovino durante MIV. **Reprod. Fertil. Dev.**, 23:576-584, 2011.
35
- 36 HUTCHINSON, I. A., HENNESSY, A. A., WATERS, S. M., DEWHURST, R. J., EVANS,
37 A. C. O., LONERGAN, P., BUTLERA, S. T. Effect of supplementation with different fat
38 sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle.
39 **Theriogenology**, 78, 12–27, 2012.
40
- 41 IETS, 2013. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals.
42 **Embryo transfer News Letter**, v.33, 2015.
43
- 44 KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; KAWAMURA, N.; TAKAE, S.; OKADA, A.;
45 KAWAGOE, Y.; MULDER, S.; TERADA, Y.; HSUEH, A. J. Pre-ovulatory LH/hCG
46 surgedecreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote
47 meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. **Hum. Reprod.**, 26, 3094–3101, 2011.
48

- 1 KHAN, I., CHOWDHURY, M.M.R., SONG, S.H., MESALAM, A., ZHANG, S., KHAN
2 KHALIL, A.A., JUNG, E.H., KIM, J.B., JAFRI, L., MIRZA, B., KONG, I.K. Lupeol
3 supplementation improves the developmental competence of bovine embryos in vitro.
4 **Theriogenology**, 107:203-210, 2018.
5
- 6 KUSCU, N., CELIK-OZENCI, C. FOXO1, FOXO3, AND FOXO4 are differently expressed
7 during mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. **Gene. Expr.**
8 **Patterns**, 18(1-2):16-20, 2015.
9
- 10 LEE, S.; JIN, J.X.; KHOIRINAYA, C.; KIM, G.A., LEE, B.C. Lanosterol influences
11 cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro and improves preimplantation development of
12 cloned embryos. **Theriogenology**, 85, 575–584, 2016.
13
- 14 LOH, Y.H., WU, Q., CHEW, J.L., VEGA, V.B., ZHANG, W., CHEN, X., BOURQUE, G.,
15 GEORGE, J., LEONG, B., LIU, J., WONG, K.Y., SUNG, K.W., LEE, C.W., ZHAO, X.D.,
16 CHIU, K.P., LIPOVICH, L., KUZNETSOV, V.A., ROBSON, P., STANTON, L.W., WEI,
17 C.L., RUAN, Y., LIM, B., NG, H.H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates
18 pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nat. Genet.**, 38, 431–440, 2006.
19
- 20 LONERGAN, P., MONAGHAN, P., RIZOS, D. Effect of follicle size on bovine oocyte
21 quality and development competence following maturation, fertilization and culture in vitro.
22 **Mol. Reprod. Dev.**, 37, 48 -53, 1994.
23
- 24 MAJ, T., CHELMONSKA-SOYTA, A. Pleiotropy and redundancy of STAT proteins in
25 early pregnancy. **Reprod Domest Anim**, 42 343–353. 2007.
26
27
- 28 MARINHO, L.S.R., SENEDA, M.M. Novas aplicações do uso de embriões produzidos in
29 vitro (PIV). **Anais 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, v.5, 2012.
30
- 31 MARINHO, L.S.R., MACHADO, F.Z., SENEDA, M.M., 2013: Strategies to improve the
32 reproductive efficiency of dairy cattle. In: Hernandez CT (ed), **Dairy cows: reproduction,**
33 **nutritional management and diseases**. Nova Science Publishers, New York, 127–148,
34 2013.
35
- 36 MARINHO, L. S. R., SANCHES, B. V., ROSA, C. O., TANNURA, J. H., RIGO, A. G.,
37 BASSO, A. C., PONTES, J. H. F., SENEDA, M. M. Pregnancy Rates to Fixed Embryo
38 Transfer of Vitrified IVP Bos indicus, Bos taurus or Bos indicus X Bos taurus Embryos.
39 **Reprod Domest Anim**, 50, 807–811, 2015.
40
- 41 MARQUES, M.O., MOROTTI, F., SILVA, C.B., RIBEIRO JÚNIOR, M., SILVA, R.C.P.,
42 BARUSELLI, P.S., SENEDA, M.M. Influence of category –heifers, primiparous and
43 multiparous lactating cows –in a large -scale resynchronization fixed-time artificial
44 insemination program. **J Vet Sci**, 16:367-371, 2015.
45
- 46 MARQUES, M.O., MOROTTI, F., LORENZETTI, E., SILVA, C.B., SENEDA, M.M.
47 Intensified use of TAI and sexed semen on commercial farms. **Anim. Reprod.**, 15, 3, 197-
48 203, 2018.
49

- 1 MENG, F., FORRESTER-GAUNTLETT, B., TURNER, P., HENDERSON, H., OBACK, B.
2 Signal inhibition reveals JAK/STAT3 pathway as critical for bovine inner cell mass
3 development. **Biol. Reprod.**, 93 132. 2015.
- 4
5 MISONO, K. S., PHILO, J. S., ARAKAWA, T., OGATA, C. M., QIU, Y., OGAWA, H.,
6 YOUNG, H. S. Structure, signaling mechanism and regulation of natriuretic peptide receptor-
7 guanylate cyclase. **The FEBS Journal**, v. 11, p. 1818–1829, 2011.
- 8
9 MONESTIER, Ó., SERVIN, B., AUCLAIR, S., BOURQUARD, T., POUPON, U.M.,
10 PASCAL, L., FABRE, S. Evolutionary Origin of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth
11 and Differentiation Factor 9 and Differential Selective Pressure Between Mono- and
12 Polyovulating Species. **Biol. Reprod.**, 91 (4) 83, 1-13, 2014.
- 13
14 MOROTTI, F., BARREIROS, T.R.R., MACHADO, F.Z., GONZÁLEZ, S.M., MARINHO,
15 L.S.R., SENEDA, M.M. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for
16 fertility in cattle? **Anim. Reprod.**, v.12, p.479-486, 2015.
- 17
18 MOROTTI, F., ZANGIROLAMO, A. F., SILVA, N. C., SILVA, C. B., ROSA, C. O.,
19 SENEDA, M. M. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy.
20 **Anim. Reprod.**, 14, 514-520, 2017a.
- 21
22 MOROTTI, F., SANTOS, G.M.G., JÚNIOR, C. K., SILVA-SANTOS, K.C., ROSO, V.M.,
23 SENEDA, M. M. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in
24 beef heifers. **Theriogenology**, 91, 21-26, 2017b.
- 25
26 MOROTTI, F., MORETTI, R, DOS SANTOS, G M G, SILVA-SANTOS, K C, RAMOS
27 CERQUEIRA, P H, SENEDA, M. M. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos*
28 *indicus* cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination.
29 **Anim. Reprod. Sci.**, 188, 170-177, 2018.
- 30
31 NARUKO, T., UEDA, M., VAN DER WAL, A. C., VAN DER LOOS, C. M., ITOH, H.,
32 NAKAO, K., BECKER, A. E. C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic
33 lesions. **Circulation**, 94, 3103–3108, 1996.
- 34
35 OOI, L., WOOD, I.C. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST.
36 **Nature Rev. Genet.**, 8, 544–554, 2007.
- 37
38 PASCHOAL, D. M., SUDANO, M. J., GUASTALI, M. D., MAZIERO, R. R. D.,
39 CROCOMO, L. F., MAGALHÃES, L. C. O., RASCADO, T. S., MARTINS JR, A.,
40 LANDIM-ALVARENGA, F. C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced
41 bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, 22, 146–157, 2012.
- 42
43 PASCHOAL, D.M., SUDANO, M.J., SCHWARZ, K.R.L., MAZIERO, R.R.D., GUASTALI,
44 M.D.G., CROCOMO, L.F., MAGALHÃES, L.C.O., MARTINS, A., LEAL, C.L.V.,
45 LANDIM-ALVARENGA, F.C. Cell apoptosis and lipid content of in-vitro produced, vitrified
46 bovine embryos treated with forskolin, **Theriogenology**, 87, 108–114, 2017.
- 47
48 PEIPPO, J., VARTIA, K., KANANE-ANTTILA, K., RÄTY, M., KORHONEN, K.,
49 HURME, T., MYLLYMÄKI, H., SAIRANEN, A., MÄKI-TANILA, A. Embryo production
50 from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-

- 1 thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Anim. Reprod. Scienc.**, 111, 80-92,
2 2009.
- 3
- 4 PEIPPO, J., RÄTY, M., KORHONEN, K., ERONEN, M., KANANEN, K., HURME, T.,
5 HALMEKYTÖ, M., MÄKI-TANILA, A. Impact of in vitro fertilization of bovine oocytes
6 with sex-sorted frozen-thawed spermatozoa on developmental kinetics, quality and sex ratio
7 of developing embryos. **Zygote**, 18, 185-194, 2010.
- 8
- 9 PFEIFER, L.F.M., CASTRO, N.A., NEVES, P.M.A., CESTARO J.P., SIQUEIRA, L.G.B.
10 Development and validation of an objective method for the assessment of body condition
11 scores and selection of beef cows for timed artificial insemination. **Livest. Sci.**, 197, 82-87,
12 2017.
- 13
- 14 PEREIRA, R.M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J., BAPTISTA, M.C., VASQUES, M.I.,
15 HORTA, A.E.M., et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by
16 trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Anim.**
17 **Reprod. Sci.**, 106:322–32, 2008.
- 18
- 19 PERRY, G. Statistics of embryo collection and transfer in domestic animals. **Embryo**
20 **Technol. Newslett.**, 35:8-23, 2017.
- 21
- 22 POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**,
23 41, 101-106, 1994.
- 24
- 25 PONTES, J. H. F., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B.V., ERENO-JUNIOR, J.C., UVO,
26 S., BARREIROS, T.R.R., OLIVEIRA, J.A., HASLER, J.F., SENEDA, M.M. Comparison of
27 embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore
28 (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, 71, 690-697, 2009.
- 29
- 30 PONTES, J. H.F., SILVA, K. C. F., BASSO, A.C., RIGO, A. G., FERREIRA, C.R.,
31 SANTOS, G. M. G., SANCHES, B.V., PORCIONATO, J.P.F., VIEIRA, P. H. S., FAIFER,
32 F. S., STERZA, F. A. M., SCHENK, J. L., SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo
33 production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows
34 using sexed sperm. **Theriogenology**, 74, 1349-1355, 2010.
- 35
- 36 PONTES, J.H.F., MELO-STERZA, F.A., BASSO, A.C., FERREIRA, C.R., SANCHES,
37 B.V., RUBIN, K.C.P., SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and
38 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
39 donors. **Theriogenology**, 75, 1640-1646, 2011.
- 40
- 41 POTTER, L. R., YODER, A. R., FLORA, D. R., ANTOS, L. K., DICKEY, D. M. Natri-uretic
42 peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications.
43 **Handbk. Exp. Pharmacol**, 191, 341–366, 2009.
- 44
- 45 RIZOS, D., FAIR, T., PAPADOPOULOS, S., BOLAND, M. P., LONERGAN, P.
46 Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos
47 produced in vivo or in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, 62, 320-327, 2002.
- 48

- 1 RODINA, T.M., COOKE, F.N., HANSEN, P.J.; EALY, A.D. Oxygen tension and medium
2 type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, 111, 173-188. 2009.
- 3
4
- 5 ROSA, C. O., MARINHO, L. S. R., DA ROSA, P. R. A., DE CESARO, M. P.,
6 LUNARDELLI, P. A., SILVA-SANTOS, K. C., BASSO, A. C., BORDIGNON, V.,
7 SENEDA, M. M. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte
8 competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. **Reprod Dom Anim**, 53, 921–929, 2018.
- 9
10
- 11 SARAGUSTY, J., ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by
12 slow freezing and vitrification. **Reproduction**, 141, 1-19, 2011.
- 13
- 14 SANCHES, B.V., MARINHO, L. S. R., FILHO, B. D. O., PONTES, J. H. F., BASSO, A. C.,
15 MEIRINHOS, M. L. G., SILVA-SANTOS, K. C., FERREIRA, C.R., SENEDA, M. M.
16 Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to
17 forskolin before vitrification. **Theriogenology**, 80, 372–377, 2013.
- 18
- 19 SÁNCHEZ, F., SMITZ, J.; Molecular control of oogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, 1896-
20 1912, 2012.
- 21
- 22 SÁ FILHO, O.G., MENEGHETTI, M., PERES, R.F., LAMB, G.C., VASCONCELOS, J.L.
23 Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II:
24 strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, 72, 210-218, 2009.
- 25
- 26 SÁ FILHO, M.F., AYRES, H., FERREIRA, R.M., MARQUES, M.O., REIS, E.L., SILVA,
27 R.C., RODRIGUES, C.A., MADUREIRA, E.H., BÓ, G.A., BARUSELLI, P.S. Equine
28 chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a
29 norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*)
30 cows. **Theriogenology**, 73:651–658, 2010.
- 31
- 32 SÁ FILHO, M.F., PENTEADO, L., REIS, E.L., REIS, T.A.N.P.S., GALVÃO, K.N.,
33 BARUSELLI, P.S. Timed artificial insemination early in the breeding season improves the
34 reproductive performance of suckled beef cows. **Theriogenology**, 79:625-632, 2013.
- 35
- 36 SALES, J.N.S., CARVALHO, J.B.P., CREPALDI, G.A., CIPRIANO, R.S., JACOMINI,
37 J.O., MAIO, J.R.G., SOUZA, J.C., NOGUEIRA, G.P., BARUSELLI, P.S. Effects of two
38 estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos*
39 *indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, 78, 510-
40 516, 2012.
- 41
- 42 SCHIFFMACHER, A.T., KEEFER, C.L. CDX2 Regulates Multiple Trophoblast Genes in
43 Bovine Trophectoderm CT-1 Cells, **Mol. Reprod. Develop.**, 80, 826 – 839. 2013.
- 44
- 45 SCHWARZ, K.R.L.K., BOTIGELLI, R.R.C., DEL COLLADO, M., CAVALLARI DE
46 CASTRO, F., FERNANDES, H., PASCHOAL, D.M.D., et al. Effects of fetal calf serum on
47 cGMP pathway and oocyte lipid metabolism in vitro. **Reprod. Fertil. Dev.**, 29. 2017.
- 48
- 49 SCHWARZ, K. R. L., DE CASTRO, F. C., SCHEFER, L., BOTIGELLI, R. C., PASCHOAL,
50 D. M., FERNANDES, H., LEAL, C. L. V. The role of cGMP as a mediator of lipolysis in

- 1 bovine oocytes and its effects on embryo development and cryopreservation. **Plos One**, 13(4),
2 2018.
- 3
- 4 SEIDEL, G.E.JR., SCHENK, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm:
5 effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Anim. Reprod. Sci.**,
6 105:129-138. 2008.
- 7
- 8 SEKI, M., MASAKI, H., ARAUCHI, T., NAKAUCHI, H., SUGANO, S., & SUZUKI, Y. A
9 Comparison of the Rest Complex Binding Patterns in Embryonic Stem Cells and Epiblast
10 Stem Cells. **Plos One**, 9(4), e95374, 2014.
- 11
- 12 SHEN, X.H., HAN, Y.J., ZHANG, D.X., CUI, X.S., KIM, N.H. A link between the
13 interleukin-6/Stat3 anti-apoptotic pathway and microRNA-21 in preimplantation mouse
14 embryos. **Mol. Reprod. Develop.**, 76 854–862. 2009.
- 15
- 16 SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G. M. G., KOETZ JUNIOR, C., MOROTTI, F., SILOTO,
17 L. S., MARCANTONIO, T. N., URBANO, M. R., OLIVEIRA, R. L., LIMA, D. C. M.,
18 SENEDA, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In Vivo
19 – of *Bos indicus*–*taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reprod. Domest. Anim.**,
20 49, 228–232, 2014a.
- 21
- 22 SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G., SILOTO, L.S., SANTOS, J.T., OLIVEIRA,
23 E.R., MACHADO, F.Z., ROSA, C.O, SENEDA, M.M. The correlation between the number
24 of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos*
25 *taurus* cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.151, p.119–125. 2014b.
- 26
- 27 SILVA-SANTOS K.C., SILOTO, L. S., SANTOS, G. M. G., MOROTTI, F.,
28 MARCANTONIO T. N., SENEDA, M.M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian
29 Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus*-*taurus* Cows with High or Low
30 Antral Follicles Counts. **Reprod. Domest. Anim.**, 49, 48–51, 2014c.
- 31
- 32 SILVA-SANTOS, K.C., FERREIRA, C.R., SANTOS, G.M.G, EBERLIN, M.N, SILOTO,
33 L.S., ROSA, C.O., MARCANTONIO, T.N., SENEDA, M.M. MALDI-MS Lipid Profiles of
34 Oocytes Recovered by Ovum Pickup from *Bos indicus* and 1/2 *indicus* x *taurus* with High vs
35 Low Oocyte Yields. **Reprod. Domest. Anim.**, 49, 711–718, 2014d.
- 36
- 37 SILVA, N.C., COSTA, C.B., LUNARDELLI, P. A., FONTES, P. K., ROSA, C. O., BASSO,
38 A. C., SUDANO, M.J., NOGUEIRA, M. F. G., SENEDA, M. M. Comparison of in vitro
39 production, lipid content and gene expression of embryos from *Bos indicus* cows cultivated
40 with or without forskolin supplementation. **Anim. Reprod.**, 14, 3, 742, 2017. (Abstract).
- 41
- 42 SILVEIRA, E.C., BORTOLLOTTI, L.A., MOROTTI, F., SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS,
43 G.M.G., ANDRADE, E.R., SENEDA, M.M. Insemination of four cows per dose of frozen
44 semen with a fixed-time artificial insemination protocol. **Anim. Reprod.**, 10, 2, 124-126,
45 2013.
- 46
- 47 SIQUEIRA, L. G. B., HANSEN, P. J. Sex differences in response of the bovine embryo to
48 colony-stimulating factor 2. **Reproduction**, 152, 645–654, 2016.
- 49

- 1 SOARES, A.C.S., LODDE, V., BARROS, R.G., PRICE, C.A., LUCIANO, A.M.,
2 BURATINI, J. Steroid hormones interact with natriuretic peptide C to delay nuclear
3 maturation, to maintain oocyte-cumulus communication and to improve the quality of in
4 vitro-produced embryos in cattle. **Reprod. Fertil. Dev.**, 29(11):2217-2224.2017.
5
- 6 SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., RASCADO, T. S., MAGALHÃES, L. C.,
7 CROCOMO, L. F., DE LIMA-NETO, J. F., LANDIM-ALVARENGA, F. C. Lipid content
8 and apoptosis of in vitroproduced bovine embryos as determinants of susceptibility to
9 vitrification. **Theriogenology**, 75, 1211-1220, 2011.
10
- 11 SUDANO, M.J., SANTOS, V.G., TATA, A., FERREIRA, C.R., PASCHOAL, D.M.,
12 MACHADO, R., BURATINI, J., EBERLIN, M.N., LANDIM-ALVARENGA, F.D.
13 Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in bos taurus indicus and bos taurus in
14 vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biol. Reprod.**, 87:130, 2012.
15
- 16 SUDANO, M. J., RASCADO, T. S., TATA, A, BELAZ, K. R. A. SANTOS, V. G.,
17 VALENTE, R. S., MESQUITA, F. S., FERREIRA, C. R. ARAÚJO, J. P., EBERLIN, M. N.,
18 LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Lipidome signatures in early bovine embryo
19 development. **Theriogenology**, 86, 472-484, 2016.
20
- 21 SUGA, S., ITOH, H., KOMATSU, Y., ISHIDA, H., IGAKI, T., YAMASHITA, J., DOI, K.,
22 CHUN, T. H., YOSHIMASA, T., TANAKA, I. Regulation of endothelial production of C-
23 type natriuretic peptide by interaction between endothelial cells and macrophages.
24 **Endocrinology**, 139, p. 1920–1926, 1998.
25
- 26 SUTTON-MCDOWALL, M.L., FEIL, D., ROBKER, R.L., THOMPSON, J.G., DUNNING,
27 K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine
28 preimplantation embryos. **Theriogenology**, 77, 1632-1641, 2012.
29
- 30 SUDIMAN, J., SUTTON-MCDOWALL, M.L., RITTER, L.J., WHITE, M.A.,
31 OTTERSHEAD, D.G., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B. Bone Morphogenetic Protein
32 15 in the Pro-Mature Complex Form Enhances Bovine Oocyte Developmental Competence.
33 Wrenzycki C, ed. **Plos One**, 9(7) 2014.
34
- 35 THAKORE-SHAH, K., KOLEILAT, T., JAN, M., JOHN, A., PYLE, A.D. REST/NRSF
36 Knockdown Alters Survival, Lineage Differentiation and Signaling in Human Embryonic
37 Stem Cells. Wary KK, ed. **Plos One**, 10(12), 2015.
38
- 39 THOMAS, J.M., LOCKE, J.W.C., VISHWANATH, R., HALL, J.B., ELLERSIECK, M.R.,
40 SMITH, M.F., PATTERSON, D.J. Effective use of SexedULTRA sex-sorted semen for timed
41 artificial insemination of beef heifers. **Theriogenology**, 98:88-93. 2017.
42
- 43 UYAR, A., TORREALDAY, S., SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and
44 embryo quality. **Fertil. Steril.**, 99:997–1003, 2013.
45
- 46 VIANA J.H.M., PALHAO M.P., SIQUEIRA, L.G.B., FONSECA J.F., CAMARGO L.S.A.
47 Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*)
48 cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, 73, 966–972, 2010.
49

- 1 VIANA, J.H.M., FIGUEIREDO, A.C.S., SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in
2 context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Anim. Reprod.**, 14:476- 481, 2017.
3
- 4 VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state.
5 **Anim. Reprod. Sci.**, 62, 23-53, 2000.
6
- 7 ZANGIROLAMO, A.F., COSTA, C.B., LUNARDELLI, P. A., PIOLTINE, E. M.,
8 CARDOSO, B. L., BASSO, A.C., NOGUEIRA, M. F. G., SENEDA, M.M. Evaluation of
9 lipid content and gene expression in bovine embryos produced in vitro treated with natriuretic
10 peptide C (NPPC). **Anim. Reprod.**, 14, 3, 737, 2017. (Abstract).
11
- 12 ZHANG, F., TANG, Z., HOU, X., LENNARTSSON, J., LI, Y., KOCH, A.W., SCOTNEY,
13 P., LEE, C., ARJUNAN, P., DONG, L., KUMAR, A., RISSANEN, T.T., WANG, B.,
14 NAGAI, N., FONS, P., FARISS, R., ZHANG, Y., WAWROUSEK, E., TANSEY, G.,
15 RABER, J., FONG, G.H., DING, H., GREENBERG, D.A., BECKER, K.G., HERBERT,
16 J.M., NASH, A., YLA-HERTTUALA, S., CAO, Y., WATTS, R.J., LI, X. VEGF-B is
17 dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting
18 inhibits pathological angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 2009.
19
- 20 ZHANG, M., SU, Y. Q., SUGIURA, K., XIA, G., EPPIG, J. J. Granulosa cell ligand NPPC
21 and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, 330, 366–369,
22 2010.
23
- 24 ZHANG, W., YANG, Y., LIU, W., CHEN, Q., WANG, H., WANG, X., ZHANG, Y.,
25 ZHANG, M., XIA, G. Brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide maintain
26 porcine oocyte meiotic arrest. **J. Cell. Phys.**, 230, 71–81, 2015.
27
- 28 ZHANG, Y., WANG, H., LIU, W., YANG, Y., WANG, X., ZHANG, Z., GUO, Q., WANG,
29 C., XIA, G. Natriuretic peptides improve the developmental competence of in vitro cultured
30 porcine oocytes. **Reprod. Biol. Endoc.**, 15:41, 2017.
31
- 32 WANG, Q.; HUANG, J.; ZHANG, H.; LEI, X.; DU, Z.; XIAO, C.; CHEN, S.; REN, F. 5
33 Selenium Deficiency-Induced Apoptosis of Chick Embryonic Vascular Smooth Muscle Cells
34 6 and Correlations with 25 Selenoproteins. **Biol. Trace Elem. Res.**, 176(2):407-415, 2017.
35
- 36 WEBB, A.E., BRUNET, A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality
37 control. **Trends Biochem Sci.**, 39:159–69, 2014.
38
- 39 WHITTIER, W.D., CURRIN, J.F., SCHRAMM, H., HOLLAND, S., KASIMANICKAM,
40 R.K. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch þ CIDR or 7-day CO-
41 Synch þ CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. **Theriogenology**, 80,
42 963-969, 2013.
43
- 44 WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., KESKINTEPE, L., MARTINS, A. JR.,
45 SIRISATHIEN, S., BRACKETT, B., NIEMANN, H. Effects of culture system and protein
46 supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum. Reprod.**,
47 16, 893–901, 2001.
48

- 1 WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., LEMME, E., KORSAWE, K., et
2 al. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived
3 preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? **Anim.**
4 **Reprod. Sci.**, 82–83: 593–603, 2004.
5
6 WU, L.L.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. The impact of obesity on oocytes: evidence for
7 lipotoxicity mechanisms. **Reprod Fertil Dev**, 24, 29-34, 2011.
8
9

1 **3. HIPÓTESES**

2

3 • A utilização de diluidor de sêmen pós-descongelamento na inseminação artificial em
4 tempo fixo e produção *in vitro* de embriões é mais vantajosa que o uso de doses não
5 diluídas; e

6 • A adição do Peptídeo Natriurético C melhora a taxa de blastocisto e influencia a
7 expressão de genes relacionados à pluripotência, apoptose, estresse oxidativo,
8 metabolismo, desenvolvimento e à qualidade embrionária em embriões *Bos taurus*
9 *indicus* produzidos *in vitro*; e

10 • A quantidade de folículos antrais influencia no perfil lipídicos de embriões *Bos taurus*
11 *indicus* produzidos *in vitro*;

12

13

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a eficiência do produto comercial Prosemen[®] na diluição da dose de sêmen pós-descongelamento à Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) e na produção *in vitro* de embriões (PIVE), bem como na cinética espermática;
- Avaliar o efeito da suplementação do Peptídeo Natriurético C (NPPC) em diferentes concentrações e momentos da produção *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus*;
- Verificar a influência da quantidade de folículos antrais no perfil lipídico de embriões *Bos taurus indicus* produzidos *in vitro*;

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a taxa de concepção na inseminação artificial em tempo fixo com uso do sêmen com ou sem diluidor (Prosemen[®]) pós-descongelamento.
- Comparar a quantidade de doses de sêmen utilizadas por concepção na inseminação artificial em tempo fixo com uso do sêmen com e sem diluidor (Prosemen[®]) pós-descongelamento.
- Verificar a atuação do diluidor na taxa de fertilização oocitária e produção *in vitro* de embriões em comparação ao uso de sêmen sem o diluidor (Prosemen[®]) pós-descongelamento.
- Avaliar os parâmetros de cinética espermática pela análise de sistema computadorizada (CASA) da dose de sêmen com ou sem diluidor (Prosemen[®]) pós-descongelamento em 6 tempos diferentes.
- Comparar as taxas de blastocisto de embriões *Bos taurus indicus* após a maturação *in vitro* de oócitos na presença ou ausência de três concentrações (50, 100 ou 150 nM) de Peptídeo Natriurético C;
- Comparar as taxas de blastocisto de embriões *Bos taurus indicus* após cultivo *in vitro* na presença ou ausência de três concentrações (50, 100 ou 150 nM) de Peptídeo Natriurético C;

- 1 • Avaliar a expressão de um painel de 96 genes relacionados à qualidade embrionária
- 2 em embriões *Bos taurus indicus* maturados ou cultivados *in vitro* na presença ou
- 3 ausência de Peptídeo Natriurético C;
- 4 • Avaliar o perfil lipídico de embriões produzidos *in vitro* com alta (>92 folículos
- 5 antrais) e com baixa quantidade de folículos antrais (<31 folículos antrais);
- 6 • Comparar os tipos de lipídios presentes nos embriões de vacas com alta (>92 folículos
- 7 antrais) e baixa quantidade de folículos antrais (<31 folículos antrais);
- 8
- 9

5. ARTIGO I

Artigo aceito no Journal Livestock Science 221 (2019) 77–81

DOI: 10.1016/j.livsci.2019.01.014

ISSN 1871-1413 – Fator de Impacto 1.377

Improvement on the efficiency of doses per conception by using a semen extender in timed artificial insemination

Camila Oliveira Rosa^{1*}, Denis Vinicius Bonato¹, Anne Kemmer Souza¹, Fábio Morotti¹, Renato Castanho Francisco², Andrea Cristina Basso³, Maria Isabel Mello Martins¹, Marcelo Marcondes Seneda¹.

¹Laboratory of Biotechnology the Animal Reproduction - ReproA, Department of Veterinary Clinics, State University of Londrina, Londrina, Parana, Brazil.

²Fazenda Santa Edwirges, Yby Yau, Concepción, Paraguay.

³In Vitro Brasil LTDA, Mogi Mirim, São Paulo, Brazil.

Abstract

This study evaluated the efficiency of a post-thaw diluent on the conception rate of timed artificial insemination (TAI), on the *in vitro* embryo production (IVEP), the fertilization rate and the computerized semen analysis. In the execution of all the techniques, semen straws of a single bull with previously known fertility were evaluated both as control and extender groups. The conception rate was similar ($P = 0.517$) between the extender (52.11%) and the control group (55.48%), but the extender group showed a reduction ($P < 0.001$) in the number of doses per conception (0.95 for the extender *vs.* 1.80 for the control). We evaluated the rates of cleavage (81.56 *vs.* 78.52%), blastocyst formation (36.10 *vs.* 39.48%) and hatching (47.28 *vs.* 41.97%) on the IVEP and assessed the fertilization rate by counting pronuclei (61.76 *vs.* 65.22%). Importantly, we found that these measures did not differ ($P > 0.05$) between the extender and control group, respectively. The total (58.1 *vs.* 58.3%) and progressive (42.4 *vs.* 40.0%) motility post-thawing did not differ ($P > 0.05$) between the extender *vs.* the control group, respectively. However, when comparing different moments post-thawing (0 h, 10 min, 3 h, 6 h, 8 h e 12 h), initially (3 h) the extender group had a higher ($P < 0.05$) percentage of

1 total motility (58.7 vs. 48.0%). Subsequently (8 h), the motility decreased ($P < 0.05$) in
2 comparison to the control group (7.3 vs. 22.6%). In conclusion, the use of extender post-
3 thawing was effective in TAI, reducing the number of doses per conception but not
4 influencing the IVEP. Therefore, this extender allowed for the more efficient use of semen of
5 high genetic value, reducing the cost per pregnancy.

6
7 **Keywords:** Conception rate, extender, fertilization capacity and frozen semen.

8 9 5.1 INTRODUCTION

10
11 Reproductive biotechniques such as timed artificial insemination (TAI) and
12 *in vitro* embryo production (IVEP) are important strategies for the genetic improvement of
13 cattle (Rodriguez-Martinez, 2012). The TAI has shown striking reproductive results for beef
14 cattle, reducing the period of the breeding season, producing uniformity in calves and
15 eliminating the labor required for the observation of estrus (Muth-Spurlock et al., 2016).

16 The genetic gain associated with the use of the TAI is closely linked to the
17 cryopreservation of semen, which in bovine species represents a biotechnology with proven
18 efficiency to enhance the reproductive performance of bulls with high genetic merit (Layek et
19 al., 2016). To increase the economic viability of livestock production systems, various
20 strategies have been employed to improve the reproductive efficiency and reduce conception
21 costs for the TAI programs (Whittier et al., 2013; Pfeifer et al., 2017). According to Edwards
22 et al. (2015), without regard for labor costs, the frozen semen dose value may comprise 70%
23 of the total cost of a TAI protocol.

24 To take full advantage of a bull's reproductive capacity, various extenders
25 have been researched and are used before the freezing; however, few studies aimed at
26 reducing the cost of semen doses in TAI programs with the use of diluents post-thawing to
27 fractionate the semen dose and reduce pregnancy costs have been conducted (Layek et al.,
28 2016). In this context, this study hypothesized that the dilution of semen doses post-thawing
29 can achieve a result with TAI, IVEP and sperm kinetics as efficient as the use of undiluted
30 doses. Therefore, the objective was to evaluate the efficiency of a post-thaw extender in the
31 conception rate in the TAI program, as well as to compare the performance of this diluent in
32 the IVEP, fertilization rate and through computer-assisted sperm analysis.

5.2 MATERIALS AND METHODS

This study was conducted according to the Ethics Committee on Animal Experimentation of the State University of Londrina based on Federal Law 11,794 of October 8, 2008.

5.2.1 Experimental Design

For all stages of the study, we compared two experimental groups: the control group and the extender group (Prosemen Industry and Commerce of Veterinary Products, Cornelio Procopio, Parana, Brazil), which consists of an extender used in the post-thawing of semen doses. In the extender group, the dilution of the semen doses was performed according to the manufacturer's recommendations. For each ampoule of 500 μ L of Prosemen two straws (250 μ L) of semen were diluted after thawing in a 37°C for 30 seconds and then packed in four straws (250 μ L) for use. The semen of the control group was thawed in the same manner, but without a diluent.

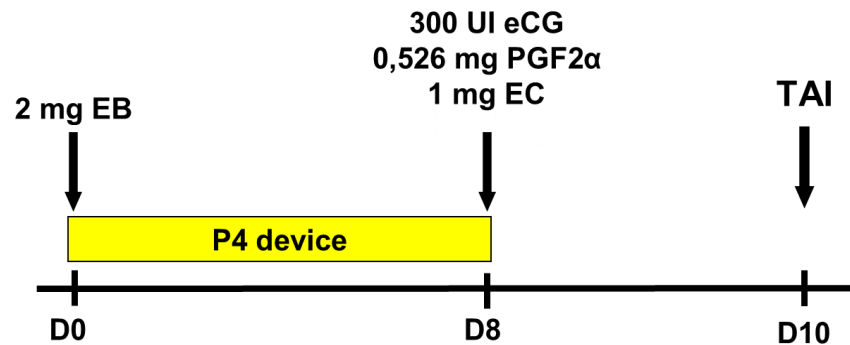
Frozen commercial doses from a single bull (Aberdeen Angus from Ciale Alta Genetics, Buenos Aires, Argentina) with previously known fertility and straws from the same collection were used in the two experimental groups during this study. The control and extender groups were tested for TAI, IVEP, oocyte fertilization rate and sperm evaluation using computerized semen analysis.

5.2.2 Timed Artificial Insemination

The TAI experiment was performed on a commercial beef farm located in South America (23° 22' 24" S; 50° 50' 35" W). In this study, 288 lactating Nelore females (*Bos taurus indicus*) with a body condition scoring (BCS) between 3 and 3.5 (scale from 1 to 5) were selected to receive a conventional protocol for ovulation synchronization. On a random day of the estrous cycle (day 0), an intravaginal progesterone device of the first-use impregnated with 1 g of progesterone (Sincrogest[®], Ourofino Saúde Animal Ltda, SP, Brazil) was inserted, after which 2 mg of estradiol benzoate (Sincrodiol[®], Ourofino Saúde Animal Ltda, SP, Brazil) was administered intramuscularly. Eight days later (day 8), the device was removed, and 0.526 mg of D-cloprostenol (PGF2 α , Sincrocio[®], Ourofino Saúde Animal Ltda, SP, Brazil), 300 IU of equine chorionic gonadotrophin (eCG, Novormon[®], Syntex Industria

Bioquímica & Farmacêutica S.A., Buenos Aires, Argentina) and 1 mg of estradiol cypionate (SincroCP[®], Ourofino Saúde Animal Ltda, SP, Brazil) were administered intramuscularly. On day 10 (after 48 h of device removal), artificial insemination was performed randomly in the control (N = 146) and extender groups (N = 142; Figure 1), with semen being deposited in the uterine body of the cows of both groups.

Figure 1 - The hormonal protocol used for ovulation synchronization in Nelore cows from both experimental groups. EB: estradiol benzoate, P4: progesterone, eCG: equine chorionic gonadotropin, PGF2 α : prostaglandin, EC: estradiol cypionate, TAI: timed artificial insemination.



Cows were maintained in the *Brizantha brachiaria* cultivar MG-5 and supplemented with a mineral source *ad libitum*. The pregnancy diagnosis was performed in all the females after 30 days of the TAI by transrectal ultrasonography. A single trained veterinarian who did not know which experimental group the animals belonged to performed the artificial insemination and confirmed the pregnancy diagnosis.

5.2.3 In Vitro Embryo Production

To obtain the Cumulus-oocyte complexes (COCs), we used the ovaries of cycling (having a corpus luteum) Nelore cows with age of 72-96 months and a body condition score between 3 and 3.5 (ranging from 1 to 5), collected at a local abattoir and transported to the laboratory in a 0.9% saline solution at 30-35°C.

A total of 1459 COCs was used in the five replicates recovered from follicles of 2 to 8 mm in diameter punctured with a disposable 21-gauge needle connected to a 10-mL syringe. COCs with at least 3 layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm (grades 1 and 2; Seneda et al, 2001) were selected for *in vitro* maturation (IVM). They were

1 then randomly divided into experimental groups. Groups of 15 oocytes were matured for 24 h
2 in 100 μ L drops of TCM-199 (Gibco BRL; Grand Island, NY, USA) supplemented with 10%
3 fetal bovine serum (FBS; Cripion Biotecnologia, Andradina, SP, Brazil), 1 μ g/mL FSH
4 (Pluset, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brazil), 50 μ g/mL LH (Vetecor, Hertape Calier), 1
5 μ g/mL estradiol, 0.2 mM sodium pyruvate, and 83.4 mg/mL amikacin 1 (Novafarma,
6 Anápolis, GO, Brazil) under mineral oil at 38.5°C and 5% atmospheric CO₂.

7 For the *in vitro* fertilization (IVF), the control group (N = 689 COCs)
8 included semen control (without the extender). The extender group (N = 770 COCs) included
9 semen diluted with Prosemen, with the dilution completed as previously described. Following
10 thawing and semen preparation for the control and experimental groups, all doses passed the
11 sperm selection method using the Percoll gradient of 45 and 90% (300 μ L of each). For sperm
12 selection, 100 μ L of each semen sample was carefully placed on top of the gradient and the
13 tubes were centrifuged at 13,400 rpm (12,100 x g) for 2 min. The supernatant was discarded,
14 and 300 μ L of fertilization medium was added to the pellet of approximately 40 μ L. Sperm
15 was centrifuged again at 9,000 rpm (8,127 x g) for 45 seconds. After a visual assessment of
16 motility, the sperm concentration was adjusted to 1.5×10^6 motile sperm/mL. The IVF
17 medium consisted of TALP-IVF medium supplemented with 10 μ g/mL heparin and 40
18 μ L/mL PHE solution (Penicillamine, Hypotaurine, and Epinephrine). Sperm (4 μ L per drop)
19 and oocytes (15 per drop) were co-incubated for 18-22 h in 100 μ L drops under the same
20 temperature and gaseous atmospheric conditions used for IVM. The day of fertilization was
21 considered to be day 0 (D0).

22 Presumptive zygotes (N = 1549) had their cumulus cells removed and were
23 transferred to 100 μ L drops of embryo culture medium (SOFaa BSA containing 0.5% BSA
24 and 2.5% FBS) under the same conditions used for IVM. After 3 days (D3) of culture, the
25 cleavage rates were evaluated, and 50% of the culture medium of each drop was replaced with
26 fresh medium (1st feeding). On the fifth day of culture (D5), 50% of the medium was
27 replaced (2nd feeding) with the same *in vitro* culture (IVC) medium supplemented with
28 glucose. The rate of the blastocyst formation was evaluated on day 7 (D7).

29

30 5.2.4 Fertilization Rate

31

32 To investigate the fertilization rate, probable zygotes (N = 80) were used
33 after IVM and IVF, as previously described. After 18 h of IVF, the probable zygotes were
34 denuded separately for each group (control = 46; extender = 34) by successive pipetting. They

1 were then washed in phosphate-buffered saline (PBS), immersed in 4% paraformaldehyde for
2 15 to 20 min, washed again in PBS and stored at 4°C in 0.5% Triton X-100 in PBS with 0.3%
3 BSA. Subsequently, probable zygotes were incubated at 37°C in permeabilization solution
4 and then washed twice (10 min each) in blocking solution (3% BSA and 0.2% Tween-20 in
5 PBS). Posterior samples were washed three times (20 min each) in 10 µg/mL DAPI (4',6-
6 diamidino-2-phenylindole) in PBS for DNA staining and probable zygotes were placed on
7 microscope slides with a drop of Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
8 and examined using an epifluorescence microscope (Axio Imager A1, Zeiss, Jena, TH,
9 Germany) at 100X magnification. Oocytes with two pronuclei were defined as representing
10 normal fertilization, while those with only one pronucleus were defined as unfertilized.

11

12 5.2.5 Sperm Evaluation

13

14 The sperm analysis was performed in three replicates with frozen semen
15 straws containing 15 million sperm/mL. Each semen straw after thawing was fractionated into
16 two fractions with an equal proportion for the control and extender groups. In each group, the
17 samples were aliquoted in 1.5 mL tubes and conditioned in a water bath, maintaining a
18 temperature of 37°C throughout the evaluation period. The analysis of the spermatic kinetics
19 was performed by the computerized system at six timepoints: 0 h, 10 min, 3 h, 6 h, 8 h and 12
20 h after thawing of the straws. All studies and sample manipulations were performed by the
21 same technician, who was previously trained.

22

23 The parameters of spermatic kinetics were analyzed by the CASA
24 system (HTR-IVOS, version 14.0) according to bovine setup (Table 1). On a heating plate at
25 37°C, 3 µL of the sample was placed on the CellVu® slide (DRM-610, Millennium Sciences,
26 New York, EUA) and inserted into the CASA system. Five fields were analyzed. The mobile
27 and immobile cells were counted, and the values of total motility (%-TM) and progressive
28 motility (%-PM) were obtained for each experimental group in three replicates.

1 **Table 1** – Setup used in HTR-IVOS 14.0 for the evaluation of bovine spermatozoa.

Parameters	Values
Type of Camera	Cell-Vu®
Temperature Analysis (°C)	37
Fields acquired	30
Frame (Hz)	60
Number of frames	5
Minimum static contrast	30
Minimum cell size (pixels)	5
Rectilinearity (STR), thresholds (%)	70
VAP cut-off (µm/s)	30
Minimum progressive VAP (µm/s)	50
VSL cut-off (µm/s)	15
Cell Intensity	70
Magnification	1.89

2

3 5.2.6 Statistical Analysis

4

5 In TAI, the comparison of the effect of the dilution of the semen dose
6 (control *vs.* extender) was measured by the conception rate, which was compared by the chi-
7 squared test. The BCS variable was evaluated in relation to the normal distribution of the data
8 through the Kolmogorov-Smirnov test. As the data did not present a normal distribution, the
9 BCS effect was analyzed by the Kruskal-Wallis test. The rates of cleavage, blastocyst, and
10 hatching for IVEP and the rate of oocyte fertilization were compared using the Chi-square
11 test. The total sperm motility and progressive motility of the control and extender groups were
12 compared through an analysis of variance and T-test. The analysis of variance with repeated
13 measures was used to compare the different moments of the seminal evaluation. Other
14 comparisons between the groups were performed using a paired T-test. All statistical analyses
15 were performed in the Minitab® 16.1.1 statistical software. The results were considered to be
16 significant when P was ≤ 0.05 .

17

18 5.3 RESULTS

19

Cows inseminated with semen doses diluted with Prosemen showed conception rate similar ($P > 0.05$) to females in the control group (Table 2). Furthermore, the extender group exhibited a lower ($P < 0.001$) number of doses of semen per group and a lower ($P < 0.001$) number of doses per conception in relation to the control group.

Table 2 – Body condition scoring (BCS), conception rate, total dose of semen per group and conception in Nelore cows submitted to timed artificial insemination using conventional undiluted doses (one dose per cow; the control group) or diluted doses (one diluted dose with Prosemen for two cows; the extender group).

Variables	Control (N = 146)	Extender (N = 142)	P-value
BCS (M ± SD)	3.3 ± 0.4	3.4 ± 0.4	0.210
Overall conception rate % (N)	55.48 (81)	52.11 (74)	0.567
Total dose/group	146	71	< 0.001
Total dose/conception	1.80 (146/81)	0.95 (71/74)	< 0.001

Considering the IVEP efficiency, the extender semen also exhibited a similar rate of cleavage, blastocyst, and hatching in relation to the control group (Table 3). No difference was found between the groups when the oocyte fertilization rate was compared by counting the pronucleus after 18 h of IVF (Table 4).

Table 3 - Rate of cleavage, blastocyst formation, and hatching of bovine embryos *in vitro* produced from oocytes fertilized with conventional undiluted doses (the control group) or diluted doses (the extender group).

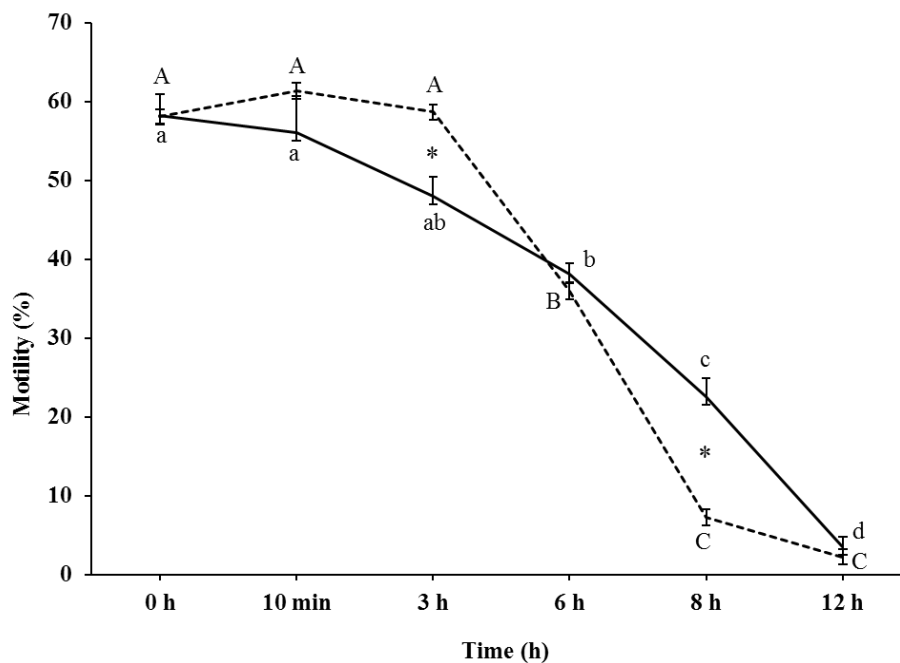
Groups	Total oocyte (N)	Cleavage % (n)	Blastocyst % (n)	Hatching % (n/N)
Control	689	78.52 (541)	39.48 (272)	41.97 (115/274)
Extender	770	81.56 (628)	36.10 (278)	47.28 (113/239)
P-value	-	0.147	0.185	0.228

Table 4 - Oocyte fertilization rate after 18 h of *in vitro* fertilization with or without semen dilution (control *vs.* extender), by comparing the number of pronuclei by the fluorescence staining technique with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Groups	N° oocytes (N)	Fertilized oocytes % (N)	P-value
Control	46	65.22 (30)	0.751
Extender	34	61.76 (21)	

The percentage of total and progressive motility results from the conventional dose undiluted (control) and diluted (extender semen) are presented in Figures 2 and 3. Both groups had similar results ($P > 0.05$), with a significant difference ($P < 0.05$) observed after 3 h of thawing, with superior results in the extender group. After 8 h of thawing, there was a decrease in the motility in comparison to the control group.

Figure 2 - Computed analysis (CASA) of total sperm motility, from conventional dose of bovine semen diluted with extender (-----) *versus* control (——).



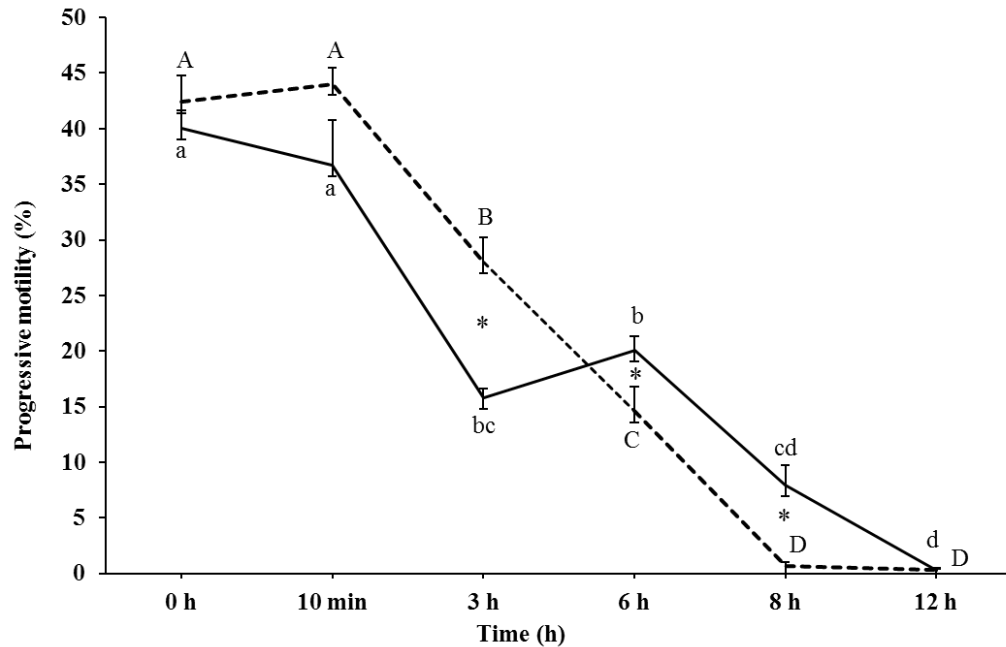
Lowercase letters (a-d) mean difference ($P \leq 0.05$) between the moments of evaluation in the control group.

Capital letters (A-C) refer to a difference ($P \leq 0.05$) between the evaluation moments in the extender group.

* Differences in total motility between the control and extender group.

1 **Figure 3** - Computed analysis (CASA) of total sperm progressive motility, from conventional
 2 dose of bovine semen diluted with extender (-----) *versus* control (———).

3



4

5 Lowercase letters (a-d) mean difference ($P \leq 0.05$) between the moments of evaluation in the control group.

6

6 Capital letters (A-C) means difference ($P \leq 0.05$) between the evaluation moments in the extender group.

7

7 * Differences in total motility between the control versus extender group.

8

9 5.4 DISCUSSION

10

11 This study presents a strategy for the rational use of commercial doses of
 12 semen that, after thawing, can be diluted with specific extender without reducing the
 13 conception rate of TAI while substantially decreasing the number of doses of semen per
 14 conception in relation to the control group. In addition, we found that the use of diluted doses
 15 results in an efficiency of IVEP, oocyte fertilization rate and sperm kinetics similar to those in
 16 the control group. Therefore, the present study represents a relevant alternative to
 17 reproduction applied by reducing the number of semen doses in the reproductive programs,
 18 reducing the costs of the programs without compromising its efficiency.

19

20 The use of an extender after thawing the semen did not produce any
 21 differences in the conception rate compared to the animals that were inseminated using a
 22 conventional semen at an undiluted dose (the control group). The results of both groups were
 23 similar to those found by Sales et al. (2012) with regards to the conception rate after TAI in
 lactating Nelore cows. The BCS during synchronization protocol is one of the variables that

1 can influence the conception rate (Meneghetti; Vasconcelos, 2008). However, the cows from
2 both experimental groups demonstrated a BCS between 3 and 3.5 (1 - 5 scale), values
3 considered within the ideals for Nelore cows submitted to TAI protocols (Sá Filho et al.,
4 2009; Pfeifer et al., 2017). Furthermore, the BSC was similar between groups of this
5 experiment.

6 In addition to the diluted semen having achieved conception levels similar
7 to the control group, the strategy of using diluted semen (the extender group) resulted in a
8 lower total number of doses of semen per conception relative to the control group (0.95 vs.
9 1.80). Therefore, these data demonstrate the possibility of a significant reduction in the cost if
10 reproductive programs use the post-thaw semen diluent, once the value of the commercial
11 semen dose may be one of the costs with the greatest impact on the TAI protocol (Florindo et
12 al., 2017). Thus, this average reduction of 50% of the costs is of great importance to
13 maximize the profitability of the livestock activity.

14 So far, only one study has evaluated the fractionation of the semen dose for
15 use in TAI (Silveira et al., 2013). The authors of this study demonstrated advantages when
16 performing the fractionation of diluted commercial doses to TAI in Nelore cows. Diluting
17 each commercial dose in 4 (1:4), the same authors obtained a 0.51 dose/conception, a relation
18 inferior to that found in the present study, in which each commercial dose was instead diluted
19 in two (1:2). However, at the time of insemination, Silveira et al. (2013) performed ultrasound
20 examination to identify the ovary with the dominant follicle and evaluate the follicular
21 diameter for semen deposition in the median region of the uterine horn ipsilateral to the ovary
22 with preovulatory follicle. It is likely that the site of semen deposition influenced the
23 conception rate.

24 In the present study, the semen was deposited into the uterus body in the
25 same manner as used in standard commercial farms during TAI programs (Sales et a., 2012;
26 Pfeifer et al., 2017). Therefore, it is important to emphasize that the present study was based
27 on a more practical strategy, with the deposition of the semen in the uterus body without the
28 use of ultrasonography to evaluate the dominant follicle side.

29 Moreover, for a better comparison of semen dilution performance after
30 thawing, we compared the IVEP efficiency, the capacity of oocyte fertilization by
31 epifluorescence and the computerized sperm analysis in the CASA system at different times
32 after thawing and dilution. All these techniques allow for a more precise analysis of the
33 performance of the diluent during fertilization and the overall spermatic kinetics.

1 In the IVEP, no differences in the rates of cleavage, embryo production, and
2 hatching were obtained when comparing the extender and the control groups. The rates
3 obtained in the present study are in agreement with the data present in the literature in terms
4 of the cleavage rate (78%; Pontes et al., 2010), blastocyst rate (37.3%; Pontes et al., 2011,
5 39.1%; Su et al., 2015) and embryonic hatching (44.5%; Tashima et al., 2017), demonstrating
6 that the dilution of the semen dose did not affect the efficiency rate of IVEP. Considering the
7 results obtained, it is suggested that direct contact of the diluent with the spermatozoid and the
8 oocyte that is provided by the technique of IVEP (Marinho et al., 2015) does not influence the
9 fertilization process and embryonic development, maintaining the function of increasing
10 semen volume without harming the IVEP efficiency.

11 To better quantify the fertilization potential of spermatozoa, the counts of
12 the pronucleus of the probable zygotes produced *in vitro* were compared in both groups. The
13 stage that occurs subsequent to fertilization follows the decondensation of the spermatozoa
14 head and the formation of the maternal and paternal pronucleus (Brackett et al., 1980). In the
15 present study, the rate of *in vitro* fertilization of oocytes did not observe a significant
16 difference between the groups (the control *vs.* the extender); however, our results are in
17 agreement with those found in cattle (Alomar et al., 2008; Nagai et al., 2015). These data
18 support the hypothesis that was proposed from the evaluation of the performance of the
19 diluent in the IVEP, suggesting that the extender (Prosemen) can be used efficiently as a
20 diluent post-thawing without negatively affecting fertilization.

21 In the computerized sperm analysis performed by the CASA system, the
22 extender group demonstrated a higher percentage of total and progressive motility in
23 comparison to the control group in the first 3 h after thawing. However, after 8 h, there was a
24 decrease in motility, probably due to excessive energy expenditure in the initial moments.
25 This process of sperm hyperactivation is undesirable in the first few hours after thawing due
26 to the loss of energy that is needed to travel through the female reproductive tract until the
27 oocyte is produced (Rodriguez-Martinez, 2007). This would explain the decrease in motility
28 after 8 h of thawing compared to the control group. However, we showed that the following
29 reduction in motility does not seem to have influenced the *in vivo* and *in vitro* fertilization,
30 since that conception rate of TAI and the IVEP efficiency were not affected.

31 In addition, although the preparation step for sperm fertilization can be
32 mimicked *in vitro*, there is evidence that *in vivo* sperm capacitation is coordinated by a
33 number of factors within the female genital tract (Visconti et al., 2002; Suarez et al., 2008).

1 Therefore, it is difficult to mimic the same *in vitro* environment and maintain sperm viability
2 over a long period of time (Rodriguez-Martinez, 2007; Gangwar; Atreja, 2015).

3 Individual variations in the fertility among bulls and different ejaculates of
4 the same bull were reported both *in vivo* and *in vitro* (Zhang et al., 1999; Palma; Sinowatz,
5 2004; Alomar et al., 2006). However, all the techniques used in the present study were
6 performed with semen from a single bull that had been previously tested. Furthermore, all the
7 straws were from the same collection, ensuring a reliable comparison of the performance of
8 the semen diluent.

9 We highlight that the present study represents an interesting strategy for the
10 rational use of commercial doses of semen. We demonstrated that the use of a specific
11 extender post-thawing results in acceptable conception rate for TAI. It markedly decreases the
12 number of doses of semen per conception and results in a high IVEP performance, oocyte
13 fertilization rate and sperm kinetics. Therefore, it is recommended that this practice allows for
14 the better use of semen with a high genetic value and reduction of cost per pregnancy.

15 In conclusion, the use of a semen extender (Prosemen) post-thawing
16 resulted in a conception rate of TAI as high as the control group; however, its use also
17 allowed a substantial reduction in the total number of doses per conception. Furthermore, the
18 use of a semen extender showed a high performance in terms of the *in vitro* embryo
19 production, fertilization rate of oocytes and spermatoc kinetics.

20

21

1 **REFERENCES**

2
3 ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE F.; PAUL D., DONNAY, I.
4 Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the
5 semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.48-61, 2008.

6
7 EDWARDS, S.A.A.; BO, G.A.; CHANDRA, K.A.; ATKINSON, P.C.; MCGOWAN, M.R.
8 Comparison of the pregnancy rates and costs per calf born after fixed-time artificial
9 insemination or artificial insemination after estrus detection in *Bos indicus* heifers
10 **Theriogenology**, v. 83, p. 114–120, 2015.

11
12 FLORINDO, T.J.; FLORINDO, G.I.B.M.; TALAMINI, E.; COSTA, J.S.; RUVIARO, C.F.
13 Carbon footprint and Life Cycle Costing of beef cattle in the Brazilian midwest. **Journal of**
14 **Cleaner Production**, v. 147, p. 119-129, 2017.

15
16 GANGWAR, D.K.; ATREJA, S.K. Signalling events and associated pathways related to the
17 mammalian sperm capacitation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 705-711,
18 2015.

19
20 LAYEK, S.S.; MOHANTY, T.K.; KUMARESAN A.; PARKS, J.E. Cryopreservation of bull
21 semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction**
22 **Science**, v. 172, p. 1-9, 2016.

23
24 MARINHO, L. S. R.; SANCHES, B. V.; ROSA, C. O.; TANNURA, J. H.; RIGO, A. G.;
25 BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; SENEDA, M. M. Pregnancy rates to fixed embryo transfer
26 of vitrified IVP *Bos indicus*, *Bos taurus* or *Bos indicus* X *Bos taurus* embryos. **Reproduction**
27 **in Domestic Animals**, v. 50, p. 807–811, 2015.

28
29 MENEGHETTI M, VASCONCELOS JLM. Calving date, body condition score, and response
30 to a timed artificial insemination protocol in first-calving beef cows. **Brazilian Journal of**
31 **Veterinary Research and Animal Science**, v. 60, p. 786-93, 2008.

32
33 MUTH-SPURLOCK, A.M.; POOLE, D.H.; WHISNANT, C.S. Comparison of pregnancy
34 rates in beef cattle after a fixed time AI with once- or twice-used controlled internal drug
35 release devices. **Theriogenology**, v. 85, p. 447–451, 2016.

36 NAGAI, K.; YANAGAWA, Y.; KATAGIRIA, S.; NAGANO, M. Fertilizability of oocytes
37 derived from Holstein cows having different antral follicle counts in ovaries. **Animal**
38 **Reproduction Science**, v. 163, p. 172-178, 2015.

39
40 PFEIFER, L.F.M.; CASTRO, N.A.; NEVES, P.M.A.; CESTARO J.P.; SIQUEIRA, L.G.B.
41 Development and validation of an objective method for the assessment of body condition
42 scores and selection of beef cows for timed artificial insemination. **Livestock Science**, v.197,
43 p.82-87, 2017.

44
45 PONTES, J. H.F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A.C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C.R.;
46 SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER,
47 F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo
48 production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows
49 using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349-1355, 2010.

50

1 PONTES, J.H.F.; MELO-STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES,
2 B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and
3 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
4 donors. **Theriogenology**, v.75, p.1640-1646, 2011.

5
6 RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**,
7 v. 68, p.138-146, 2007.

8
9 RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assisted reproductive techniques for cattle breeding in
10 developing countries: A critical appraisal of their value and limitations. **Reproduction in**
11 **Domestic Animals**, v. 47, p. 21-26, 2012.

12
13 SÁ FILHO, O.G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R.F.; LAMB, G.C.; VASCONCELOS, J.L.
14 Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II:
15 strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, p. 210-218, 2009.

16
17 SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A.; CIPRIANO, R.S.; JACOMINI,
18 J.O.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, J.C.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. Effects of two
19 estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos*
20 *indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, p.
21 510-516, 2012.

22
23 SILVEIRA, E.C.; BORTOLLOTTI, L.A.; MOROTTI, F.; SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS,
24 G.M.G.; ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M. Insemination of four cows per dose of frozen
25 semen with a fixed-time artificial insemination protocol. **Animal Reproduction**, v.10, n.2,
26 p.124-126, 2013.

27
28 SUAREZ, S.S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. **Int J**
29 **Dev Biol**. 2008;52(5-6):455-462.

30
31 SU, J.; WANG, Y.; XING, X.; ZHANG, L.; SUN, H.; ZHANG, Y. Melatonin significantly
32 improves the developmental competence of bovine somatic cell nuclear transfer embryos.
33 **Journal of Pineal Research**, v. 59, p. 455-468, 2015.

34
35 TACHIMA, K.; KUBO, Y.; HIRABAYASHI, M.; HOCHI, S. Downsizing cumulus cell
36 layers to improve cryotolerance of germinal vesicle-stage bovine oocytes. **Theriogenology**, v.
37 95, p. 1-7, 2017.

38
39 VISCONTI, P.E.; WESTBROOK, V.A.; CHERTIHIN, O.; DEMARCO, I.; SLEIGHT, S.;
40 DIEKMAN, A.B. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing
41 capacity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53(1-2), p. 133-50, 2002.

42
43 WHITTIER, W.D.; CURRIN, J.F.; SCHRAMM, H.; HOLLAND, S.; KASIMANICKAM,
44 R.K. Fertility in Angus cross beef cows following 5-day CO-Synch þ CIDR or 7-day CO-
45 Synch þ CIDR estrus synchronization and timed artificial insemination. **Theriogenology**, v.
46 80, p. 963-969, 2013.

47

48

6. ARTIGO II

Produção *in vitro* de embriões *Bos indicus* e características moleculares de embriões suplementados com diferentes concentrações de peptídeo natriurético C (NPPC) na maturação ou no cultivo *in vitro*.

In vitro production of *Bos indicus* embryos and molecular characteristics of embryos supplemented with different concentrations of natriuretic peptide type C (NPPC) at maturation or in vitro culture.

RESUMO

Em nosso estudo, adicionaram-se diferentes concentrações (50 nM, 100 nM ou 150 nM) do peptídeo natriurético tipo C (NPPC) durante a *maturação in vitro* (MIV) dos complexos cumulus-oócito (CCOs) ou no cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões. Foram avaliados os efeitos sobre a produção dos embriões e analisamos a expressão de um painel de 96 genes, dos quais foram selecionados 20 genes de maior interesse. As taxas de blastocisto foram analisadas por um modelo de regressão logística e considerou-se efeito significativo quando valor de p foi $\leq 0,09$. Para a expressão gênica os dados foram analisados pela ANOVA e comparados pelo teste de Tukey, o nível de significância adotado foi de $\leq 0,05$. As taxas de blastocistos foram de 31,05% (136/438) no grupo controle, 33,47% (162/484) para 50 nM na MIV; 35,24% (179/508) para 100 nM na MIV; 32,53% (162/498) para 150 nM na MIV; 28,49% (100/351) para 50 nM na CIV; 27,67% (119/430) para 100 nM na CIV e 26,92% (112/416) para 150 nM na CIV. Para os genes analisados houve diferença somente na expressão de REST, gene relacionado à pluripotência e ao desenvolvimento embrionário. Para os genes relacionados ao metabolismo (AKR1B1, SCD e SREBF1), maturação oocitária e desenvolvimento folicular (NPR2, BMP15 e GDF9), sinalização Celular, estresse oxidativo e térmico (FOXO3, HSF1 e HSPA1A), pluripotência (POU5F1 e NANOG), desenvolvimento embrionário (HAND1, GPX1, STAT3 e VEGFA), interação materno-fetal (IFNT2 e PTGS2/COX-2) e regulação epigenética (Dnmt3 α e Dnmt3 β) não houve diferença entre os grupos. Embora as taxas de blastocisto não tenham diferido entre os grupos, o gene REST teve maior expressão a partir da suplementação de 150 nM de NPPC na MIV e demonstramos pela primeira vez a expressão do receptor de NPPC (NPR2) em embriões, demonstrando a possibilidade de atuação do NPPC nesta fase do embrionária. Em conclusão, nossos dados fornecem referências para a

1 melhoria dos resultados de MIV na produção *in vitro* de embriões bovinos com a
2 suplementação de 150 nM de NPPC, bem como é o primeiro trabalho a demonstrar a
3 expressão de receptor de NPPC (NPR2) em embriões bovinos.

4
5 **Palavras-chaves:** desenvolvimento embrionário, embrião, peptídeo natriurético tipo C,
6 retomada da meiose e suplementação.

8 ABSTRACT

9
10 In our study, different concentrations (50 nM, 100 nM or 150 nM) of the natriuretic peptide
11 type C (NPPC) were added during *in vitro* maturation (IVM) of cumulus-oocyte complexes
12 (COCs) or *in vitro* culture (IVC) of the embryos. We evaluated the effects on the production
13 of the embryos and analyzed the expression of a panel of 96 genes, from which 20 genes of
14 greater interest were selected. The blastocyst rates were analyzed by a logistic regression and
15 considered a significant effect when p value was ≤ 0.09 . For the gene expression, the data
16 were analyzed by ANOVA and compared by the Tukey test, the level of significance was \leq
17 0.05. Blastocyst rates were 31.05% (136/438) in the control group; 33.47% (162/484) to 50
18 nM in IVM; 35.24% (179/508) to 100 nM in IVM; 32.53% (162/498) to 150 nM in IVM;
19 28.49% (100/351) to 50 nM in the IVC; 27.67% (119/430) for 100 nM in the IVC and 26.92%
20 (112/416) for 150 nM in the IVC. For the analyzed genes there was difference only in the
21 expression of REST, gene related to pluripotency and to embryonic development. For the
22 genes related to metabolism (AKR1B1, SCD and SREBF1), oocyte maturation and follicular
23 development (NPR2, BMP15 and GDF9), cell signaling, oxidative and thermal stress
24 (FOXO3, HSF1 and HSPA1A), pluripotency (POU5F1 and NANOG) embryonic
25 development (HAND1, GPX1, STAT3 and VEGFA), maternal-fetal interaction (IFNT2 and
26 PTGS2 / COX-2) and epigenetic regulation (Dnmt3 α and Dnmt3 β) did not differ between
27 groups. Although blastocyst rates did not differ between groups, the REST gene had greater
28 expression from the 150 nM NPPC supplementation in IVM and demonstrated for the first
29 time the expression of the NPPC receptor (NPR2) in embryos, demonstrating the possibility
30 of action of NPPC this stage of the embryo. In conclusion, our data provide references for the
31 improvement of IVM results in the *in vitro* production of bovine embryos with the
32 supplementation of 150 nM of NPPC, as well as the first work to demonstrate the expression
33 of NPPC receptor (NPR2) in bovine embryos.

1 **Key words:** embryo, embryonic development, meiotic resumption, natriuretic peptide type C
2 and supplementation.

3 4 6.1 INTRODUÇÃO

5
6 A maturação de oócitos é um passo crítico para a produção *in vitro* de
7 embriões (PIVE) bovinos e sua eficiência é comprometida pela cultura de sistemas que não
8 substituem adequadamente as condições fisiológicas (FARIN et al., 2007). *In vivo*, fatores
9 intrafoliculares mantêm a parada meiótica e o oócito permanece no estágio de vesícula
10 germinativa até o pico pré-ovulatório de LH que desencadeia a secreção do fator de
11 crescimento epidérmico (EGF), peptídeos anfiregulina (AREG), epiregulina (EREG) e
12 betacelulina (BTC) das células da granulosa, que induzem a retomada da meiose e expansão
13 do cumulus (GILCHRIST, 2011). Juntamente com os fatores secretados, a elevação dos
14 níveis de adenosina monofosfato cíclica (AMPC) auxilia o bloqueio da meiose. Com os níveis
15 elevados de AMPC, ocorre a ativação da proteína quinase A (PKA), resultando na fosforilação
16 e ativação de uma outra quinase nuclear, a Weel / MytI, bloqueando a retomada da meiose
17 (PAN e LI, 2019).

18 No entanto, quando os complexos cumulus-oócito (CCOs) são aspirados e
19 removidos do folículo antes do aumento do LH, a retomada espontânea da meiose ocorre
20 antes da conclusão da maturação citoplasmática, e isso compromete a competência do
21 desenvolvimento embrionário *in vitro* (SANCHEZ & SMITZ; 2012).

22 A utilização de peptídeo natriurético C (NPPC) foi descrito por aumentar os
23 níveis de AMPC (SOARES et al., 2017) e influenciar a retomada da meiose em camundongos
24 (ZHANG et al., 2010), suínos (SANTIQUET et al., 2014), bovinos (DE CESARO et al.,
25 2015) e caprinos (ZHANG et al., 2015). O NPPC é sintetizado pelas células da granulosa e se
26 liga ao receptor do peptídeo natriurético tipo 2 (NPR2), presente principalmente nas células
27 do cumulus. A ativação de NPR2 induz a síntese de monofosfato de guanosina cíclico
28 (GMPc), que é transferido via junções comunicantes para o oócito. Desta forma o GMPc tem
29 ação inibitória sobre a fosfodiesterase3A (PDE3A), mantendo altas concentrações de AMPC
30 no oócito e sustentando a parada da meiose (ZHANG et al., 2010).

31 O AMPC também está envolvido em inúmeras atividades celulares e sua
32 modulação nas células embrionárias já foi associada com a redução do depósito lipídico
33 (PASCHOAL et al., 2017), através da inibição da fosfodiesterase 5A (PDE5A; SCHWARZ et
34 al., 2018). Os lipídios são de extrema importância para o metabolismo inicial dos embriões,

1 fornecendo energia para seu desenvolvimento (SUDANO et al., 2016). Porém seu excesso,
2 característico dos embriões produzidos *in vitro* (PIV), pode afetar negativamente seu
3 metabolismo e produção (WU et al., 2011). Desta forma, inúmeras substâncias já foram
4 adicionadas no meio de cultivo com o objetivo de diminuir a concentração lipídica (SUDANO
5 et al., 2011; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012; PASCHOAL et al., 2012; 2017).

6 Recentemente, Botigelli et al. (2018) utilizou a suplementação de 100 nM
7 de NPPC durante 24 horas na maturação *in vitro* (MIV), mas não obteve diferença na taxa de
8 blastocistos. Entretanto houve uma diminuição do acúmulo lipídico citoplasmático e maior
9 expressão de Pentacrina 3 (PTX3) nos CCOs. Gene este relacionado a formação da matriz
10 extracelular e expansão das células do cumulus, também utilizado como um marcador não
11 invasivo da qualidade dos CCOs e competência de desenvolvimento embrionário (ASSIDI et
12 al., 2008; UYAR et al., 2013; HAMMOND et al., 2015). Apesar da diminuição do acúmulo
13 lipídico citoplasmático nos CCOs na MIV, esse perfil não se manteve durante o cultivo *in*
14 *vitro* (CIV), uma vez que não foi encontrada diferença no conteúdo lipídico dos embriões
15 (BOTIGELLI et al., 2018). Considerando um possível mecanismo compensatório responsável
16 pela recuperação do conteúdo lipídico destes blastocistos (SCHWARZ et al., 2017).

17 A suplementação de 100 nM de NPPC no CIV de embriões *Bos taurus*
18 *indicus*, com intuito de modular os níveis AMPc, evidenciou diferenças em genes
19 relacionados ao metabolismo inicial e lipídico (Interferon tau - IFNT2; Fator de transcrição de
20 ligação ao elemento regulador do estero1 - SREBF1; e Stearoyl-CoA Desaturase - SCD),
21 mostrando um efeito benéfico para o CIV (ZANGIROLAMO et al., 2017). Neste mesmo
22 estudo, as taxas de blastocistos mantiveram-se constantes, porém as taxas de eclosão no dia
23 10 de cultivo obtiveram resultados superiores nos embriões tratados com NPPC. Sugerindo
24 uma melhora na multiplicação celular inicial dos embriões com a suplementação do CIV.

25 Apesar dos trabalhos publicados sobre a suplementação de NPPC ainda
26 restam lacunas sobre a sua atuação na MIV e principalmente no CIV, além disso, os
27 resultados demonstrados evidenciam o potencial que a suplementação de NPPC no aumento
28 da eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos. Desta forma, o presente trabalho teve
29 como objetivo comparar o efeito da suplementação de 0 nM, 50 nM, 100 nM ou 150 nM de
30 NPPC no meio de MIV ou no CIV sobre o desenvolvimento embrionário. Além disso
31 objetivou-se avaliar a influência da suplementação na expressão de genes relacionados com a
32 pluripotência, resistência a apoptose e estresse oxidativo, metabolismo inicial e lipídico,
33 desenvolvimento e qualidade nos embriões *Bos taurus indicus* PIV.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Companhia Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil), a não ser quando especificado. Foram produzidos embriões *in vitro* no decorrer de 9 réplicas a partir de oócitos provenientes de folículos de ovários de abatedouro.

Este estudo foi conduzido de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, com base na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008.

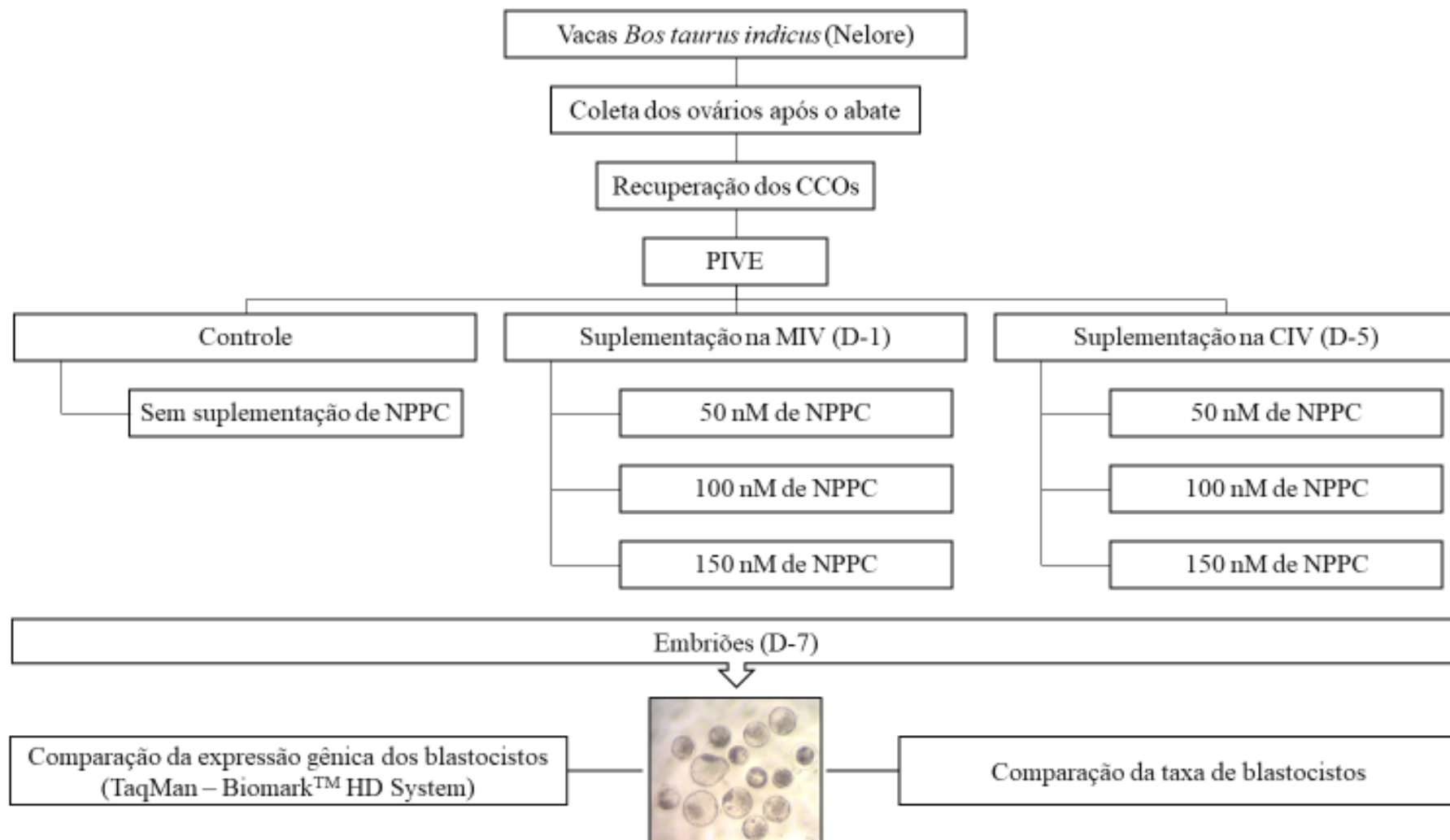
6.2.1 Delineamento Experimental

Foram utilizados sete grupos experimentais para comparação de diferentes concentrações de suplementação de NPPC e em dois momentos distintos da produção *in vitro* de embriões, ou seja, na maturação ou cultivo *in vitro*. As concentrações utilizadas foram de 50, 100 ou 150 nM de NPPC no meio para MIV ou para CIV e o grupo controle sem suplementação.

A suplementação na MIV foi realizada no início do protocolo de PIVE no meio de maturação contendo os CCOs, ficando os mesmos expostos ao tratamento durante 24 horas até o momento da troca para o meio de fertilização. Para os grupos de suplementação durante o cultivo, foi realizada no dia 5 (D5), considerando o dia da fertilização como dia 0 (D0), no meio de cultivo contendo os prováveis zigotos e o tratamento permaneceu até o dia 7 (D7), dia em que foi avaliada a taxa de produção de embriões.

Considerando estes tratamentos os CCOs foram divididos aleatoriamente em um dos 7 grupos experimentais desde o início do protocolo de produção de embriões. Sendo estes: a) Controle (sem suplementação de NPPC); b) 50 MIV (suplementação de 50 nM na MIV); c) 100 MIV (suplementação de 100 nM na MIV); d) 150 MIV (suplementação com 150 nM na MIV); e) 50 CIV (suplementação de 50 nM no CIV); f) 100 CIV (suplementação de 100 nM no CIV); f) 150 CIV (suplementação de 150 nM no CIV), conforme Figura 1.

- 1 **Figura 1** – Delineamento utilizado para a divisão dos grupos experimentais para a produção *in vitro* dos embriões bovinos *Bos indicus* (Nelore)
2 de acordo com a suplementação de peptídeo natriurético C (NPPC) na maturação *in vitro* (MIV) ou cultivo *in vitro* (CIV), bem como das técnicas
3 utilizadas para avaliação do efeito da suplementação.



1 6.2.2 Animais

2

3 Ovários de vacas Nelores (*Bos indicus*; 72-96 meses) cíclicas (com a
4 presença de corpo lúteo), com escore de condição corporal $\geq 3,5$ (escala de 1 a 5) foram
5 coletados de um abatedouro local e transportado em solução salina 0,9% a 30-35°C até o
6 laboratório.

7

8 6.2.3 Produção in vitro de embriões

9

10 Cada folículo visível nos ovários foi aspirado com agulhas hipodérmicas
11 30x8 acopladas a seringas de 10 mL (BD Medical, Becton Dickinson & Company, Franklin
12 Lakes, NJ; Rizos et al., 2002) para recuperação dos CCOs.

13 Os CCOs circundados por um mínimo de 3 camadas de células do cumulus
14 e com citoplasma homogêneo (graus I e II; Seneda et al., 2001; n=3.125) foram selecionados
15 para a MIV e divididos aleatoriamente nos 7 grupos experimentais de acordo com a
16 suplementação de NPPC. Antes da MIV, os oócitos foram lavados três vezes em TCM-
17 HEPES 199 (Gibco Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB;
18 Gibco Life Technologies), 0,20 nM de piruvato de sódio, e 83,4 mg/mL de gentamicina
19 (Instituto Bioquímico, Rio de Janeiro, Brasil). Para os grupos de tratamento 50MIV, 100MIV
20 e 150MIV foi realizado a suplementação de NPPC no meio de maturação.

21 Cada grupo foi cultivado separadamente em meio de maturação em gotas de
22 100 mL sob óleo mineral, em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar, e umidade saturada a
23 38,5°C, por 24 horas. O número de CCOs foi padronizado em 15 por gota de 100 mL de
24 meio, e em cada réplica (n=7 réplicas) foram cultivados em média o mesmo número de
25 oócitos por grupo experimental, possibilitando uma melhor comparação entre os grupos.

26 Após a maturação, os CCOs foram lavados em meio TCM-199 pré-
27 fertilização (suplementado com HEPES 25 mM e 0,3% de BSA), e uma vez em meio FERT-
28 TALP suplementado com 10 mg/mL de heparina e 160 mL de solução de penicilina,
29 epinefrina e hipotaurina (PHE). Os oócitos foram transferidos para as gotas com sêmen e
30 meio de fecundação FERT-TALP suplementado com heparina e PHE.

31 Para inseminação das gotas de 100 mL de meio durante todo o experimento
32 foi utilizado sêmen de um único touro Nelore, previamente testado. O sêmen armazenado em
33 nitrogênio líquido foi descongelado a 36°C por 30 segundos. A seleção dos espermatozoides
34 foi realizada pelo gradiente de Percoll (Percoll 45% na parte superior e 90% na parte inferior)

1 por centrifugação (12.100 g, por 2 minutos), o sobrenadante (600 µL) foi descartado e o pellet
2 espermático foi ressuspenso em 300 µL de meio de fecundação e homogeneizado. O sêmen
3 foi novamente centrifugado (8.127 g, por 45 segundos) e, após o descarte do sobrenadante, a
4 concentração espermática foi ajustada para a obtenção de uma concentração final de 1×10^6
5 espermatozoides vivos/gota de 15 oócitos, co-incubados por 20 horas na incubadora. O dia da
6 fertilização foi considerado o dia zero (D0).

7 Após a fecundação, os prováveis zigotos foram lavados e as células do
8 cumulus foram removidas. Os prováveis zigotos foram transferidos para o meio de cultivo *in*
9 *vitro* (D1) constituído por fluido de oviduto sintético modificado (SOFaa BSA contendo 8
10 mg/mL de BSA livre de ácido graxo e glutamina 1 mM), sob a mesma temperatura e
11 condições atmosféricas gasosas utilizadas nas etapas anteriores.

12 No terceiro dia de cultivo (D3) foi realizada a substituição (1° *feeding*) de
13 50% do meio de cultivo com o mesmo meio utilizado inicialmente. No quinto dia de cultivo
14 (D5), a substituição de 50% do meio (2° *feeding*) foi realizada da mesma maneira, mas com o
15 mesmo meio de CIV acrescido de glicose. Para os grupos de tratamento 50 CIV, 100 CIV e
16 150 CIV foi realizado a suplementação de NPPC no meio de CIV. Os grupos controle,
17 50MIV, 100MIV e 150MIV não receberam suplementação com NPPC no meio padrão. No
18 D7 foi avaliada a taxa de blastocistos para comparação da produção de embriões entre os
19 grupos e os embriões foram coletados para análise de expressão gênica. Para cada amostra
20 foram coletados 5 blastocistos expandidos, lavados em três gotas de solução Salina
21 Tamponada de Fosfato sem cálcio e magnésio (PBS; Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA,
22 USA), em seguida em três gotas de inibidor de ribonuclease recombinante utilizando
23 RNaseOUT (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), acondicionados em eppendorfs e congelados
24 em -80°C para posterior extração do RNA.

25 26 6.2.4 Extração de RNA e transcrição reversa

27
28 O RNA total de cada amostra foi extraído de um *pool* de 5 blastocistos
29 expandidos da mesma rotina de produção de embriões. Para cada tratamento foram utilizadas
30 5 repetições, sendo cada repetição proveniente de réplicas diferentes de PIVE. A extração de
31 RNA foi realizada utilizando o kit Picopure RNA Isolation (Thermo Fisher Scientific, São
32 Paulo, SP, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A contaminação do DNA
33 genômico foi removida pela realização de digestão DNA utilizando o kit RNase-Free DNase
34 (Qiagen, São Paulo, SP, Brasil). O RNA dos embriões foi eluído em 13 µL, de tampão de

1 eluição e a concentração e qualidade do RNA extraído foram determinados usando um
2 espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e 2100
3 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). O RNA (100 ng) foi reverso
4 transcrito em cDNA usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied
5 Biosystems, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e
6 armazenados a -20 ° C até o uso.

7

8 6.2.5 PCR em tempo-real (qPCR) no Fluidigm Biomark™ HD system

9

10 A análise da expressão gênica dos embriões bovinos foi realizada utilizando
11 o ensaio com a sonda TaqMan® (Applied Biosystems™). Foi analisado a abundância de
12 RNAm de um painel de 96 genes, no entanto foram selecionados 20 genes de maior interesse
13 conforme indicado na Tabela 1 de acordo com as suas categorias funcionais. Antes do ciclo
14 térmico de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real time quantitative*
15 *Polymerase Chain Reaction* – qRT-PCR), cada amostra foi submetida a um processo de pré-
16 amplificação específico da sequência, como segue: mistura de ensaio de 1,25 µL (o ensaio
17 TaqMan foi reunido até uma concentração final de 0,2X para cada um dos 96 ensaios), 2,5 µL
18 de TaqMan PreAmp Master Mix Applied Biosystems) e 1,25 µL de cDNA (5ng/µL). As
19 reações foram ativadas a 95°C, durante 10 minutos, seguido de desnaturação a 95°C, durante
20 15 segundos, e reaquecimento e amplificação a 60°C, durante 4 minutos, durante 14 ciclos.
21 Estes produtos pré-amplificados foram diluídos 6 vezes antes da análise RT-qPCR.

22 Para a análise da expressão gênica, a solução de amostra preparada consistiu
23 em 2,25 µL de cDNA (produtos pré-amplificados), 2,5 µL de TaqMan Universal PCR Master
24 Mix (2X, *Applied Biosystems*) e 0,25 µL de Reagente de carregamento de amostra 20X
25 (*Fluidigm*); e a solução de ensaio: 2,5 µL de 20X TaqMan Gene Expression Assay (*Applied*
26 *Biosystems*) e 2,5 µL de Reagente de carregamento de ensaio 2X (*Fluidigm*). O chip 96.96
27 *Dynamic Array*™ *Integrated Fluidic Circuits* (*Fluidigm*) foi usado para a coleta de dados.
28 Após a impregnação, o chip foi carregado com 5 µL de cada solução de ensaio e 5 µL de cada
29 solução de amostra. O ciclo térmico de qPCR foi realizado no sistema *Biomark HD*
30 (*Fluidigm*, São Francisco Sul, CA, EUA), utilizando o protocolo TaqMan GE 96x96
31 Standard, que consistia em um estágio de Thermal Mix (50°C por 2 min, 70°C por 20 min e
32 25°C por 10 min) seguido de um estágio Hot Start (50°C por 2 min e 95°C por 10 min),
33 seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 s), anelamento e extensão do primer (60°C
34 por 60 s).

1 Todas as análises foram realizadas em 5 repetições e os valores de Ct foram
2 calculados a partir da plataforma do sistema (*Biomark Real-time PCR Analysis, Fluidigm*). A
3 beta actina (ACTB) e o Peptidil Prolil Isomerase A (PPIA) foram selecionadas como os genes
4 de manutenção mais estáveis (gene ‘*housekeeping*’). Os valores de expressão relativos para
5 cada gene foram calculados com o método de $\Delta\Delta$ Ct utilizando uma amostra de controle como
6 calibrador (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

7

8

1 **Tabela 1** – Genes de maior interesse selecionados para análise detalhada da comparação da
 2 produção *in vitro* de embriões bovinos *Bos indicus* (Nelore) de acordo com a suplementação
 3 de peptídeo natriurético C (NPPC) na maturação *in vitro* (MIV) ou cultivo *in vitro* (CIV) e
 4 nas concentrações de 50 nM, 100 nM ou 150 nM.

GENE	NOME	FUNÇÃO
AKR1B1	Aldo-Ceto redutase	Metabolismo
BMP15	Proteína Morfogenética Óssea 15	Maturação oocitária e desenvolvimento folicular
FOXO3	<i>Forkhead box O3</i>	Sinalização Celular / Estresse Oxidativo
HAND1	Derivado do miocárdio e da crista neural expresso-1	Diferenciação e implantação
GDF9	Fator de crescimento e diferenciação 9	Maturação oocitária e desenvolvimento folicular
POU5F1/OCT4	POU classe 5 <i>homeobox</i> 1/ Fator de transcrição de ligação ao octâmero 4	Pluripotência
SCD	Stearoyl-Coa Desaturase	Metabolismo
GPX1	Glutathione Peroxidase 1	Desenvolvimento
IFNT2/IFNT3/IFNT	Interferon tau	Interação materno-fetal
NANOG	Nanog <i>homeobox</i>	Pluripotência
NPR2	Receptor peptídeo natriurético - 2	Receptor do NPPC
SREBF1	Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador do estero1	Metabolismo
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3	Desenvolvimento embrionário inicial
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular tipo A	Desenvolvimento embrionário
HSF1	Fator de transcrição de choque térmico tipo 1	Resposta a choque térmico
HSPA1A	Choque térmico 70kDa proteína 1A	Resposta a choque térmico
REST	Fator de transcrição silenciador	Pluripotência
PTGS2/COX-2	Prostaglandina-endoperóxido sintase 2/ Ciclo-oxigenase-2	Via COX-2/mPGES-1 para biossíntese de PGE2
Dnmt3A	DNA-metiltransferase 3 alpha	Regulação epigenética
Dnmt3B	DNA-metiltransferase 3 beta	Regulação epigenética

5

6 6.2.6 Análise Estatística

7

8

9

10

O efeito das diferentes concentrações de NPPC na maturação ou no cultivo *in vitro* de embriões bovinos foi analisado por um modelo de regressão logística, incluindo o tratamento como efeito principal fixo e demais fonte de variação como covariáveis do

1 modelo. Na presença de um efeito significativo, as taxas de blastocisto foram comparadas duas a
 2 duas pelo teste de proporção para o ranking dos tratamentos. Para análise descritiva, os dados
 3 estão apresentados como porcentagem (%). Todas as análises estatísticas foram realizadas no
 4 programa estatístico Minitab®, versão 18.1. Considerou-se efeito significativo quando valor
 5 de p foi $\leq 0,09$.

6 Para expressão gênica os dados foram previamente analisados quanto à
 7 normalidade de distribuição pelo teste de Anderson-Darling e quanto à homogeneidade de
 8 variâncias pelo teste de *Levene*. O efeito do tratamento com diferentes concentrações de
 9 NPPC sobre o padrão de expressão dos genes alvo foi analisado pela ANOVA. Na presença
 10 de um efeito significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Para análise
 11 descritiva, os dados estão apresentados como média (M) \pm erro padrão (EP). Todas as análises
 12 estatísticas foram realizadas no programa estatístico Minitab®, versão 18.1. O nível de
 13 significância de $\leq 0,05$ foi considerado para indicar um efeito das variáveis categóricas.

14 6.3 RESULTADOS

15 6.3.1 Produção *in vitro* de embriões

16
 17 Foram cultivados um total de 3.125 CCOs considerando os sete grupos
 18 experimentais, porém não foi encontrado diferença ($P > 0,09$) comparando a taxa de
 19 blastocistos (D7) do grupo controle e tratamentos (Tabela 2).

20
 21 **Tabela 2** – Comparação da produção *in vitro* de embriões bovinos *Bos indicus* (Nelore) de
 22 acordo com a suplementação de peptídeo natriurético C (NPPC) na maturação *in vitro* (MIV)
 23 ou cultivo *in vitro* (CIV) e nas concentrações de 50 nM, 100 nM ou 150 nM.

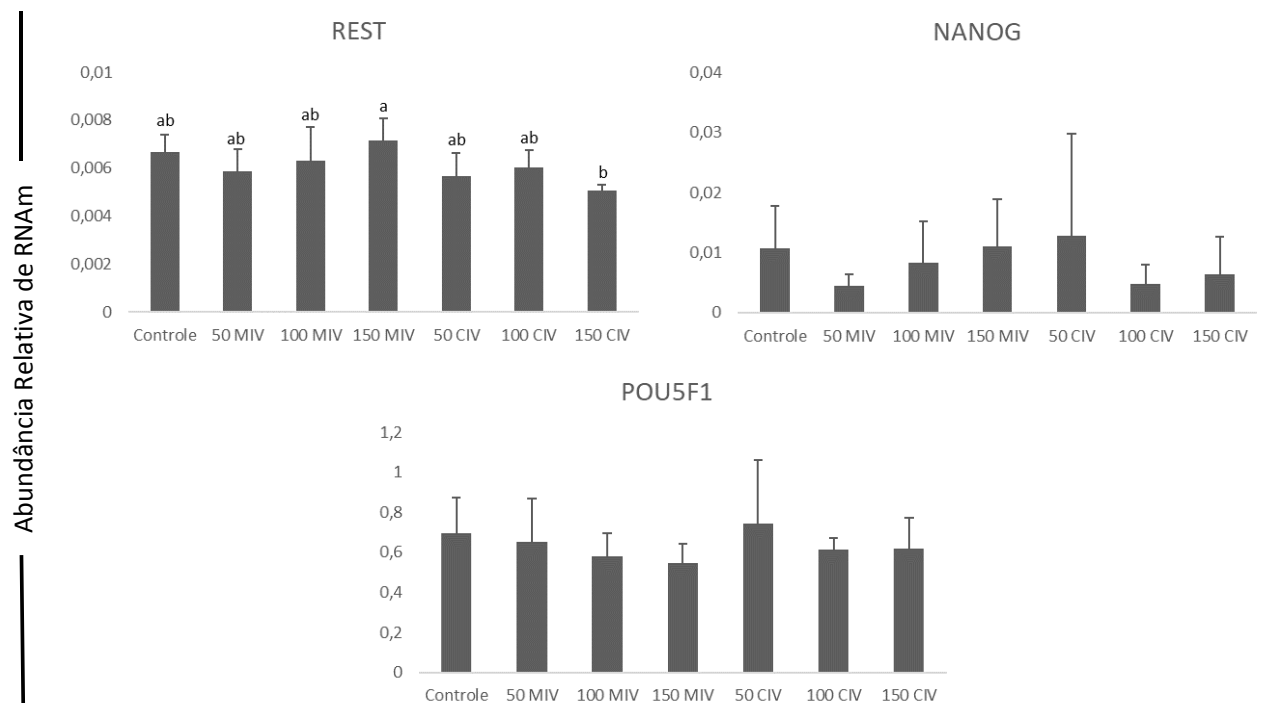
Tratamentos		Oócitos	Blastocistos	
		N	n	%
MIV	Controle	438	136	31,05 _{abc}
	50 nM	484	162	33,47 _{ab}
	100 nM	508	179	35,24 _a
	150 nM	498	162	32,53 _{abc}
CIV	50 nM	351	100	28,49 _{bc}
	100 nM	430	119	27,67 _c
	150 nM	416	112	26,92 _c
Total		3125	970	-

24 ^{abc}Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P \leq 0,09$).

6.3.2 Análise de transcritos de RNAm

O gene REST (Figura 2) relacionado a pluripotência demonstrou maior expressão no grupo suplementado com 150 nM de NPPC na MIV. Para os genes relacionados ao metabolismo (AKR1B1, SCD e SREBF1; Figura 3), maturação oocitária e desenvolvimento folicular (NPR2, BMP15 e GDF9; Figura 4), sinalização celular, estresse oxidativo e térmico (FOXO3, HSF1 e HSPA1A; Figura 5), pluripotência (POU5F1 e NANOG; Figura 2), desenvolvimento embrionário (HAND1, GPX1, STAT3 e VEGFA; Figura 6), interação materno-fetal (IFNT2 e PTGS2/COX-2; Figura 7) e regulação epigenética (Dnmt3 α e Dnmt3 β ; Figura 8) não demonstraram diferença na expressão entre os grupos.

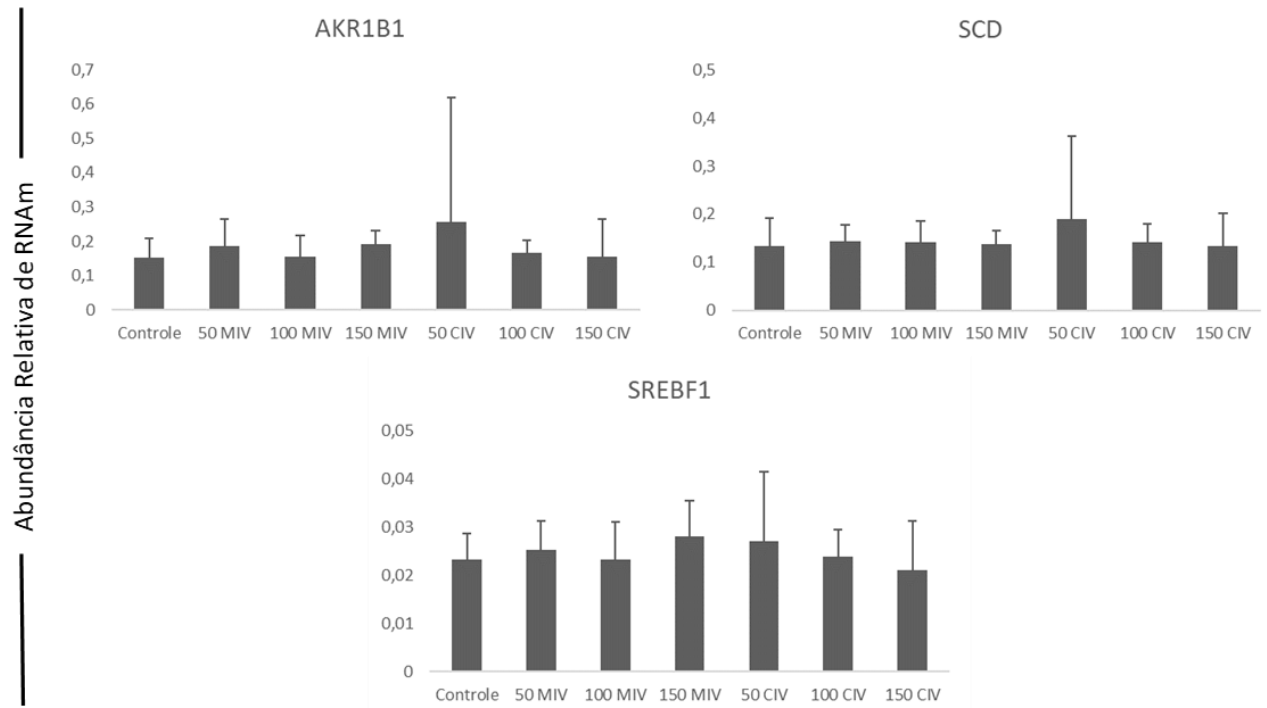
Figura 2 – Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a pluripotência em embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação *in vitro* dos CCOs ou no cultivo *in vitro* dos embriões ($P \leq 0,05$).



18

19

1 **Figura 3** – Abundância relativa de RNAm de genes relacionados ao metabolismo inicial e
2 metabolismo lipídico em embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem
3 suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a
4 maturação *in vitro* dos CCOs ou no cultivo *in vitro* dos embriões ($P \leq 0,05$).
5

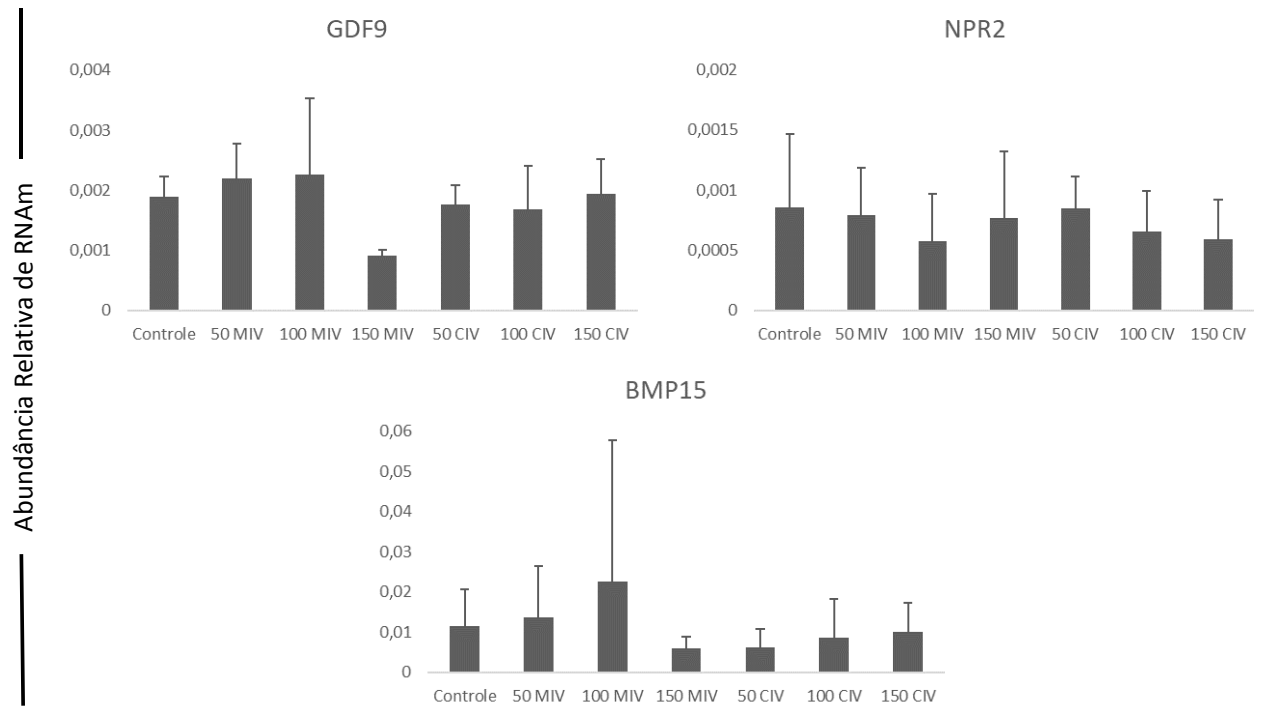


6

7

1 **Figura 4** – Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a maturação oocitária e
2 desenvolvimento em embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem
3 suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a
4 maturação *in vitro* dos CCOs ou no cultivo *in vitro* dos embriões ($P \leq 0,05$).

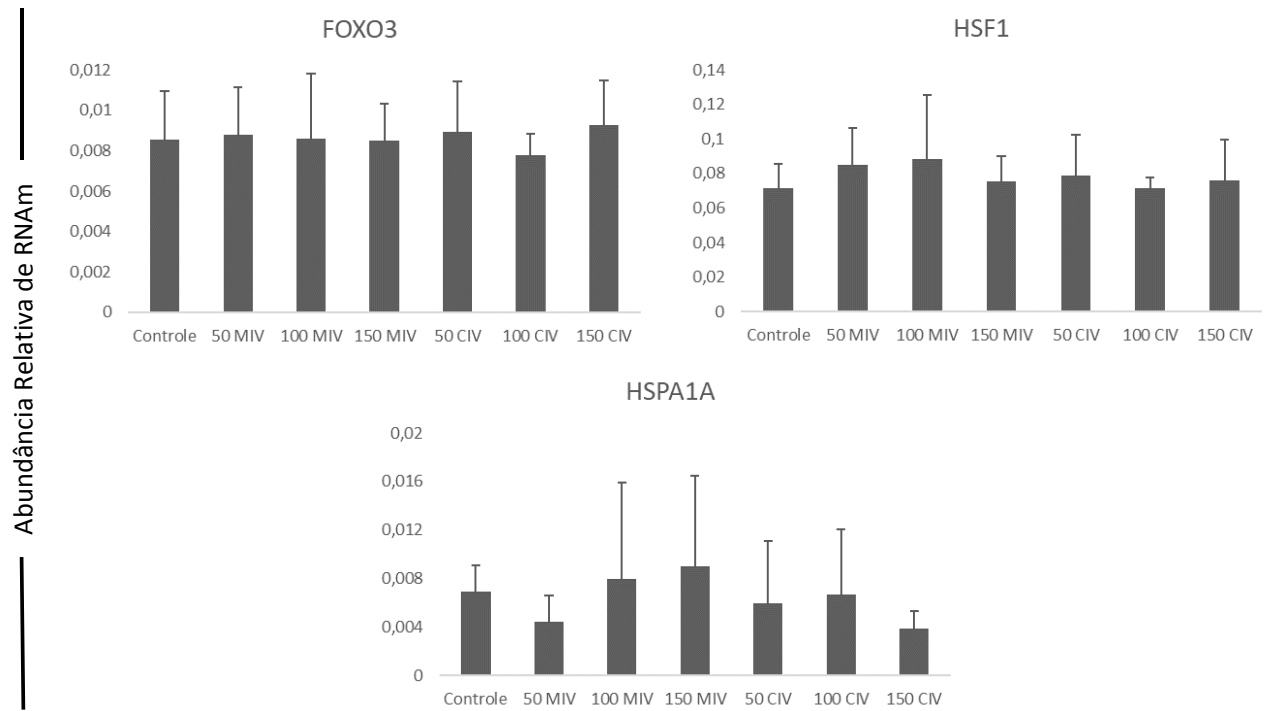
5
6



7
8
9

1 **Figura 5** – Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a sinalização celular,
2 estresse oxidativo e térmico em embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro*
3 sem suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a
4 maturação *in vitro* dos CCOs ou no cultivo *in vitro* dos embriões ($P \leq 0,05$).

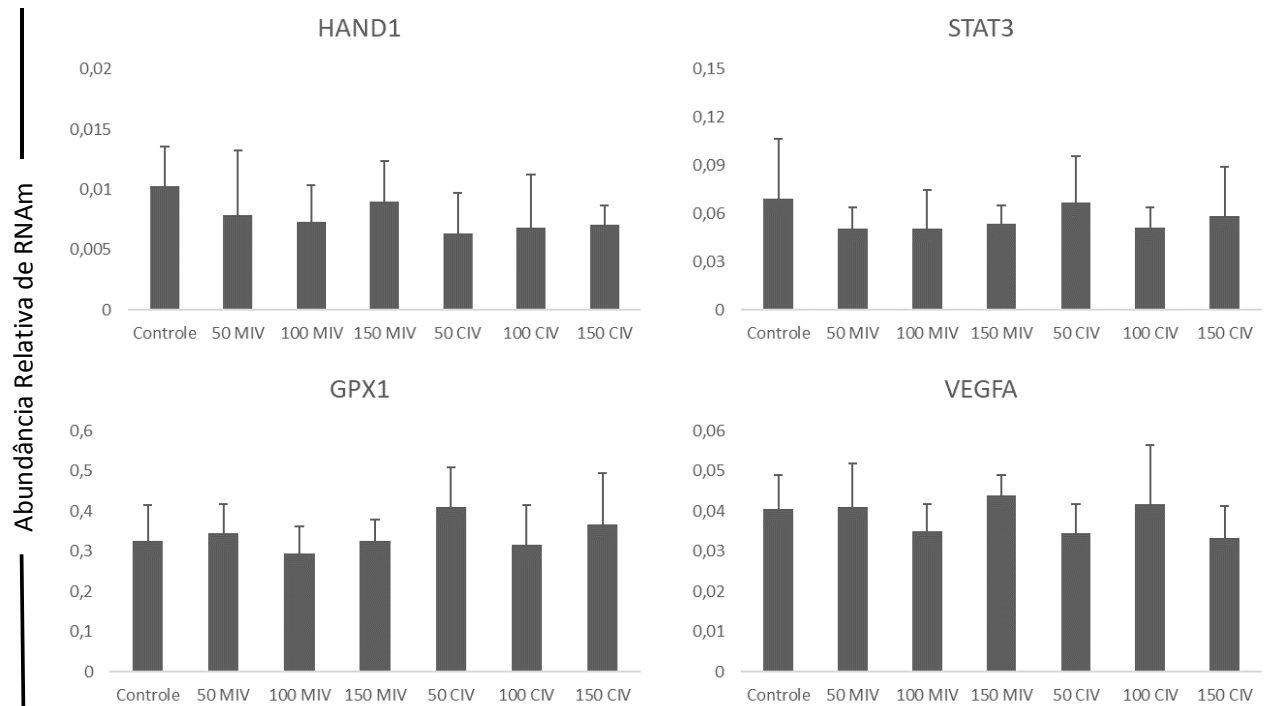
5
6



7
8
9

1 **Figura 6** – Abundância relativa de RNAm de genes relacionados ao desenvolvimento
2 embrionário nos embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem
3 suplementação do meio, com suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a
4 maturação *in vitro* dos CCOs ou no cultivo *in vitro* dos embriões ($P \leq 0,05$).

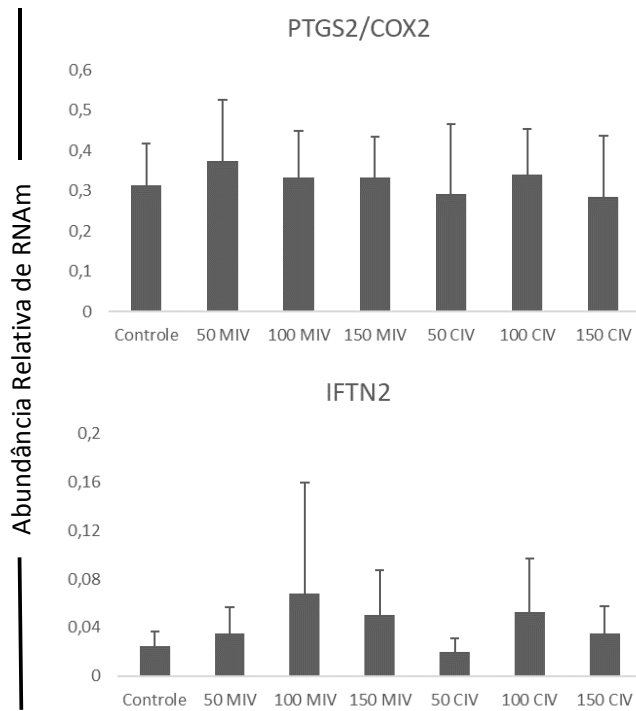
5
6



7
8
9

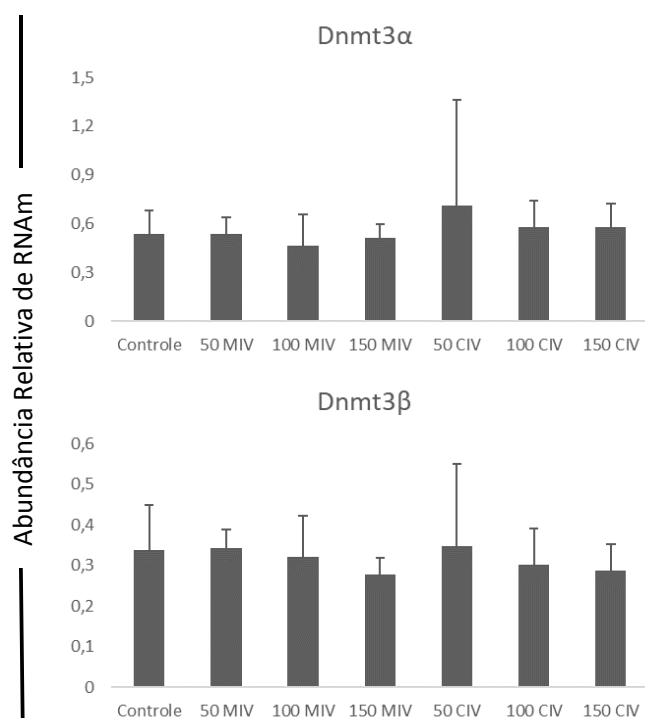
1 **Figura 7** – Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a interação materno-fetal em
2 embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem suplementação do meio, com
3 suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação *in vitro* dos CCOs ou no
4 cultivo *in vitro* dos embriões ($P \leq 0,05$).

5
6



7
8
9

1 **Figura 8** – Abundância relativa de RNAm de genes relacionados a regulação epigenética em
 2 embriões de vaca Nelore (*Bos indicus*) produzidos *in vitro* sem suplementação do meio, com
 3 suplementação de 50, 100 ou 150 nM de NPPC durante a maturação *in vitro* dos CCOs ou no
 4 cultivo *in vitro* dos embriões ($P \leq 0,05$).
 5



6

7

8 6.4 DISCUSSÃO

9

10 Os peptídeos natriuréticos (NPs) e seus três receptores são expressos em
 11 CCOs de bovinos e aumentam os níveis de GMPc em células do cumulus (MISONO et al.,
 12 2011; DE CESARO et al., 2015) consequentemente mantendo altas concentrações de AMPc
 13 no oócito e sustentando a parada da meiose (ZHANG et al., 2010). A presença da expressão
 14 dos receptores dos NPs já foi relatada nas células do cumulus e da granulosa de oócitos
 15 bovinos (DE CESARO et al., 2015; 2018; ROSA et al., 2018), entretanto não existem dados
 16 na literatura sobre a expressão destes receptores em embriões bovinos ou embriões de outras
 17 espécies. O presente estudo é o primeiro a relatar a expressão do gene NPR-2 em embriões,
 18 situação esta que evidencia a atuação do NPPC também durante o estágio embrionário.

19 No presente estudo foi comparada a suplementação do meio de maturação *in*
 20 *vitro* ou cultivo *in vitro* com NPPC nas concentrações de 50, 100 ou 150 nM, pela
 21 comparação das taxas de blastocistos na produção *in vitro* de embriões, entretanto nenhum

1 tratamento foi superior ao grupo controle (sem suplementação de NPPC). Botigelli et al.
2 (2018) com a suplementação de 100 nM NPPC na MIV e Zangirolamo et al. (2017) com 100
3 nM da CIV, também não obtiveram diferença na taxa de produção de embriões tratados com
4 NPPC em comparação ao grupo sem suplementação, observaram apenas um efeito nas taxas
5 de blastocistos eclodidos. Porém em nosso experimento não foi avaliada a taxa de eclosão,
6 situação essa que possivelmente poderia ter nos mostrado diferenças entre os grupos.

7 Entretanto nestes estudos (ZANGIROLAMO et al., 2017; BOTIGELLI et
8 al., 2018) foram encontradas diferenças na expressão de genes relacionados ao metabolismo
9 lipídico, qualidade oocitária e embrionária. É sabido que avaliação morfológica ou de taxas de
10 produção isoladamente não são suficientes em proporcionar uma precisa e eficiente avaliação
11 da qualidade do embrião e do seu potencial de desenvolvimento (WRENZYCKI et al., 2004).
12 A avaliação da expressão de genes relacionados a fisiologia embrionária é fundamental para
13 esclarecer acontecimentos vinculados a seu desenvolvimento (CASTILLO-MARTÍN et al.,
14 2014; CÁNEPA et al., 2014).

15 No presente estudo foi analisado nos embriões dos diferentes tratamentos
16 um painel de 96 genes (Tabela S1M) pelo *Fluidigm Biomark™ HD system*. No entanto foram
17 selecionados 20 genes de maior interesse com a finalidade de buscar um melhor
18 esclarecimento sobre a atuação do NPPC e a concentração ideal para suplementação. Os
19 genes selecionados estão relacionados à pluripotência, resistência a apoptose e estresse
20 oxidativo, metabolismo inicial, metabolismo lipídico, desenvolvimento e à qualidade
21 embrionária.

22 O gene REST obteve maior expressão gênica nos embriões que foram
23 suplementados com 150 nM na MIV em comparação ao tratamento 150 nM de NPPC no CIV.
24 Este gene desempenha um papel central na regulação da expressão gênica através da
25 transcrição de diversos mecanismos e alterações ocasionais nas modificações da cromatina,
26 particularmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento (SEKI et al., 2014).

27 Em células-tronco embrionárias humanas o REST demonstrou ter papel na
28 regulação do crescimento e nas primeiras decisões de diferenciação (THAKORE-SHAH et
29 al., 2015), e é diretamente regulado pelos fatores centrais de transcrição de pluripotência
30 como os genes POU5F1 e NANOG (BOYER et al., 2005; LOH et al., 2006), fatores estes
31 que são citados como marcadores de qualidade embrionária (MORI et al., 2015; ALLOUBA
32 et al., 2015). Segundo Lonergan et al. (2003) e Cánepa et al., (2014) as diferenças cruciais na
33 abundância relativa RNAm em genes envolvidos no desenvolvimento embrionário podem
34 explicar parte das diferenças na qualidade dos embriões, desta forma podemos sugerir que a

1 suplementação de 150 nM na MIV pode ter efeito potencialmente benéfico para a produção
2 de embriões bovinos.

3 Os genes SREBF1 e SCD se encontram elevados na diferenciação celular
4 inicial de embriões (HUTCHINSON et al., 2012). SREBF1 também está envolvido no
5 metabolismo lipídico por modulação da expressão de genes relacionados com a lipogênese,
6 sendo de elevada importância na maturação *in vitro* (LEE et al., 2016). O gene 1AKR1B1 já
7 foi vinculado ao metabolismo da glicose (CEBRIAN-SERRANO et al., 2013). Entretanto os
8 níveis destes transcritos dos genes relacionados ao metabolismo inicial e lipídico não foram
9 encontradas diferenças entre os tratamentos, demonstrando metabolização semelhante nos
10 grupos de embriões avaliados. Estes resultados condizem com o demonstrado por
11 Zangirolamo et al. (2017) para a expressão de SCD e AKRIB1, que também não encontraram
12 diferença na metabolização dos embriões tratados com 100 nM de NPPC na CIV.

13 A expressão gênica de PTGS2/COX2 e VEGFA não demonstrou diferença
14 entre os grupos, estes genes estão envolvidos no potencial de implantação embrionária e na
15 modulação do local de implantação endometrial (BISHOP et al. 2017; KHAN et al., 2018;).
16 Bem como a expressão gênica de HAND1, que está vinculada com a diferenciação das células
17 do trofoblasto sendo essencial para o desenvolvimento embrionário (SCHIFFMACHER &
18 KEEFER, 2013; PEARTON et al., 2014). Dados estes encontrados para HAND1 e
19 PTGS2/COX2 que condizem com trabalhos anteriores (ZANGIROLAMO et al., 2017;
20 BOTIGELLI et al., 2018).

21 A abundância relativa de RNAm para IFNT2 é frequentemente
22 correlacionado com o reconhecimento materno da gestação e com a viabilidade embrionária,
23 também descrito como indicador para a qualidade dos embriões PIVE (SCHIFFMACHER &
24 KEEFER, 2013), porém não foi encontrado diferença na sua expressão. Entretanto dados
25 relatados por Zangirolamo et al., 2017, comparando a suplementação de NPPC (100 nM) no
26 meio de CIV, obtiveram maior expressão de IFTN2 nos embriões do grupo tratado com
27 NPPC em relação ao controle, relacionando esse achado com maior viabilidade embrionária
28 deste grupo.

29 Não encontramos diferença na expressão do genes relacionados a
30 sinalização de citocinas e desenvolvimento embrionário inicial (STAT3; DANG-NGUYEN et
31 al., 2014; MENG et al. 2015), expansão das células do cumulus e captação de glicose
32 (BMP15 e GDF9; SUDIMAN et al. 2014), regulação epigenética (DNMT3 α e DNMT3 β ;
33 AUCLAIR et al., 2014) e receptor do NPPC (NPR-2; POTTER et al., 2009; DE CESARO et
34 al., 2015).

1 A transcrição de FOXO3 regula a expressão de genes envolvidos em
2 mecanismos como a apoptose, resistência ao estresse oxidativo, reparo de DNA, metabolismo
3 de glicose, homeostases de energia e diferenciação celular (WEBB et al., 2014; KUSCU &
4 CELIK-OZENCI, 2015). Outros genes envolvidos com os mecanismos de prevenção a
5 apoptose são o HSPA1A e HSF1, atuando sob várias condições de estresse, como o choque
6 térmico (DAI et al., 2013; LAL et al., 2015) e na ativação do genoma zigótico (LE MASSON
7 & CHRISTIANS, 2011). GPX1 está vinculado ao desenvolvimento embrionário, relacionado
8 com a resistência ao estresse oxidativo, devido as suas funções antioxidantes (CEBRIAN-
9 SERRANO et al., 2013; WANG et al., 2017). Nossos dados não demonstraram diferença na
10 expressão destes genes, a expressão dos genes HSPA1A, HASF1 e GPX1 condizem com os
11 relatados por Zangirolamo et al. (2017) e Botigelli et al. (2018), desta forma nossos resultados
12 demonstram que mesmo em outras concentrações de suplementação do NPPC, o peptídeo
13 natriurético não atua sob o mecanismo de defesa da apoptose, seja por estresse oxidativo ou
14 térmico.

15 Entretanto no trabalho de Botigelli et al. (2018) FOXO3 foi mais expresso
16 após tratamento com NPPC na MIV, sugerindo que esse aumento possivelmente está
17 relacionado a atuação do gene na diferenciação celular (KUSCU & CELIK-OZENCI 2015),
18 conforme foi demonstrando em nosso trabalho pela maior expressão de REST.

19 A expressão de transcrito REST relacionado a pluripotência reforça a nossa
20 hipótese levantada sobre a melhoria da eficiência da PIVE com a suplementação de NPPC na
21 MIV. De acordo com Castillo-Martín et al. (2014) e Cánepa et al. (2014) a expressão de genes
22 com papéis relacionados ao desenvolvimento embrionário é fundamental para esclarecer
23 acontecimentos vinculados neste processo.

24 Em conclusão, ainda que as taxas de blastocisto permaneceram constantes, o
25 uso de NPPC na maturação *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus* levou a diferenças na
26 expressão do gene relacionado à pluripotência e desenvolvimento embrionário, sinalizando
27 um efeito potencialmente benéfico com a suplementação de 150 nM de NPPC na maturação.
28 Além disso, nossos dados fornecem a primeira confirmação da atuação do NPPC na fase de
29 cultivo embrionário a partir da expressão do seu receptor NPR-2 nos embriões.

30
31

1 REFERÊNCIAS

2
3 ALLOUBA, M.H., ELGUINDY, A.M., KRISHNAMOORTHY, N., YACOUB, M.H.,
4 AGUIB, Y.E. Nanog: A pluripotency homeobox (master) molecule. **Glob Cardiol Sci**
5 **Pract.**. (3):36, 2015.

6
7 ASSIDI, M., DUFORT, I., ALI, A., HAMEL, M., ALGRIANY, O., DIELEMANN, S., et al.
8 Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells
9 matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. **Biol**
10 **Reprod**, 79:209–22, 2008.

11
12 AUCLAIR, G., GUIBERT, S., BENDER, A., WEBER, M. Ontogeny of CpG island
13 methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in
14 the mouse. **Genome Biol**, 15:545, 2014.

15
16 BISHOP, C.V., LEE, D.M., SLAYDEN, O.D., LI, X. Intravenous neutralization of vascular
17 endothelial growth factor reduces vascular function/permeability of the ovary and prevents
18 development of OHSS-like symptoms in rhesus monkeys. **J Ovarian Res.** 6;10(1):41, 2017.

19
20 BOTIGELLI, R.C., RAZZA, E.M., PIOLTINE, E.M., FONTES, P.K., SCHWARZ, K.R.L.,
21 LEAL, C.L.V., NOGUEIRA, M.F.G. Supplementing in vitro embryo production media by
22 NPPC and sildenafil affect the cytoplasmic lipid content and gene expression of bovine
23 cumulus-oocyte complexes and embryos. **Reprod Biol.**,18(1):66-75. 2018.

24
25 BOYER, L.A., LEE, T.I., COLE, M.F., JOHNSTONE, S.E., LEVINE, S.S., ZUCKER, J.P.,
26 GUENTHER, M.G., KUMAR, R.M., MURRAY, H.L., JENNER, R.G., GIFFORD, D.K.,
27 MELTON, D.A., JAENISCH, R., YOUNG, R.A. Core transcriptional regulatory circuitry in
28 human embryonic stem cells. **Cell**, 122, 947–956, 2005.

29
30 CÁNEPA, M.J., ORTEGA, N.M., MONTELEONE, M.C., MUCCI, N., KAISER, G.G.,
31 BROCCO, M., MUTTO, A. Expression profile of genes as indicators of developmental
32 competence and quality of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine
33 embryos. **PLoS One.** 30;9(9):e108139, 2014.

34
35 CASTILLO-MARTÍN, M., BONET, S., MORATÓ, R., YESTE, M. Supplementing culture
36 and vitrification-warming media with L-ascorbic acid enhances survival rates and redox status
37 of IVP porcine blastocysts via induction of GPX1 and SOD1 expression. **Cryobiology**, v. 68,
38 p. 451–458, 2014.

39
40 DANG-NGUYEN, T. Q., HARAGUCHI, S., KIKUCHI, K., SOMFAI, T., BODÓ, S.,
41 NAGAI, T. Leukemia inhibitory factor promotes porcine oocyte maturation and is
42 accompanied by activation of signal transducer and activator of transcription 3. **Mol. Reprod.**
43 **Dev.**, 81(230–239), 2014.

44
45 DE CESARO, M. P., MACEDO, M. P., SANTOS, J. T., ROSA, P. R., LUDKE, C. A., RISSI,
46 V. B., GONÇALVES, P. B. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in
47 bovine. **Anim. Reprod. Sci.**, 159, 52–59. 2015.

48
49 DEL COLLADO M, SARAIVA NZ, LOPES FL, GASPAR RC, PADILHA LC, COSTA RR,
50 et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in

- 1 vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in
2 bovine embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, 2015; 28: 1721–1732
- 3
- 4 FRANCIOSI, F., COTICCHIO, G., LODDE, V., TESSARO, I., MODINA, S. C., FADINI,
5 R., DAL CANTO, M., RENZINI, M. M., ALBERTINI, D., LUCIANO, A. M. Natriuretic
6 Peptide Precursor C Delays Meiotic Resumption and Sustains Gap Junction-Mediated
7 Communication in Bovine Cumulus-Enclosed Oocytes. **Biol. Reprod.**, 91, 1–9, 2014.
- 8
- 9 GILCHRIST, R.B. Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities
10 for the development of new approaches to in vitro maturation. **Reprod. Fertil. Dev.**, 23:23–
11 31. 2011.
- 12
- 13 HAMMOND, E.R., STEWART, B., PEEK, J.C., SHELLING, A.N., CREE, L.M. Assessing
14 embryo quality by combining non-invasive markers: early time-lapse parameters reflect gene
15 expression in associated cumulus cells. **Hum. Reprod.**, 30:1850–60, 2015.
- 16
- 17 KHAN, I., CHOWDHURY, M.M.R., SONG, S.H., MESALAM, A., ZHANG, S., KHAN
18 KHALIL, A.A., JUNG, E.H., KIM, J.B., JAFRI, L., MIRZA, B., KONG, I.K. Lupeol
19 supplementation improves the developmental competence of bovine embryos in vitro.
20 **Theriogenology**, 107:203-210, 2018.
- 21
- 22 HUTCHINSON, I. A., HENNESSY, A. A., WATERS, S. M., DEWHURST, R. J., EVANS,
23 A. C. O., LONERGAN, P., BUTLERA, S. T. Effect of supplementation with different fat
24 sources on the mechanisms involved in reproductive performance in lactating dairy cattle.
25 **Theriogenology**, v. 78, p. 12–27, 2012.
- 26
- 27 KUSCU, N., CELIK-OZENCI, C. FOXO1, FOXO3, AND FOXO4 are differently expressed
28 during mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. **Gene Expr.**
29 **Patterns**, 18(1-2):16-20, 2015.
- 30
- 31 LEE, S., JIN, J.X., KHOIRINAYA, C., KIM, G.A., LEE, B.C. Lanosterol influences
32 cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro and improves preimplantation development of
33 cloned embryos. **Theriogenology**, 85, 575–584, 2016.
- 34
- 35 LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-
36 time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- 37
- 38 LOH, Y.H., WU, Q., CHEW, J.L., VEGA, V.B., ZHANG, W., CHEN, X., BOURQUE, G.,
39 GEORGE, J., LEONG, B., LIU, J., WONG, K.Y., SUNG, K.W., LEE, C.W., ZHAO, X.D.,
40 CHIU, K.P., LIPOVICH, L., KUZNETSOV, V.A., ROBSON, P., STANTON, L.W., WEI,
41 C.L., RUAN, Y., LIM, B., NG, H.H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates
42 pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nat. Genet.**, 38, 431–440, 2006.
- 43
- 44 LONERGAN, P., FAERGE I., HYTTEL P.M., BOLAND M., FAIR T. Ultrastructural
45 modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or
46 butyrolactone. **Mol. Reprod. Dev.**, v.64, 369–378, 2003.
- 47
- 48 PASCHOAL, D. M., SUDANO, M. J., GUASTALI, M. D., MAZIERO, R. R. D.,
49 CROCOMO, L. F., MAGALHÃES, L. C. O., RASCADO, T. S., MARTINS JR, A.,

- 1 LANDIM-ALVARENGA, F. C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced
2 bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, 22, 146–157, 2012.
3
- 4 PASCHOAL, D.M., SUDANO, M.J., SCHWARZ, K.R.L., MAZIERO, R.R.D., GUASTALI,
5 M.D.G., CROCOMO, L.F., MAGALHÃES, L.C.O., MARTINS, A., LEAL, C.L.V.,
6 LANDIM-ALVARENGA, F.C. Cell apoptosis and lipid content of in-vitro produced, vitrified
7 bovine embryos treated with forskolin, **Theriogenology**, 87, 108–114, 2017.
8
- 9 POTTER, L. R., YODER, A. R., FLORA, D. R., ANTOS, L. K., DICKEY, D. M. Natri-uretic
10 peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications.
11 **Handbk. Exp. Pharmacol**, v. 191, p. 341–366, 2009.
12
- 13 RIZOS, D., FAIR, T., PAPADOPOULOS, S., BOLAND, M. P., LONERGAN, P.
14 Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos
15 produced in vivo or in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, 62, 320-327, 2002.
16
- 17 ROSA, C. O., MARINHO, L. S. R., DA ROSA, P. R. A., DE CESARO, M. P.,
18 LUNARDELLI, P. A., SILVA-SANTOS, K. C., BASSO, A. C., BORDIGNON, V.,
19 SENEDA, M. M. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte
20 competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. **Reprod. Dom.**
21 **Anim.**, 53, 921–929, 2018.
22
- 23 SANTIQUET, N., PAPILLON-DION, E., DJENDER, N., GUILLEMETTE, C., &
24 RICHARD, F. J. New elements in the C-type natriuretic peptide signaling pathway inhibiting
25 swine in vitro oocyte meiotic resumption. **Biol. Reprod.**, 91(1), 16, 2014.
26
- 27 SCHIFFMACHER, A.T., KEEFER, C.L. CDX2 Regulates Multiple Trophoblast Genes in
28 Bovine Trophectoderm CT-1 Cells, **Mol. Reprod. Develop.** 80, 826 – 839. 2013.
29
- 30 SCHWARZ, K.R.L.K., BOTIGELLI, R.R.C., DEL COLLADO, M., CAVALLARI DE
31 CASTRO, F., FERNANDES, H., PASCHOAL, D.M.D., et al. Effects of fetal calf serum on
32 cGMP pathway and oocyte lipid metabolism in vitro. **Reprod. Fertil. Dev.**, 29. 2017.
33
- 34 SEKI, M., MASAKI, H., ARAUCHI, T., NAKAUCHI, H., SUGANO, S., & SUZUKI, Y. A
35 Comparison of the Rest Complex Binding Patterns in Embryonic Stem Cells and Epiblast
36 Stem Cells. **Plos One**, 9(4), e95374, 2014.
37
- 38 SENEDA, M. M., ESPER, C. R., GARCIA, J. M., OLIVEIRA, J. A., VANTINI, R.
39 Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Anim.**
40 **Reprod. Sci.**, 67:37-43, 2001.
41
- 42 SOARES, A.C.S., LODDE, V., BARROS, R.G., PRICE, C.A., LUCIANO, A.M.,
43 BURATINI, J. Steroid hormones interact with natriuretic peptide C to delay nuclear
44 maturation, to maintain oocyte-cumulus communication and to improve the quality of in
45 vitro-produced embryos in cattle. **Reprod. Fertil. Dev.**, 29(11):2217-2224.2017.
46
- 47 SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., RASCADO, T. S., MAGALHÃES, L. C.,
48 CROCOMO, L. F., DE LIMA-NETO, J. F., LANDIM-ALVARENGA, F. C. Lipid content
49 and apoptosis of in vitroproduced bovine embryos as determinants of susceptibility to
50 vitrification. **Theriogenology**, 75, 1211-1220, 2011.

- 1
2 SUDANO, M.J., SANTOS, V.G., TATA, A., FERREIRA, C.R., PASCHOAL, D.M.,
3 MACHADO, R., et al. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in bos taurus
4 indicus and bos taurus in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biol. Reprod.**, 87:130,
5 2012.
6
7 SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., MAZIERO, R. R. D., RASCADO, T. S., GUASTALI,
8 M. D., CROCOMO, L. F., MAGALHÃES, L. C. O., MONTEIRO, B. A., MARTINS JR, A.,
9 MACHADO, R., LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Improving postcryopreservation
10 survival capacity: an embryo-focused approach. **Anim. Reprod.**, v.10, p.160-167, 2013.
11
12 SUDIMAN, J., SUTTON-MCDOWALL, M.L., RITTER, L.J., WHITE, M.A.,
13 OTTERSHEAD, D.G., THOMPSON, J.G., GILCHRIST, R.B. Bone Morphogenetic Protein
14 15 in the Pro-Mature Complex Form Enhances Bovine Oocyte Developmental Competence.
15 Wrenzycki C, ed. **Plos One**, 9(7) 2014.
16
17 SUTTON-MCDOWALL, M.L., FEIL, D., ROBKER, R.L., THOMPSON, J.G., DUNNING,
18 K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine
19 preimplantation embryos. **Theriogenology**, 77, 1632-1641, 2012.
20
21 THAKORE-SHAH, K., KOLEILAT, T., JAN, M., JOHN, A., PYLE, A.D. REST/NRSF
22 Knockdown Alters Survival, Lineage Differentiation and Signaling in Human Embryonic
23 Stem Cells. Wary KK, ed. **Plos One**, 10(12), 2015.
24
25 UYAR, A., TORREALDAY, S., SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and
26 embryo quality. **Fertil. Steril.**, 99:997–1003, 2013.
27
28 ZANGIROLAMO, A.F., COSTA, C.B., LUNARDELLI, P. A., PIOLTINE, E. M.,
29 CARDOSO, B. L., BASSO, A.C., NOGUEIRA, M. F. G., SENEDA, M.M. Evaluation of
30 lipid content and gene expression in bovine embryos produced in vitro treated with natriuretic
31 peptide C (NPPC). **Anim. Reprod.**, 14 (3) 737, 2017. (Abstract).
32
33 ZHANG, J.; WEI, Q.; CAI, J.; ZHAO, X.; MA, B. Effect of C-Type Natriuretic Peptide on
34 Maturation and Developmental Competence of Goat Oocytes Matured In Vitro. **PLoS One**,
35 10(7):e0132318, 2015.
36
37 ZHANG, F., TANG, Z., HOU, X., LENNARTSSON, J., LI, Y., KOCH, A.W., SCOTNEY,
38 P., LEE, C., ARJUNAN, P., DONG, L., KUMAR, A., RISSANEN, T.T., WANG, B.,
39 NAGAI, N., FONS, P., FARISS, R., ZHANG, Y., WAWROUSEK, E., TANSEY, G.,
40 RABER, J., FONG, G.H., DING, H., GREENBERG, D.A., BECKER, K.G., HERBERT,
41 J.M., NASH, A., YLA-HERTTUALA, S., CAO, Y., WATTS, R.J., LI, X. VEGF-B is
42 dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting
43 inhibits pathological angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 2009.
44
45 ZHANG, M., SU, Y. Q., SUGIURA, K., XIA, G., EPPIG, J. J. Granulosa cell ligand NPPC
46 and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, 330, 366–369,
47 2010.
48

- 1 ZHANG, W., YANG, Y., LIU, W., CHEN, Q., WANG, H., WANG, X., ZHANG, Y.,
2 ZHANG, M., XIA, G. Brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide maintain
3 porcine oocyte meiotic arrest. **J. Cell. Phys.**, 230, 71–81, 2015.
4
- 5 ZHANG, Y., WANG, H., LIU, W., YANG, Y., WANG, X., ZHANG, Z., GUO, Q., WANG,
6 C., XIA, G. Natriuretic peptides improve the developmental competence of in vitro cultured
7 porcine oocytes. **Reprod. Biol. Endoc.**, 15:41, 2017.
8
- 9 WANG, Q.; HUANG, J.; ZHANG, H.; LEI, X.; DU, Z.; XIAO, C.; CHEN, S.; REN, F. 5
10 Selenium Deficiency-Induced Apoptosis of Chick Embryonic Vascular Smooth Muscle Cells
11 6 and Correlations with 25 Selenoproteins. **Biol. Trace Elem. Res.**, 176(2):407-415, 2017.
12
- 13 WEBB, A.E., BRUNET, A. FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality
14 control. **Trends Biochem. Sci.**, 39:159–69, 2014.
15
- 16 WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., LUCAS-HAHN, A., LEMME, E., KORSAWE, K., et
17 al. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived
18 preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome?. **Anim.**
19 **Reprod. Sci.**, 82–83: 593–603, 2004.
20
21

7. ARTIGO III

Perfil lipídico de embriões produzidos *in vitro* de vacas Nelore com baixa e alta quantidade de folículos antrais

Lipid profile of embryos produced *in vitro* of Nelore cows with low and high numbers of antral follicles

RESUMO

A quantidade de lipídeos disponíveis para os processos de desenvolvimento inicial de embriões produzidos *in vitro* pode refletir diretamente na qualidade embrionária e conseqüentemente nas taxas de prenhez. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar o perfil lipídico de embriões produzidos *in vitro* de fêmeas *Bos taurus indicus* com diferentes quantidades de folículos antrais (FAs). Para o cultivo *in vitro* foram utilizados ovários (n = 498) de 249 fêmeas Nelore, coletados de abatedouro local e transportados em solução salina a 30-35° C até o laboratório. O número de FA foi determinado através de contagem visual da superfície de ambos os ovários de cada animal. Os animais foram classificados em grupo de baixa (≤ 31 ; média menos DP) e alta quantidade de FAs (≥ 92 ; média mais DP). Os oócitos foram maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas em D3 e D7, respectivamente. No dia 7 (D7) os blastocistos (n = 18 por grupo) foram coletados e submetidos a análise do perfil lipídico pela técnica de Ionização por eletrospray por dessorção acoplada a espectrometria de massa (DESI-MS). As taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas pelo teste de regressão logística utilizando o pacote estatístico Car do software "R" e as diferenças foram consideradas significativas se $P \leq 0,05$. Para a análise do perfil lipídico, foi utilizado a análise de componentes principais (PCA), seguido do teste t de Student. As taxas de clivagem e blastocisto não apresentaram diferenças entre os grupos (78,9% e 41,7% no grupo de alta; n= 419 oócitos; 79,5% e 40,3% no grupo de baixa; n= 357 oócitos). O perfil lipídico de embriões derivados de vacas com maior quantidade de FAs apresentaram uma maior concentração de lipídios da categoria dos triacilgliceróis quando comparados aos embriões de vacas com menor quantidade de FAs, apesar de fazerem parte da reserva energética estes lipídios estão relacionados a danos em organelas celulares *in vitro*. Em contrapartida, embriões de vacas

1 com baixa FA apresentaram maiores concentrações de colesterol e seus derivados e
2 diacilgliceróis, lipídios com papel importante na divisão celular. Em conclusão, nossos
3 resultados confirmam diferenças nos embriões produzidos *in vitro* quando comparamos
4 diferentes quantidades de FAs, porém não foi possível avaliar sua interferência significativa
5 nas taxas de clivagem e blastocistos.

6
7 **Palavras-chave:** *Bos indicus*, DESI-MS, embriões, *in vitro*, CFA.

8 9 **ABSTRACT**

10
11 The amount of lipids available for the initial development processes of embryos produced in
12 vitro may reflect directly on the embryonic quality and consequently on the pregnancy rates.
13 Thus, the objective of the present study was to investigate and compare the lipid profile of
14 embryos produced in vitro of *Bos taurus indicus* females with different amounts of antral
15 follicles (AFs). For in vitro culture ovaries were used (n = 498) 249 Nelore collected from a
16 local slaughterhouse and transported in saline at 30-35° C until laboratory. The number of AF
17 was determined by visual counting of the surface of both ovaries of each animal. The animals
18 were classified as low (≤ 31 , average minus *SD*) and high number of AF (≥ 92 , average plus
19 *SD*). Oocytes were matured, fertilized and cultured in vitro. The cleavage and blastocyst rates
20 were evaluated in D3 and D7, respectively. On day 7 (D7) the blastocysts (n = 18 per group)
21 were collected and submitted to lipid profile analysis by Desorption Electrospray Ionization-
22 Mass Spectrometry (DESI-MS). Cleavage and blastocyst rates are presented as percentages
23 and were subjected to a logistic regression test using the Car statistical package of “R”
24 software and differences were statistically significant when $P \leq 0.05$. For analysis of the lipid
25 profile, principal component analysis (PCA) was used, followed by Student's t-test. Cleavage
26 and blastocyst rates were not different between groups (78.9% and 41.7% in the High group;
27 n = 419 oocytes; 79.5% and 40.3% in the Low group; n = 357 oocytes). The lipid profile of
28 embryos derived from cows with higher AFs presented a higher concentration of lipids in the
29 triacylglycerols category when compared to the embryos of cows with a lower number of
30 FAs, although they are part of the energy reserve these lipids are related to damage to cellular
31 organelles in vitro. Nevertheless, cow embryos with low AF presented higher concentrations
32 of cholesterol and its derivatives and diacylglycerols, lipids with important role in cell
33 division. In conclusion, our results confirm differences in embryos produced in vitro when

1 comparing different amounts of FAs but was not possible to evaluate their significant
2 interference in the rates of cleavage and blastocysts.

3 4 7.1 INTRODUÇÃO

5
6 O número de folículos antrais (FAs) e sua relação com a fertilidade tem sido
7 foco de inúmeros estudos e de alta importância para o desempenho reprodutivo de bovinos e
8 suas biotecnologias (SILVA-SANTOS et al., 2014 a,b; SANTOS et al., 2016; MOROTTI et
9 al., 2017). Esta quantidade de FA também tem sido descrita como um marcador fenotípico de
10 características reprodutivas, como os níveis circulantes de hormônio anti-Mülleriano (AMH;
11 STOJSIN-CARTER et al., 2016), testosterona (MARTINEZ et al., 2016), qualidade oocitária
12 (Ireland et al., 2009), resposta a tratamentos de superovulação (IRELAND et al., 2007),
13 número e qualidade de embriões produzidos *in vitro* (PONTES et al., 2011; SANTOS et al.,
14 2016) e taxas de prenhez (MARTINEZ et al., 2016; MOSSA et al., 2012).

15 Uma alta variação no número de FA tem sido relatada entre indivíduos e
16 uma elevada repetibilidade em toda a vida reprodutiva de um indivíduo (BURNS et al., 2005;
17 IRELAND et al., 2007; SILVA-SANTOS et al., 2014; MOROTTI et al., 2018). A quantidade
18 de FAs já foi utilizada para selecionar animais doadores de oócitos para a produção *in vitro*
19 (PIV) de embriões em larga escala (PONTES et al., 2011). No entanto, a PIV de embriões
20 derivados de fêmeas bovinas classificadas pela contagem de folículos antrais (CFA) ainda
21 possuem resultados conflitantes (PONTES et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2014a,
22 2014b; SANTOS et al., 2016; ROSA et al.; 2018), bem como, quando relacionados com as
23 taxas de prenhez por inseminação artificial em tempo fixo (IATF; RODRIGUES et al., 2013;
24 SANTOS et al., 2016; MOROTTI et al., 2018).

25 Juntamente com a PIVE, processos que auxiliem a preservação dos
26 embriões, como a criopreservação, são de suma importância. Sendo assim, sabe-se que o
27 conteúdo lipídico juntamente com seu perfil, podem influenciar a PIVE e a criopreservação.
28 Os lipídios são de extrema importância para o metabolismo inicial dos embriões, fornecendo
29 energia para seu desenvolvimento (SUDANO et al., 2016). Porém seu excesso, característico
30 de desses embriões, pode afetar negativamente seu metabolismo e conseqüentemente a
31 produção (WU et al., 2011).

32 Dentre as técnicas analíticas para análise lipídica de oócitos e embriões de
33 mamíferos, a espectrometria de massa (EM) se estabeleceu como uma ferramenta precisa para
34 obter informações estruturais lipídicas (SILVA-SANTOS et al., 2014c). Juntamente a

1 Ionização por eletrospray por dessorção acoplada ao espectrofotômetro de massa (DESI-MS),
2 fornece uma maior precisão dos lipídeos encontrados em oócitos e embriões (SUDANO et al.,
3 2011; FERREIRA et al., 2012; PASCHOAL et al., 2017; LASKOWSKI et al., 2018). Desta
4 forma, o objetivo de nosso estudo foi comparar o perfil lipídico de embriões produzidos *in*
5 *vitro* a partir de complexos *cumulus* oócitos (CCOs) de fêmeas *Bos taurus indicus* com alta e
6 baixa quantidade de folículos antrais, com o intuito de esclarecer algumas lacunas na
7 fisiologia destas categorias e conseqüentemente suas aplicações nas biotécnicas.

8 9 7.2 MATERIAL E MÉTODOS

10
11 Salvo indicação, os produtos utilizados foram da Sigma Chemical Company
12 (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Este estudo foi realizado de acordo com o Comitê de
13 Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, com base na Lei
14 Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008.

15 16 7.2.1 Animais

17
18 Ovários (com corpo lúteo) de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade
19 entre 72 e 96 meses e escore de condição corporal $\geq 3,5$ (variação de 1 a 5) foram coletados
20 em um abatedouro local. Ambos os ovários de cada fêmea foram coletados separadamente e
21 transportados para o laboratório em solução salina (0,9% NaCl) a 30-35 ° C.

22 23 7.2.2 Classificação dos animais de acordo com a número de folículos antrais

24
25 Previamente foi realizado um experimento piloto para quantificação da
26 média da população de folículos antrais, para possibilitar uma classificação dos grupos
27 experimentais mais fidedigna (n=168 fêmeas), realizado pela contagem dos folículos antrais
28 (CFA) visíveis na superfície dos ovários e considerando o par de ovários de cada animal
29 (FITZPATRICK; ENTWISTLE, 1997; CUSHMANN et al., 2009). A CFA de todos os
30 animais foi feita pelo mesmo operador previamente treinado.

31 O número médio de FA (61,14) e o desvio padrão (DP 30,43) contados nos
32 168 pares de ovários foram usados para classificar os animais em grupos com baixo (≤ 31 ;
33 média menos DP) e alto (≥ 92 ; média mais DP) números de FA. A classificação obtida dos

1 animais manteve a proporção de 15% a 20% das vacas classificadas nos grupos de baixa e alta
2 citado na literatura (IRELAND et al., 2011; MOSSA et al., 2012).

3 4 7.2.3 Produção *in vitro* de embriões

5
6 Para avaliar o desenvolvimento embrionário, 776 CCOs foram submetidos a
7 maturação *in vitro* (MIV), fertilização (FIV) e cultura de embriões (CIV) em nove repetições.
8 Folículos de 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados com uma agulha de calibre 21 gauge
9 descartável conectada a uma seringa de 10 ml, e os CCOs de cada grupo experimental foram
10 recuperados separadamente. Apenas CCOs com pelo menos três camadas de células do
11 *cumulus* e citoplasma homogêneo (graus 1 e 2; SENEDA et al., 2001) foram selecionados
12 para a CIV. Grupos de 15 oócitos foram maturados, fertilizados e cultivados de acordo com
13 Rosa et al. (2018).

14 15 7.2.4 Análise do perfil lipídico pela técnica de DESI-MS

16
17 Blastocistos (n = 18 por grupo) foram armazenados individualmente em 2
18 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) suplementada com 0,1% de álcool
19 polivinílico (PVA) e enviados em gelo seco para a University of Agricultural Sciences
20 (Uppsala, Sweden) to Purdue University (West Lafayette, IN, USA; USDA permit 126609
21 Research). Um espectrômetro de massa Thermo Scientific LTQ (San Jose) foi utilizado para o
22 estudo. A pulverização por Espectrometria de Massa de Ionização por Electrospray por
23 Dessorção (DESI-MS) tinha 5 kV aplicada à seringa de agulha de aço inoxidável que
24 administrava o vaporizador de solvente e a pressão do gás de azoto foi regulada para 160 psi.
25 A temperatura capilar foi ajustada para 275 °C. Para a detecção de íons positivos, o
26 acetoneitrila dopado com 10 µg mL⁻¹ de Ag₂NO₃ foi utilizado como sistema solvente. O
27 caudal do solvente foi de 8 µL min⁻¹. O uso de Ag₂NO₃ no spray DESI permitiu a obtenção de
28 adutos lipídicos de prata, que são facilmente reconhecidos pela característica relação de
29 abundância 1: 1 dos isótopos 107Ag: 109Ag. O tempo de injeção do instrumento foi de 100
30 ms, com controle automático de ganho (CAG) ativado. O número de microscanos médios
31 foram três. O intervalo de massa foi m / z 600–1400. Os potenciais de voltagem capilar e de
32 tubo foram de 15V e 90V, respectivamente. Informações de publicações anteriores utilizando
33 a análise DESI-MS de embriões bovinos com MS de alta resolução também foram utilizadas

1 para identificação de lipídios (GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2013; PIRRO et al., 2014;
2 LASKOWSKI et al., 2018).

3

4 7.2.5 Análise Estatística

5

6 Para a comparação das taxas de clivagem e blastocistos, as respostas foram
7 apresentadas como percentagem e submetidas ao teste de regressão logística, utilizando o
8 pacote estatístico Car do software "R" (R Development Core Team - 2008). As diferenças
9 foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

10

11 Na análise do perfil lipídico, para cada amostra, uma lista de valores m/z e
12 suas abundâncias relativas foram obtidas a partir de espectros de massa médios considerando
13 a faixa m / z 600-1400. Os dados foram importados para o software online Metaboanalyst 4.0
14 (www.metaboanalyst.ca), auto escalonados e submetidos a análises multivariadas por análise
15 de componentes principais (PCA) e análise univariada pelo teste t de Student. Os valores de
16 *fold-change* também foram calculados e considerados significativos quando $FC > \pm 1,5$ e P
17 $< 0,05$.

17

18 7.3 RESULTADOS

19

20 7.3.1 Cultivo in vitro

21

22 Ao comparar as taxas de clivagem e blastocistos de vacas de Alta CFA e
23 Baixa CFA, foram encontradas taxas de desenvolvimento semelhantes na clivagem e na
24 produção dos embriões (Tabela 1).

25

26 **Tabela 1-** Taxas de clivagem e blastocisto produzidos *in vitro* a partir de oócitos provenientes
27 de vacas Nelore com Alta (≥ 92 FAs) e Baixa (≤ 31 FAs) quantidade de folículos antrais.

Quantidade de folículos antrais	Oócitos		Clivagem		Blastocistos	
	n		n	%	n	%
Alta (≥ 92)	419		331	78,9 ^a	175	41,7 ^a
Baixa (≤ 31)	357		284	79,5 ^a	144	40,3 ^a
Total	776		615	79,2	319	41

28

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

1

2 7.3.2 Perfil lipídico pelo DESI-MS

3

4 A atribuição das espécies lipídicas encontradas nos embriões produzidos *in*
5 *vitro* dos grupos alta e baixa contagem de FAs, foi feita usando a análise de dissociação
6 induzida por colisão através do DESI-MS. Devido à grande quantidade de informações
7 químicas obtidas pelo DESI-MS, muitos íons lipídicos de baixa intensidade estão presentes no
8 espectro de massa. Foram selecionados 49 íons para análise estatística (Arquivo suplementar,
9 Tabela S1). Um total de 18 íons apresentaram *fold-change* maior que o *cutoof* estabelecido
10 (*cutoof* = 2; Tabela 2).

11

1 **Tabela 2** - Valores de m/z dos íons selecionados os quais apresentaram diferentes
 2 concentrações na comparação dos embriões derivados de animais classificados com alta vs
 3 baixa quantidade de folículos antrais (FAs), tentativa de atribuição e fold-change dos íons
 4 avaliados no modo positivo do DESI-MS em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. As
 5 setas ↓ indicam baixa concentração do íon e setas ↑ indicam alta concentração do íon
 6 comparando os animais de alta vs baixa quantidade de FAs. Abreviações: EC ésteres de
 7 colesterol e derivados; DAG, diacilgliceróis; TAG, triacilgliceróis.

8

m/z do íon	Descrição do íon	Tentativa de atribuição* (C: I) ^a	Fold- change
686,49	[M+Ag ₂ NO ₃] ⁺	Squalene	↓ 5,2819
688,41	[M+Ag] ⁺	Squalene	↓ 5,2793
725,37	[M+Ag] ⁺	DAG (36:2)	↑ 3,7243
751,23	[M+Ag] ⁺	DAG (38:4)	↑ 7,8802
753,00	[M+Ag] ⁺	EC (18:3)	↑ 151,5151
779,00	[M+Ag] ⁺	EC (20:4)	↓ 2,9255
781,58	[M+Ag] ⁺	EC (20:3)	↑ 9,2678
797,00	[M+Ag] ⁺	TAG (40:2)	↓ 5,7107
799,73	[M+Ag] ⁺	TAG (40:1)	↓ 3,1737
803,16	[M+Ag] ⁺	EC(22:6)	↑ 3,4638
805,53	[M+Ag] ⁺	EC (22:5)	↑ 5,4229
823,82	[M+Ag] ⁺	TAG (42:3)	↓ 9,2400
841,00	[M+Ag] ⁺	EC (24:1)	↑ 2,3724
909,80	[M+Ag] ⁺	TAG (48:2)	↓ 4,0395
1106,16	[M+Ag ₂ NO ₃] ⁺	TAG (50:3)	↓ 4,6352
1037,53	[M+Ag] ⁺	TAG (58:8)	↓ 3,6699
1132,55	[M+Ag ₂ NO ₃] ⁺	TAG (52:3)	↓ 3,5701
1162,58	[M+Ag ₂ NO ₃] ⁺	TAG (54:2)	↓ 2,7796

9

10

11

12

13

*As atribuições dos lipídeos foram de acordo com pesquisas das fórmulas moleculares previstas e possíveis adutos segundo González-Serrano et al., 2013, Pirro et al., 2014, Laskowski et al., 2018. ^a(C:I) representa o número de átomos de carbono (C) e o número de insaturações (I) das cadeias de ácidos graxos.

14

15

A maioria dos íons detectados no modo positivo eram aduto de prata ([M⁺Ag]⁺) ou nitrato de prata ([M⁺Ag₂NO₃]⁺). Foi observada diferenças entre os perfis

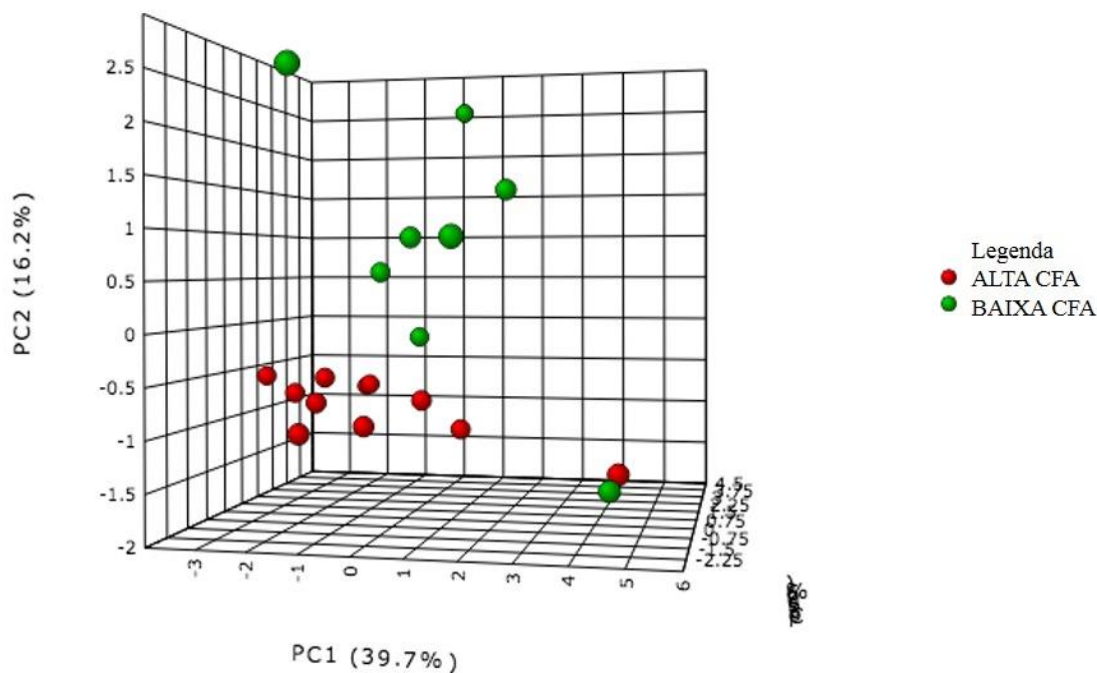
1 lipídicos dos embriões de alta e baixa contagem de FAs. O perfil dos embriões de alta FA
2 exibiram uma maior concentração de lipídeos do tipo triacilgliceróis (TAG) quando
3 comparados aos embriões de baixa FA (Tabela 2). Houve predominantemente uma maior
4 concentração de lipídios categorizados como ésteres de colesterol e derivados (EC) e
5 diacilgliceróis (DAG) nos embriões de vacas de baixa FA.

6 Esta comparação foi feita utilizando representações de componentes
7 principais do espectro de massa de forma análoga à usada por Laskowski et al., 2018. Os íons
8 encontrados em nosso estudo, apresentaram elevação expressiva com *fold change* até
9 aproximadamente 100 vezes maior que cutoff estabelecido e reduzida expressão relativa com
10 *fold change* de 6 vezes maior que o *cutoff*. Os valores de abundância relativa dos íons
11 encontrados estão dispostos no Tabela 2.

12 A Figura 1 mostra o gráfico de pontuação tridimensional (PC2 vs PC1) dos
13 dois grupos experimentais, sendo que a análise de componentes principais (PCA) é
14 comumente usada para investigações exploratórias das informações complexas contidas em
15 um conjunto de dados espectrais de massa completo, para permitir a consideração de todas as
16 variáveis espectrais e suas inter-correlações, simultaneamente (GONZALEZ-SERRANO et
17 al., 2013). Em nossos resultados, foram encontrados 55,9 % de variabilidade entre os íons
18 lipídicos de embriões do grupo de alta vs baixa quantidade de FA.

19
20

1 **Figura 1-** Plotagem tridimensional de pontuação dos íons lipídicos selecionados de embriões
 2 do grupo de vacas com alta (vermelho) e baixa (verde) quantidade de folículos antrais. As
 3 variâncias explicadas são mostradas entre parênteses (PC2 vs PC1). Cada ponto representa um
 4 íon lipídico. Existe uma clara discriminação entre grupos experimentais, indicando diferenças
 5 na composição lipídica de cada categoria.



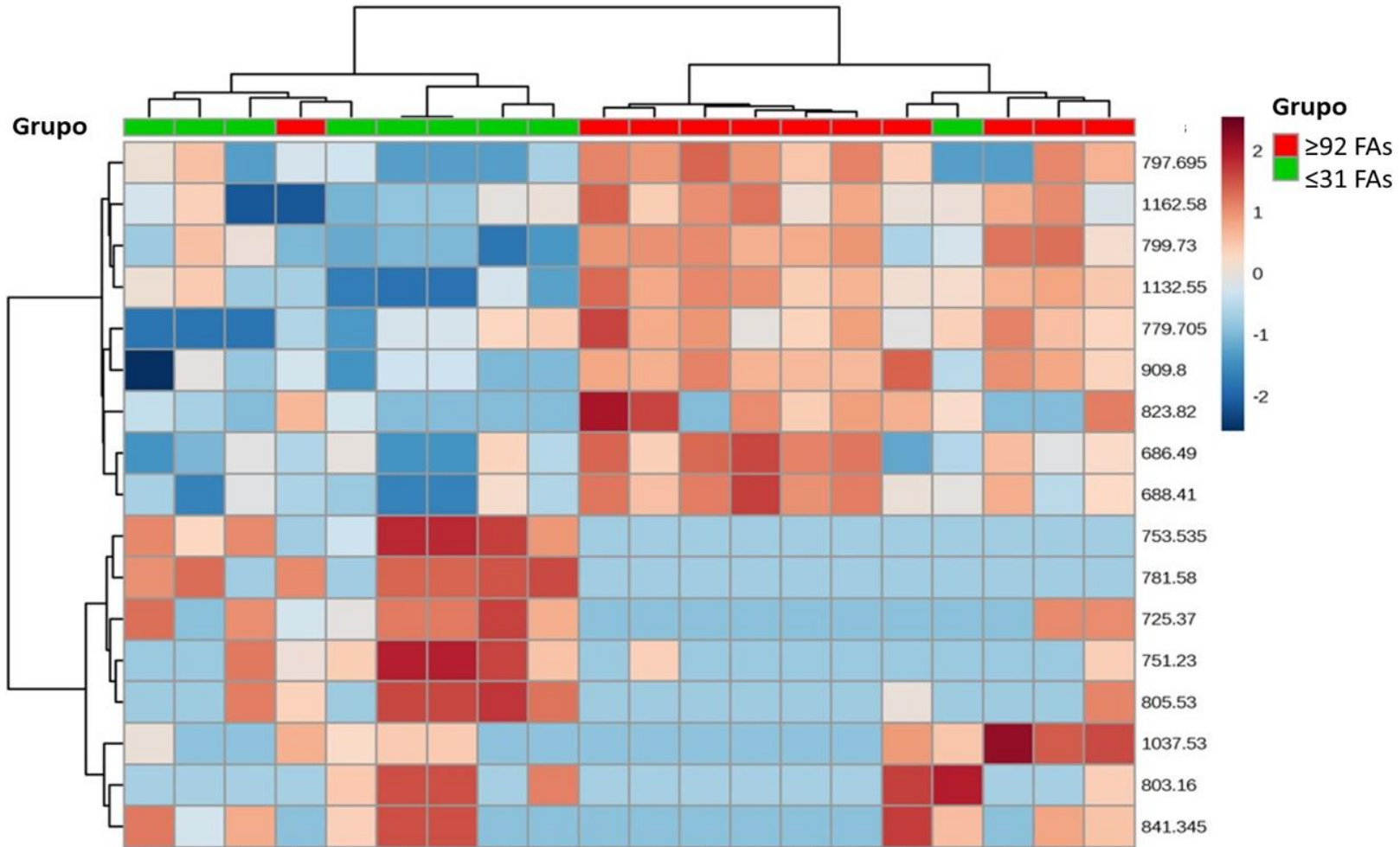
6

7

8 No gráfico Heatmap (Figura 2), pode-se observar um padrão de cores diferentes entre os
 9 animais de alta vs baixa contagem de FAs. Íons categorizados como TAG estão mais
 10 concentrados nos embriões de alta contagem de FA (coloração vermelha) e íons categorizados
 11 como EC e DAG nos embriões de baixa contagem de FA.

12

- 1 **Figura 2-** Mapa de cor (Heatmap) dos íons lipídicos seleccionados de embriões do grupo de vacas com alta (≥ 92) e baixa (≤ 31) quantidade de
 2 FAs. Cada linha representa um íon e as colunas estão divididas em duas classes: animais de alta FA (vermelho) e baixa FA (verde). Nas células
 3 do mapa, vermelho mais escuro indica maior concentração dos dados e azul mais escuro menor concentração dos dados.



1 7.4 DISCUSSÃO

2

3 Este estudo é o primeiro a investigar o perfil lipídico de embriões
4 produzidos *in vitro* derivados de fêmeas da raça Nelore com alta vs baixa quantidade de FAs
5 (≥ 92 vs ≤ 31 FAs) através da técnica de DESI-MS. Inúmeras técnicas, incluindo cromatografia
6 acoplada a espectrometria de massa e o MALDI (Ionização e dessorção a laser assistida por
7 matriz), já foram utilizados para avaliar o conteúdo lipídico de amostras (SILVA-SANTOS et
8 al., 2014; PIRRO et al., 2016; RAZZA et al., 2018). No entanto, a técnica de DESI-MS é
9 altamente específica, sendo uma análise que fornece o conteúdo e proporção do conteúdo
10 lipídico presente na amostra e mapeamento espacial de biomoléculas dentro de biológicos
11 individuais (PIRRO et al., 2018). Sua detecção, diferente da técnica de MALDI-MS, mostra-
12 se mais sensível a identificação de ácidos graxos livres e espécies intactas de
13 glicerofosfolídeos (MANICKE, et al., 2008; FERREIRA et al., 2012).

14 Os embriões derivados de vacas com maior quantidade de FAs, mostraram
15 diferente perfil lipídico comparados aos embriões do grupo de vacas com menor quantidade
16 de FAs. Foi observada uma concentração superior de lipídios da categoria dos
17 triacilglicerídeos (TAG) nos embriões derivados de animais de alta contagem de FAs. Em
18 contrapartida, a categoria de lipídeos colesterol e seus derivados (CE) e diacilglicerídeos
19 (DAG) se apresentaram inferiores nessa categoria. De maneira oposta, os embriões de baixa
20 FA, apresentaram concentrações menores de TAG e maiores de CE e DAG.

21 Os derivados do colesterol estão presentes na formação de todas as
22 membranas celulares e são importantes para a divisão celular após a fertilização (WU et al.,
23 2011; GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2013). Já os TAG, armazenam os ácidos graxos livres
24 (AGL) em forma de gotículas intracitoplasmáticas nas células de mamíferos, que representam
25 uma reserva energética para a célula (GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2013; SUDANO et al.,
26 2016). No entanto, o acúmulo dessas gotículas de TAG intracelularmente, está
27 significativamente associada a danos em organelas celulares, como as mitocôndrias e retículo
28 endoplasmático (WU et al., 2011). Porém, esta possível maior concentração lipídica da
29 categoria dos TAG nos embriões de fêmeas com alta quantidade de FAs, não interferiu com
30 relação a viabilidade embrionária avaliada nesse estudo. No caso, não foi evidenciado
31 alteração nas taxas de clivagem e blastocisto.

32 Juntamente com a redução dos lipídeos, o squaleno, um triterpeno
33 poliinsaturado, apresentou reduzido nos embriões de vacas com baixa quantidade de FAs. O
34 squaleno, é um precursor de colesterol e está relacionado com ação antioxidante nos

1 organismos (POPA et al., 2015; SHIMIZU et al., 2018). No entanto, para afirmarmos sua
2 ação em nossos embriões, são necessários mais estudos.

3 A análise dos componentes principais (PCA) mostrou nítida separação entre
4 os embriões de alta e baixa contagem de FAs, indicando diferenças lipídicas em sua
5 constituição. Fato este que corrobora com os achados através da análise estatística por meio
6 dos valores de *fold-change* das amostras avaliadas.

7 Sabe-se que embriões produzidos *in vitro* são diferentes dos embriões
8 produzidos *in vivo* (POLLARD & LEIBO, 1993; SARAGUSTY & ARAV, 2011), o que
9 também tem sido associado às diferenças nas características físicas e morfológicas desses
10 embriões (GAD et al., 2012). Embriões PIV são mais sensíveis ao resfriamento e
11 criopreservação, principalmente, devido ao maior acúmulo de lipídeos nos embriões PIV e à
12 diferença na proporção de proteínas nestes dois tipos de embriões (CAMARGO et al., 2011;
13 DODE et al., 2013; SUDANO et al., 2013).

14 Pesquisas com a suplementação do meio de PIVE com substâncias como o
15 forskolin (PASCHOAL et al., 2012; SILVA et al., 2017), etossulfato de fenazina (SUDANO
16 et al., 2011), peptídeo natriurético C (ZANGIROLAMO et al.; 2017; BOTIGELLI et al., 2018)
17 e L-carnitina (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), juntamente com a utilização de meios
18 “serum free” são realizadas com o intuito de diminuir a concentração de lipídeos de embriões
19 PIV e conseqüentemente aumento da criotolerância. Neste contexto, podemos sugerir que a
20 seleção de fêmeas Nelore (*Bos indicus*) com menores quantidades de FAs para a PIVE, as
21 quais demonstraram produzir embriões com menor conteúdo de TAGs, possivelmente
22 resultem em embriões mais criotolerantes. Porém, mais estudos devem ser realizados acerca
23 desta hipótese relacionada a criopreservação destes embriões.

24 Embora o perfil lipídico dos embriões tenha se mostrado influenciado pelo
25 número de FAs, esse efeito não foi observado na produção *in vitro* de embriões. Esses
26 resultados são consistentes com os dados obtidos com Braford (SILVA-SANTOS et al.,
27 2014a) e fêmeas mestiças (IRELAND et al., 2007), que também relataram nenhum efeito do
28 número de FAs no desenvolvimento embrionário *in vitro*. Silva-Santos et al., (2014c) não
29 encontraram diferenças no perfil lipídico no CCOs de fêmeas *Bos indicus* e *Bos indicus-*
30 *taurus* com alta e baixa quantidade de oócitos recuperados por OPU. A capacidade de
31 desenvolvimento de oócitos para se submeter maturação, fertilização e clivagem precoce são
32 influenciadas tanto pelo conteúdo lipídico quanto pela atividade mitocondrial (MCEVOY et
33 al. 2000; CUMMINS 2004; CASTANEDA et al. 2013). Trabalho esse que corrobora com as
34 taxas demonstradas na PIVE, quais foram semelhantes entre as duas categorias de fêmeas

1 estudadas. Entretanto, o processo e/ou meio utilizados durante a PIVE podem ter resultado na
2 maior deposição de lipídeos nos embriões (CAMARGO et al., 2011; DODE et al., 2013;
3 SUDANO et al., 2013).

4 Neste estudo fornecemos uma análise abrangente e aprofundada da
5 composição lipídica dos embriões de vacas Nelore, considerando duas categorias distintas, ou
6 seja, fêmeas com maior e menor quantidade de FAs. Levando em consideração nossas
7 resultados e conjunto com os obtidos por Silva-Santos et al. (2014c) que não obtiveram
8 diferença no perfil lipídico de oócitos de fêmeas de alta e baixa contagem de FAs, podemos
9 sugerir que os atuais sistemas de produção *in vitro* estão associados a profundas alterações no
10 perfil lipídico e no metabolismo de embriões pré-implantados, com possíveis efeitos
11 deletérios sobre o desenvolvimento (GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2013). Usando esta nova
12 abordagem analítica para estudar o metabolismo lipídico (DESI-MS), nossos achados abrem
13 caminho para melhoria de sistemas de cultura *in vitro*, bem como na seleção de doadoras
14 possivelmente mais eficientes para PIV.

15 Em um estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa com bovinos da raça
16 Nelore, foi observada uma correlação positiva entre o número de oócitos recuperados pela
17 aspiração folicular (OPU) e a PIVE; no entanto, o número FAs não afetou as taxas de
18 concepção após a IATF (SANTOS et al., 2016). Desta forma, destacamos a importância de
19 considerar separadamente os bovinos de diferentes origens genéticas ao realizar experimentos
20 relacionados à população de FAs. A análise e interpretação dos dados, bem como a
21 classificação das fêmeas de acordo com os números FA, devem ser conduzidas de acordo com
22 as condições particulares do rebanho.

23 Em conclusão, vacas com maior quantidade de folículos antrais apresentam
24 maior concentração de lipídeos do tipo TAG e menor concentração de EC e DAG, quando
25 comparados aos embriões de baixa quantidade de FAs. Desta forma podemos afirmar que
26 existem diferenças no perfil lipídico de embriões de vacas Nelore (*Bos indicus*) com alta (≥ 92
27 FAs) e baixa (≤ 31 FAs) quantidade de FAs, porém não foi possível avaliar sua interferência
28 significativa em taxas de clivagem e blastocistos. São necessários mais estudos que priorizem
29 a investigação dos lipídeos e sua possível interferência com o desenvolvimento embrionário
30 inicial e viabilidade celular, tendo em vista esta diferença do perfil lipídico demonstrada.

31

32

1 **REFERÊNCIAS**

2
3 CAMARGO, L. S. A., BOITE, M. C., WOHLRES-VIANA, S., MOTA, G. B., SERAPIAO,
4 R. V., SA, W. F., VIANA, J. H. M., NOGUEIRA, L. A.G. Osmotic challenge and expression
5 of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**,
6 63, 256–262, 2011.

7
8 CASTANEDA, C.A., KAYE, P., PANTALEON, M., PHILLIPS, N., NORMAN, S., FRY, R.
9 D'OCCHIO, M.J. Lipid content, active mitochondria and brilliant cresyl blue staining in
10 bovine oocytes. **Theriogenology**, 79, 417–422, 2013.

11
12 CUMMINS, J.: The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional
13 competence. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, 115, 23–29, 2004.

14
15 CUSHMANN, R. A., ALLAN, M. F., KUEHN, L. A., SNELLING, W. M., CUPP, A. S., &
16 FREETLY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred
17 beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. **J.**
18 **Animal Sci.**, 87, 1971–1980, 2009.

19
20 DODE, M.A.N., LEME, L.O., SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos
21 produzidos in vitro: Review. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 37, 145-150, 2013.

22
23 FERREIRA, C. R., PIRRO, V., EBERLIN, L. S., HALLETT, J. E., COOKS, R. G.
24 Developmental Phases of Individual Mouse Preimplantation Embryos Characterized by Lipid
25 Signatures using Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Anal. Bioanal.**
26 **Chem.**, 10, 2915- 2926, 2012.

27
28 GAD, A., SCHELLANDER, K., HOELKER, M., TESFAYE, D. Transcriptome profile of
29 early mammalian embryos in response to culture environment. **Anim. Reprod. Sci.**, 134, 76-
30 83, 2012.

31
32 GONZÁLEZ-SERRANO, A. F., PIRRO, V., FERREIRA, C. R., OLIVERI, P., EBERLIN, L.
33 S., HEINZMANN, J., LUCAS-HAHN, A., NIEMANN, H., COOKS, R. G. Desorption
34 electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and
35 embryos. **PLoS One** 8, 74981, 2013.

36
37 IRELAND, J.J., WARD, F., JIMENEZ-KRASSEL, F., IRELAND, J. L. H., SMITH, G.W.,
38 LONERGAN, P., EVANS, A. C. O. Follicle numbers are highly repeatable within individual
39 animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-
40 quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Hum. Reprod.**, 22, 1687–1695, 2007.

41
42 IRELAND, J. J., SMITH, G. W., SCHEETZ, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., FOLGER, J. K.,
43 IRELAND, J. L. H., EVANS, A. C. O. Does size matter in females? An overview of the
44 impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of
45 anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the
46 ovarian reserve in cattle. **Reprod. Fertil. Dev.**, 23, 1–14, 2011.

47
48 LASKOWSKI, D., ANDERSSON, G., HUMBLLOT, P., SIRARD, M.A., SJUNNESSON, Y.,
49 FERREIRA, C.R., PIRRO, V., BAGE, R. Lipid profile of bovine blastocysts exposed to

- 1 insulin during *in vitro* oocyte maturation. **Reprod. Fertil. Dev.**, 2018 Apr 16 [Epub ahead of
2 print].
3
- 4 LONERGAN, P., FAERGE I., HYTTEL P.M., BOLAND M., FAIR T. Ultrastructural
5 modifications in bovine oocytes maintained in meiotic arrest in vitro using roscovitine or
6 butyrolactone. **Mol. Reprod. Dev.**, 64, 369–378, 2003.
7
- 8 MANICKE, N. E., WISEMAN, J. M., IFA, D. R., COOKS, R. G. Desorption electrospray
9 ionization (DESI) mass spectrometry and tandem mass spectrometry (MS/MS) of
10 phospholipids and sphingolipids: ionization, adduct formation, and fragmentation. **J. Am.
11 Soc. Mass Spectrom**, 19, 531–543, 2008.
12
- 13 MARTINEZ, M. F., SANDERSON, N., QUIRKE, L. D., LAWRENCE, S. B., JUENGEL, J.
14 L. Association between antral follicle count and reproductive measures in New Zealand
15 lactating dairy cows maintained in a pasture-based production system. **Theriogenology**, 85,
16 466–475, 2016.
17
- 18 MCEVOY, T.G., COULL, G.D., BROADBENT, P.J., HUTCHINSON, J.S.M., SPEAKE,
19 B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact
20 zona pellucida. **J. Reprod. Fert.**, 118, 163–170, 2000.
21
- 22 MOROTTI, F., SANTOS, G.M., JUNIOR, C.K., SILVA-SANTOS, K.C., ROSO, V.M.,
23 SENEDA, M.M. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in
24 beef heifers. **Theriogenology**, 91, 21–26, 2017.
25
- 26 MOROTTI, F., MORETTI, R., SANTOS, G. M. G., SILVA-SANTOS, K. C., CERQUEIRA,
27 P. H. R., SENEDA, M. M. Ovarian follicular dynamics and conception rate in *Bos indicus*
28 cows with different antral follicle counts subjected to timed artificial insemination. **Anim.
29 Reprod. Sci.**, 188, 170–177, 2018.
30
- 31 MOSSA, F., WALSH, S. W., BUTLER, S. T., BERRY, D. P., CARTER, F., LONERGAN,
32 P.; EVANS, A. C. O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated
33 with low fertility in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 95, 2355–2361, 2012.
34
- 35 PASCHOAL, D. M., SUDANO, M. J., SCHWARZ, K. R. L., MAZIERO, R. R. D.,
36 GUASTALI, M. D. G., CROCOMO, L. F., MAGALHÃES, L. C. O., MARTINS, A., LEAL,
37 C. L. V., LANDIM-ALVARENGA F. C. Cell apoptosis and lipid content of in-vitro
38 produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. **Theriogenology**, 87, 108–114,
39 2017.
40
- 41 PIRRO, V., GUFFEY, C., SEPU'LVEDA, M. S., MAHAPATRA, C. T., FERREIRA, C. R.,
42 JARMUSCHA, A. K., COOKS, R. G. Lipid dynamics in zebrafish embryonic development
43 observed by DESI-MS imaging and nanoelectrospray-MS. **Mol. BioSyst.**, 08:41:08, 2016.
44
- 45 PIRRO, V., OLIVERI, P., RAMIRES-FERREIRA, C., GONZÁLEZ-SERRANO, A. F.,
46 MACHATY, Z., COOKS, R. G. Lipid characterization of individual porcine oocytes by dual
47 mode DESI-MS and data fusion. **Anal. Chim. Acta**, 848, 51–60, 2014.
48
- 49 POLLARD, J.W. & LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos.
50 **Theriogenology**, 41, 101-106, 1994.

- 1
2 PONTES, J. H. F., MELO-STERZA, F. A., BASSO, A. C., FERREIRA, C. R., SANCHES,
3 B. V., RUBIN, K. C. P., SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and
4 pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*)
5 donors. **Theriogenology**, 75, 1640–1646, 2011.
6
- 7 POPA, O., BĂBEANU, N. E., POPA, I., NIȚĂ, S., DINU-PÂRVU, C. E. Methods for
8 obtaining and determination of squalene from natural sources. **Biomed. Res. Int.**, 2015(2):
9 367202, 2015.
10
- 11 RAZZA, E.M.; SUDANO, M.J.; FONTES, P.K.; BELAZ, F.F.; BELAZ, K.R.A.; SANTOS,
12 P.H.; ROCHA, A.C.S.; ROCHA, D.F.O.; EBERLIN, M.N.; MACHADO, M.F.; NOGUEIRA,
13 M.F.G. Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to in vitro
14 maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine cumulus–oocyte
15 complexes and blastocysts. **Reprod. Fert. Develop.**, v. 30, p. 1314-1328, 2018.
16
- 17 ROSA, C. O., MARINHO, L. S. R., DA ROSA, P. R. A., DE CESARO, M. P.,
18 LUNARDELLI, P. A., SILVA-SANTOS, K. C., BASSO, A. C., BORDIGNON, V.,
19 SENEDA, M. M. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte
20 competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. **Reprod. Dom.**
21 **Anim.**, 53, 921–929, 2018.
22
- 23 SARAGUSTY, J., ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by
24 slow freezing and vitrification. **Reproduction**, 141, 1-19, 2011.
25
- 26 SANTOS, G. M. G., SILVA-SANTOS, K. C., BARREIROS, T. R., MOROTTI, F.,
27 SANCHES, B. V., MORAES, F. L. Z., BLASCHI, W., SENEDA, M.M. High numbers of
28 antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the
29 conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, 165, 17–21, 2016.
30
- 31 SENEDA, M. M., ESPER, C. R., GARCIA, J. M., OLIVEIRA, J. A., VANTINI, R.
32 Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Anim.**
33 **Reprod. Sci.**, 67, 37– 43, 2001.
34
- 35 SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G. M. G., KOETZ JUNIOR, C., MOROTTI, F., SILOTO,
36 L. S., MARCANTONIO, T. N., URBANO, M. R., OLIVEIRA, R. L., LIMA, D. C. M.,
37 SENEDA, M. M. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In Vivo
38 – of *Bos indicus*–*taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reprod. Domest. Anim.**,
39 49, 228–232, 2014a.
40
- 41 SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G., SILOTO, L.S., SANTOS, J.T., OLIVEIRA,
42 E.R., MACHADO, F.Z., ROSA, C.O, SENEDA, M.M. The correlation between the number
43 of antral follicles and ovarian reserves (preantral follicles) in purebred *Bos indicus* and *Bos*
44 *taurus* cows. **Anim. Reprod. Sci.**, v.151, p.119–125. 2014b.
45
- 46 SILVA-SANTOS K.C., SILOTO, L. S., SANTOS, G. M. G., MOROTTI, F.,
47 MARCANTONIO T. N., SENEDA, M.M. Comparison of Antral and Preantral Ovarian
48 Follicle Populations Between *Bos indicus* and *Bos indicus*-*taurus* Cows with High or Low
49 Antral Follicles Counts. **Reprod. Domest. Anim.**, 49, 48–51, 2014c.
50

- 1 SILVA-SANTOS, K.C., FERREIRA, C.R., SANTOS, G.M.G, EBERLIN, M.N, SILOTO,
2 L.S., ROSA, C.O., MARCANTONIO, T.N., SENEDA, M.M. MALDI-MS Lipid Profiles of
3 Oocytes Recovered by Ovum Pickup from *Bos indicus* and *1/2 indicus x taurus* with High vs
4 Low Oocyte Yields. **Reprod. Domest. Anim.**, 49, 711–718, 2014d.
5
- 6 SILVA, N.C., COSTA, C.B., LUNARDELLI, P. A., FONTES, P. K., ROSA, C. O., BASSO,
7 A. C., SUDANO, M.J., NOGUEIRA, M. F. G., SENEDA, M. M. Comparison of in vitro
8 production, lipid content and gene expression of embryos from *Bos indicus* cows cultivated
9 with or without forskolin supplementation. **Anim. Reprod.**, 14 (3), 742, 2017.
10
- 11 SHIMIZU, N., ITO, J., KATO, S., OTOKI, Y., GOTO, M., EITSUKA, T., MIYAZAWA, T.,
12 NAKAGAWA, K. Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in
13 diferent compositions of squalene monohydroperoxide isomers. **Sci. Rep.**, 8, 9116, 2018.
14
- 15 STOJSIN-CARTER, A., MAHBOUBI, K., COSTA, N. N., GILLIS, D. J., CARTER, T. F.,
16 NEAL, M. S., KING, W. A. Systemic and local anti-Mullerian hormone reflects differences
17 in the reproduction potential of Zebu and European type cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, 167, 51–
18 58, 2016.
19
- 20 SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., RASCADO, T. S., MAGALHÃES, L. C.,
21 CROCOMO, L. F., DE LIMA-NETO, J. F., LANDIM-ALVARENGA, F. C. Lipid content
22 and apoptosis of in vitroproduced bovine embryos as determinants of susceptibility to
23 vitrification. **Theriogenology**, v.75, p. 1211-1220, 2011.
24
- 25 SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., MAZIERO, R. R. D., RASCADO, T. S., GUASTALI,
26 M. D., CROCOMO, L. F., MAGALHÃES, L. C. O., MONTEIRO, B. A., MARTINS JR, A.,
27 MACHADO, R., LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Improving postcryopreservation
28 survival capacity: an embryo-focused approach. **Anim. Reprod.**, 10, 160-167, 2013.
29
- 30 SUDANO, M. J., RASCADO, T. S., Tata, A, Belaz, K. R. A. Santos, V. G., Valente, R. S.,
31 Mesquita, F. S., Ferreira, C. R. Araújo, J. P., Eberlin, M. N., Landim-Alvarenga, F. D. C.
32 Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, 86, 472-484,
33 2016.
34
- 35 SUTTON-MCDOWALL, M.L., FEIL, D., ROBKER, R.L., THOMPSON, J.G., DUNNING,
36 K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine
37 preimplantation embryos. **Theriogenology**, 77, 1632-1641, 2012.
38
- 39 ZANGIROLAMO, A.F., COSTA, C.B., LUNARDELLI, P. A., PIOLTINE, E. M.,
40 CARDOSO, B. L., BASSO, A.C., NOGUEIRA, M. F. G., SENEDA, M.M. Evaluation of
41 lipid content and gene expression in bovine embryos produced in vitro treated with natriuretic
42 peptide C (NPPC). **Anim. Reprod.**, 14, 3, 737, 2017.
43
- 44 WU, L. L.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. The impact of obesity on oocytes: evidence for
45 lipotoxicity mechanisms. **Reprod. Fertil. Dev.**, 24, 29-34, 2011.
46

1 **Tabela Suplementar 1** - Valores de m/z dos íons utilizados na análise estatística, fórmula
 2 molecular, descrição dos íons e tentativa de atribuição dos íons detectados em modo positivo
 3 pela técnica de DESI-MS MS em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Abreviações: EC
 4 ésteres de colesterol e derivados; DAG. diacilgliceróis; TAG. triacilgliceróis.

Ion m/z	Descrição do íon	Tentativa de Atribuição* (C: I) ^a	Abundância relativa ≥ 92 FAs	Abundância relativa ≤ 31 FAs	Referências
686.49	[M+Ag ₂ NO ₃] ⁺	Squalene	2.32	0.65	Laskowski et al., 2018
688.41	Ag ₂ NO ₃	Squalene	3.70	1.05	González-Serrano et al., 2013
725.37	[M+Ag] ⁺	DAG (36:2)	0.4	0.55	Pirro et al., 2014
729.74		CE (16:1)	5.76	9.31	Laskowski et al., 2018
751.23		DAG (38:4)	0.26	0.91	Pirro et al., 2014
753.54		CE (18:3)	0	1.72	González-Serrano et al., 2013
755.78		CE (18:2)	3.43	3.69	Laskowski et al., 2018
757.71		CE (18:1)	6.74	10.35	Laskowski et al., 2018
779.71		CE (20:4)	3.14	1.61	Gonzalez-Serrano 2013
781.58		CE (20:3)	0.95	1.32	Gonzalez-Serrano 2013
797.70		TAG(40:2)	2.07	0.73	Laskowski et al., 2018
799.73		TAG(40:1)	4.22	1.33	Laskowski et al., 2018
803.16		CE (22:6)	0.41	0.50	González-Serrano et al., 2013
805.53		CE (22:5)	0.52	1.46	González-Serrano et al., 2013
813.30		CE (22:1)	0.58	0.36	González-Serrano et al., 2013
823.82		TAG (42:3)	1.06	0.18	Laskowski et al., 2018
827.77		TAG (42:2)	1.59	0.95	Laskowski et al., 2018
841.35		CE (24:1)	0.60	0.52	González-Serrano et al., 2013
851.78		TAG (44:3)	1.31	0.85	Laskowski et al., 2018
853.52		TAG (44:2)	0.72	0.35	Laskowski et al., 2018
881.83		TAG (46:2)	2.85	1.79	Laskowski et al., 2018
883.85		TAG (46:2)	4.67	4.61	Laskowski et al., 2018
909.80		TAG (48:2)	8.29	2.31	González-Serrano et al., 2013
911.84		TAG (48:1)	18.75	14.85	Laskowski et al., 2018
935.85		TAG (50:3)	7.99	4.55	Laskowski et al., 2018
937.83		TAG (50:2)	31.32	25.04	Laskowski et al., 2018
939.85		TAG (50:1)	63.26	68.38	Laskowski et al., 2018
961.83		TAG (52:4)	6.77	4.80	Pirro et al., 2014
963.86		TAG (52:3)	26.58	20.02	Laskowski et al., 2018
965.84		TAG (52:2)	83.53	70.95	Laskowski et al., 2018
967.86		TAG (52:1)	119.25	100	Laskowski et al., 2018
987.78		TAG (54:5)	7.58	6.96	Pirro et al., 2014
989.87		TAG (54:4)	17.24	10.07	Laskowski et al., 2018
991.86		TAG (54:3)	37.24	25.26	Laskowski et al., 2018
993.86		TAG (54:2)	60.65	54.84	Laskowski et al., 2018
995.88		TAG(54:1)	50.15	52.24	Laskowski et al., 2018
1013.64	TAG (56:4)	12.50	14.87	Pirro et al., 2014	
1015.78	TAG (56:3)	13.61	17.02	Laskowski et al., 2018	
1017.81	TAG (56:2)	12.81	11.34	Laskowski et al., 2018	
1019.87	TAG (56:1)	17.17	10.29	Pirro et al., 2014	
1037.53	TAG (58:8)	5.22	1.16	Pirro et al., 2014	
1041.68	TAG (58:6)	11.12	12.38	Pirro et al., 2014	
1106.17	[M+Ag ₂ NO ₃] ⁺	TAG(50:3)	2.16	0.56	Laskowski et al., 2018
1108.53		TAG (50:2)	5.69	3.73	Laskowski et al., 2018
1132.55		TAG (52:3)	3.47	1.25	Laskowski et al., 2018
1134.57		TAG (52: 2)	7.77	7.05	Laskowski et al., 2018
1140.51		Ubiquinone	6.20	4.64	Laskowski et al., 2018

	(Coenzyme Q10)			
1162.58	TAG (54:2)	9.17	3.37	Laskowski et al., 2018

1 *As atribuições dos lipídeos foram de acordo com pesquisas das fórmulas moleculares previstas e
2 possíveis adutos segundo González-Serrano et al., 2013, Pirro et al., 2014, Laskowski et al., 2018.

3 ^a (C:I) representa o número de átomos de carbono (C) e o número de insaturações (I) das cadeias de
4 ácidos graxos.

5

6

7

8

1 **8. CONCLUSÕES**

- 2
- 3 • O uso do diluidor (Prosemen[®]) de sêmen pós-descongelamento é eficiente na
4 inseminação artificial em tempo fixo, diminuindo o número de doses e custo por
5 prenhez. Resultando em efeito semelhante na utilização na produção *in vitro* de
6 embriões; e
- 7 • A adição do Peptídeo Natriurético C não aumentou a taxa de blastocistos, entretanto
8 foi observado maior expressão do gene REST (Fator de Transcrição Silenciador)
9 relacionado a pluripotência e desenvolvimento embrionário na suplementação de 150
10 nM de Peptídeo Natriurético tipo C (NPPC) na maturação *in vitro*, demonstrando uma
11 potencialidade de melhora na eficiência da técnica; e
- 12 • A quantidade de folículos antrais influencia o perfil lipídicos dos embriões *Bos taurus*
13 *indicus* produzidos *in vitro*, sendo que as vacas com maior quantidade de folículos
14 antrais (≥ 92) possuem maior conteúdo lipídico da categoria dos triacilglicerídeos
15 (TAG), que está significativamente associado a danos em organelas celulares.
16

9. ANEXOS

Os seguintes artigos foram realizados durante o período do doutorado:

1) ROSA, C.O.; MARINHO, L. S. R.; ROSA, P. R. A.; CESARO, M. P.; LUNARDELLI, P. A.; SILVA-SANTOS, K.C.; BASSO, A. C.; BORDIGNON, V.; SENEDA, M. M. Molecular characteristics of granulosa and cumulus cells and oocyte competence in Nelore cows with low and high numbers of antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 921–929, 2018.

2) MOROTTI, F.; ZANGIROLAMO, A. F.; SILVA, N. C.; SILVA, C. B.; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. **Animal Reproduction**, v. 14, p. 514-520, 2017.

3) LUNARDELLI, P. A.; MARINHO, L. S. R.; ROSA, C. O.; ALFIERI, A. A.; SENEDA, M. M. Effect of follicular diameter, time of first cleavage and H3K4 methylation on embryo production rates of *Bos indicus* cattle. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**, v. 37, p. 3189, 2016.

4) 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 or × Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 807-811, 2015.

Os seguintes capítulos de livro foram realizados durante o período do doutorado:

1) MOROTTI, F.; ROSA, C.O.; SILVA-SANTOS, K.C. Male Reproductive Physiology: Concepts and Advances. In: Marcelo Marcondes Seneda, Katia Cristina Silva-Santos, and Luciana Simões Rafagnin Marinho. (Org.). **Biotechnology of Animal Reproduction**. 1ed. New York: Nova Science Publishers, 2016, v.1, p. 27-46.

2) MELO-STERZA, F.A.; CARDOSO, C.J.T.; ROSA, C.O.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M. M. In Vivo Embryo Production in Cattle. In: Marcelo Marcondes Seneda, Katia Cristina

- 1 Silva-Santos and Luciana Simões Rafagnin Marinho. (Org.). **Biotechnology of Animal**
2 **Reproduction**. 1ed. New York: Nova Science Publishers, 2016, v.1, p. 133-156.
3
- 4 3) MARINHO, L.S.R.; LUNARDELLI, P.A.; ROSA, C.O.; SARAPIAO, F.D.; SENEDA, M.
5 M. Large-Scale in vitro Embryo Production as a Tool to Improve Animal Breeding. In: Leon
6 V. Berhardt. (Org.). **Advances in Medicine and Biology**. 1ed. New York: Nova Science
7 Publishers, 2015, v. 85, p. 40-50.