

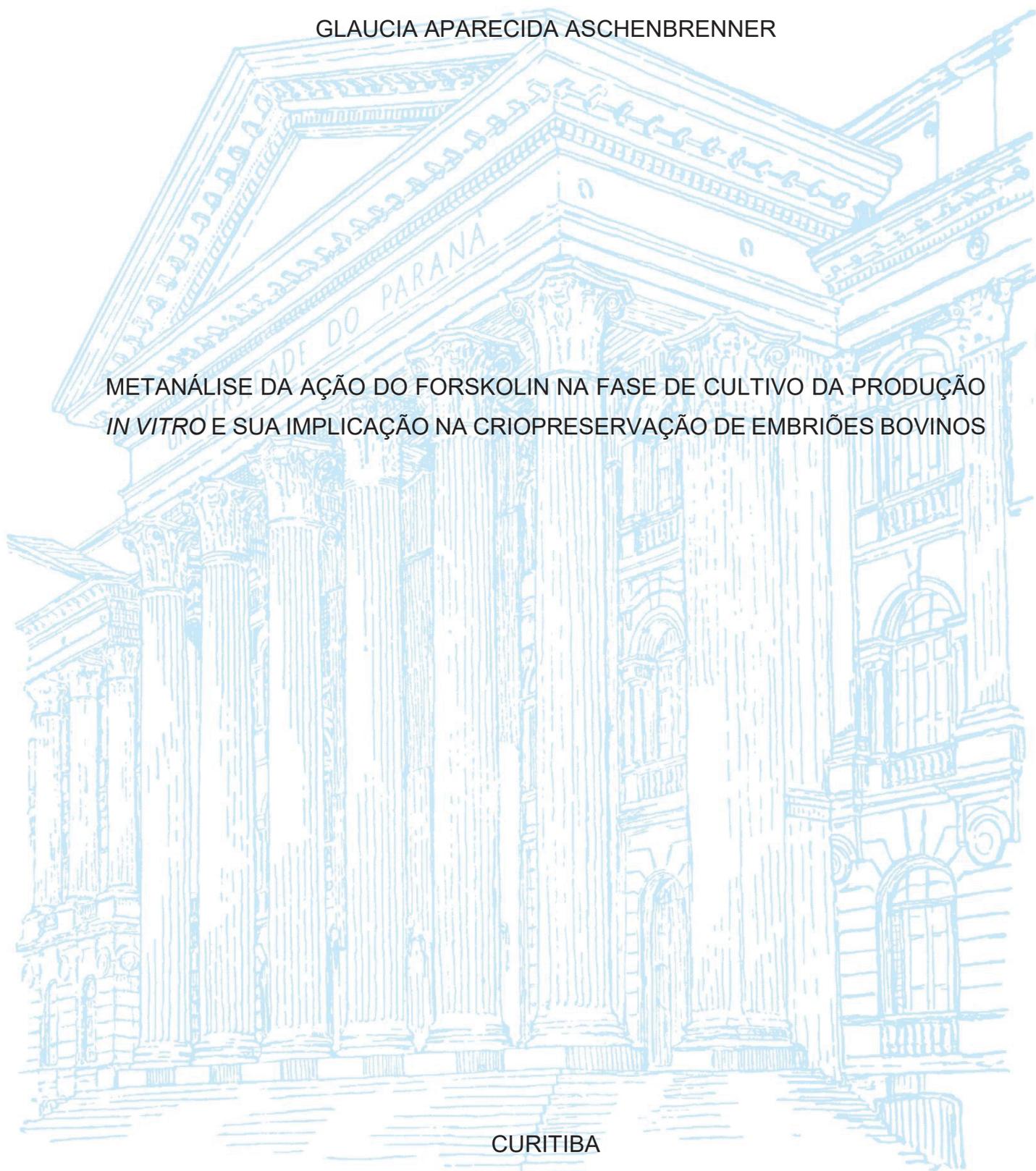
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GLAUCIA APARECIDA ASCHENBRENNER

METANÁLISE DA AÇÃO DO FORSKOLIN NA FASE DE CULTIVO DA PRODUÇÃO
IN VITRO E SUA IMPLICAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

CURITIBA

2022



GLAUCIA APARECIDA ASCHENBRENNER

METANÁLISE DA AÇÃO DO FORSKOLIN NA FASE DE CULTIVO DA PRODUÇÃO
IN VITRO E SUA IMPLICAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA

Aschenbrenner, Glaucia Aparecida

Metanálise da ação do forskolin na fase de cultivo da produção *In vitro* e sua implicação na criopreservação de embriões bovinos. / Glaucia Aparecida Aschenbrenner. – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss.

1. Fertilização in vitro. 2. Bovinos - reprodução. 3. Embriologia veterinária. I. Weiss, Romildo Romualdo. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação Ciências Veterinárias. III. Título.

Bibliotecário: Douglas Alex Jankoski CRB 9/1167



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GLAUCIA APARECIDA ASCHENBRENNER** intitulada: **Metanálise da ação do forskolin na fase de cultivo da produção in vitro e sua implicação na criopreservação de embriões bovinos.**, sob orientação do Prof. Dr. ROMILDO ROMUALDO WEISS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Junho de 2022.

Assinatura Eletrônica

06/07/2022 16:16:44.0

ROMILDO ROMUALDO WEISS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

04/07/2022 07:28:34.0

FERNANDO ANDRADE SOUZA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

07/07/2022 08:28:21.0

TÁCIA GOMES BERGSTEIN GALAN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: cpgcv@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 201321

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prgp.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 201321

Dedico este trabalho ao meu pai Jacson
Luís Aschenbrenner (*in memoriam*), guardo na
memória seu carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, pela proteção durante toda minha trajetória, por guiar minhas escolhas e por todos os encontros e oportunidades que me trouxeram até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss, que me permitiu fazer parte de sua equipe de pesquisa.

A professora Dra. Tácia que me ajudou com calma e paciência, cedeu seu tempo para me auxiliar na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Andrade que me auxiliou nessa caminhada durante a pós-graduação.

À minha mãe, a quem eu tanto amo, a quem dedico todas as minhas conquistas. Tudo o que sou e possuo hoje é reflexo de seus ensinamentos, cuidados, sacrifícios. Serei eternamente grata.

Ao meu pai, que nos deixou durante este período (*in memoriam*), por me ensinar a amar as coisas simples da vida. Agradeço imensamente.

À minha querida amiga de trabalho no programa de pós-graduação: Natalia Siqueira de Lara por toda imprescindível ajuda, conselhos, ensinamentos e carinho. Com certeza, uma grande amizade foi construída.

Ao meu companheiro de vida Artur Fleith Couto por todo carinho, paciência e compreensão. Seu apoio foi fundamental nessa conquista.

A todos meus familiares e amigos que me apoiaram ao longo desta trajetória, por todo o carinho, apoio.

À pós-graduação, especialmente aos professores por me guiarem e serem exemplo de profissionais. Agradeço imensamente por todas as oportunidades, pela confiança, orientação e dedicação. Aos senhores o meu sincero agradecimento.

A todos os animais que possibilitaram meu aprendizado e conduziram minha evolução profissional e pessoal.

À minha querida casa durante esses sete anos, Universidade Federal do Paraná, por me proporcionar uma formação acadêmica de qualidade.

À Capes pela bolsa de estudos.

*“Conta certa lenda, que estavam duas crianças patinando num lago congelado.
Era uma tarde nublada e fria, e as crianças brincavam despreocupadas.
De repente, o gelo quebrou e uma delas caiu, ficando presa na fenda que se formou.
A outra, vendo seu amiguinho preso, e se congelando, tirou um dos patins e começou a golpear o
gelo com todas as suas forças, conseguindo por fim, quebrá-lo e libertar o amigo.
Quando os bombeiros chegaram e viram o que havia acontecido, perguntaram ao menino:
- Como você conseguiu fazer isso? É impossível que tenha conseguido quebrar o gelo, sendo tão
pequeno e com mãos tão frágeis!
Nesse instante, um ancião que passava pelo local, comentou:
- Eu sei como ele conseguiu.
Todos perguntaram:
- Pode nos dizer como?
- É simples: - respondeu o velho.
- Não havia ninguém ao seu redor para lhe dizer que não seria capaz”*

Albert Einstein

RESUMO

O forskolin eleva as concentrações de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) por meio da ativação da adenilato ciclase, induzindo lipólise química em embriões produzidos *in vitro* (PIV). Este componente vem sendo utilizado no cultivo *in vitro* como alternativa para a melhoria da criotolerância e, conseqüentemente, melhoria dos resultados de gestações no campo. Essa revisão sistemática e metanálise possui o objetivo de levantar informações sobre às técnicas de produção *In vitro* de embriões e criopreservação, além disso, fazer um levantamento sobre a concentração do Forskolin para melhorar a qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) e congelados.

Palavras-chave: Delipidação; Criotolerância; Fertilização *in vitro*.

ABSTRACT

Forskolin elevates cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentrations through the activation of adenylate cyclase, inducing chemical lipolysis *in vitro* produced embryos (IVP). This component has been used *in vitro* cultivation as an alternative to improve cryotolerance and consequently improve the results of pregnancies in the field. This literature review aimed to raise information on *in vitro* embryo production and cryopreservation techniques, in addition to surveying the use of Forskolin, concentration and time, to improve the quality of bovine embryos produced *in vitro* (IVP) and frozen.

Keywords: Delipidation; Cryotolerance; *In vitro* fertilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula química Forskolin	28
Figura 2 - QUOROM diagrama de fluxo de instrução que ilustra a seleção de ensaios incluídos na metanálise.....	42
Figura 3 - Forest plot considerando concentração de 10 μ M	46
Figura 4 - Forest plot considerando concentração de 5 μ M	47

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina
- ATP – Trifosfato de adenosina
- CIV – Cultivo *In vitro*.
- CLA - Ácido linoléico conjugado
- CO₂ – Dióxido de Carbono.
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EG – Etilenoglicol.
- FIV – Fecundação *In vitro*.
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante.
- GLY – Glicerol.
- LH – Hormônio Luteinizante.
- MCI – Massa Celular Interna.
- MII – Metáfase II.
- MIV – Maturação *In vitro*.
- N₂ – Nitrogênio.
- O₂ – Oxigênio.
- OPU – *Ovum Pick Up*
- PIV – Produção *In vitro*.
- PIVE – Produção *In vitro* de Embriões.
- PLCZ – *1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase zeta-1*
- RNA – Ácido ribonucleico
- ROS – *Reactive oxygen species*
- SFB: Soro Fetal Bovino.
- SOF - *Synthetic Oviductal Fluid*
- SUC – Sacarose
- TAG – triacilglicerol
- ZP – Zona pelúcida
- PG – Propilenoglicol
- PES – Etossulfato de fenazina
- NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

LISTA DE SÍMBOLOS

μl - Microlitros

μM – Micromolar

ng – Nanogramas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	16
2.1.1 MATURAÇÃO OOCITARIA.....	16
2.1.2 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	17
2.1.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	18
2.2 DIFERENÇAS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	19
2.3 GORDURAS NO METABOLISMO EMBRIONÁRIO.....	21
2.4 ACÚMULO DE LIPÍDEOS INTRACITOPLASMÁTICOS (LI).....	22
2.5 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES	23
2.6 DELIPIDAÇÃO CELULAR.....	26
2.7 FORSKOLIN.....	27
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS	31
CAPITULO 2	39
AÇÃO DO FORSKOLIN NA FASE DE CULTIVO DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> E SUA IMPLICAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS: METANÁLISE	39
RESUMO	38
ABSTRACT	39
INTRODUÇÃO	40
MÉTODO	41
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO

A Produção *in vitro* de embriões consolidou-se como a técnica de eleição para a produção de embriões bovinos, respondendo pelo maior percentual dos embriões produzidos não apenas em raças zebuínas de corte, mas também nos demais segmentos (VIANA et al., 2018). No ano de 2017, nos registros da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), o total de embriões produzidos *in vitro* ultrapassou aqueles gerados *in vivo* 992.289 vs. 406.287, respectivamente. A disponibilidade de sêmen sexado, a partir de meados do ano de 2005, associado a progressiva melhora na eficiência da PIVE, impulsionaram sua adoção (VIANA et al., 2018).

Apesar dessas melhorias observadas nos últimos anos, essa biotecnologia ainda apresenta limitações quanto à taxa de produção de blastocistos e a criopreservação de embriões, visto que, tais embriões são de qualidade inferior aos produzidos *in vivo*, em razão das condições de produção *in vitro* ainda não poderem simular perfeitamente o ambiente natural (LONERGAN e FAIR, 2008).

A baixa eficácia dos processos de criopreservação de embriões *in vitro* pode estar relacionada a diversos fatores, como a alta concentração de lipídios presentes em embriões *in vitro* em comparação com embriões *in vivo* (CAMARGO et al., 2011); os meios utilizados para cultivo *in vitro*, como o soro fetal bovino (SFB) (SULDANO et al., 2011); e as diferenças no metabolismo celular dos embriões produzidos *in vitro* (COSTA et al., 2019)

Sendo assim, a extensão da crioinjúria depende do tamanho e da forma das células embrionárias, bem como da permeabilidade da membrana e da qualidade e sensibilidade dos embriões (SANCHES et al., 2013). Ou seja, os lipídios intracitoplasmáticos afetam a taxa de viabilidade de embriões após o descongelamento. O conteúdo de lipídios nos embriões de ruminantes é bastante alto no estágio inicial e diminui no estágio de blastocisto, resultando em uma redução na criotolerância em embriões em estágio inicial em comparação com os blastocistos (PANYABORIBAN et al., 2018).

A delipidação é um método para diminuir o conteúdo de lipídios dentro dos embriões, melhorar a taxa de desenvolvimento de embriões criopreservados até o estágio de blastocisto e aumentar o total de células. Atualmente, várias técnicas de delipidação, incluindo micromanipulação, centrifugação e delipidação química, têm sido estudadas (PANYABORIBAN et al., 2018).

Desta maneira, como alternativa de delipidação química, o uso do Forskolin tem sido usado em meios de cultura, a fim de aumentar a criotolerância e a qualidade pós-criopreservação dos embriões. O Forskolin (7 β -acetoxi-8,13-expoxi-1 α , 6 β , 9 α -trihidroxi-Labd-14-en-11-ona C₂₂H₃₄O₇) é um diterpeno e um importante ativador da adenilato ciclase, a enzima responsável por elevar os níveis de AMPc intracelular, que consequentemente ativa a proteína quinase responsável pela ação da lipase nas células (PASCHOAL et al., 2017). A utilização deste composto tem o intuito de melhorar a qualidade dos embriões após os processos de criopreservação de embriões *in vitro*.

Portanto, o objetivo deste capítulo foi fazer uma revisão de literatura sobre a produção *in vitro* de embriões e a utilização de delipidadores para melhora na criotolerância de embriões bovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO*

Os primeiros embriões produzidos *in vivo* no Brasil datam da década de 1980 e, no final da década de 90 o país já estava consolidado na produção *in vivo* pela transferência de embriões. No entanto, a produção *in vitro* no país ainda era restrita às instituições de pesquisa, e para fins científicos. Os primeiros nascimentos de bezerros oriundos de embriões produzidos *in vitro* (PIVE) foram registrados no início da década de 90, por grupos de pesquisa da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (GONÇALVES E VIANA, 2019).

Em contraste, na mesma época a PIVE já era um mercado emergente na Europa, Ásia e Oceania, impactando nos totais mundial e permitindo que, em 1997, se ultrapassasse a barreira dos 400.000 embriões produzidos (360.656 *in vivo* e 41.632 *in vitro*) (GONÇALVES E VIANA, 2019).

Atualmente, o mercado mundial de embriões está mudado. A produção total aumentou 197.8% (402.288 em 1997 vs. 1.198.048 em 2007). Além disso, a atividade migrou da Europa para as Américas, e a produção de embriões *in vitro* tornou-se um elemento chave para a posição relativa do Brasil no cenário mundial.

Em 2007 o país já era o maior produtor de embriões bovinos *in vitro*, com 48% do total mundial (211.443/434.581), e foi o maior responsável pelo crescimento de 10,5 vezes observado nesse segmento em relação a 1997 (VIANA, et al. 2012). Paralelamente, observou-se um crescimento significativo na PIVE na América do Norte e Europa nos últimos anos (VIANA et al., 2018). Ainda assim, o Brasil segue como referência no uso da PIVE, respondendo por 34,8% da produção global (VIANA, 2018).

Sendo assim, a produção *in vitro* de embriões envolve três etapas: (a) maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos imaturos, (b) fertilização *in vitro* (FIV) de ovócitos maturados, e (c) cultivo *in vitro* (CIV) de presumíveis zigotos

2.1.1 MATURAÇÃO OOCITARIA

Para a obtenção de ovócitos imaturos para a PIVE podemos lançar mão da aspiração folicular transvaginal (*Ovum Pick Up* - OPU) *in vivo*, ou da coleta de ovários

de abatedouro, principalmente para pesquisa. A origem folicular do oócito e a sua qualidade ou competência tem influência significativa sobre o potencial de desenvolvimento *in vitro* e sobre o nascimento de um descendente saudável (DUNNING et al., 2017).

A maturação oocitária é o processo pelo qual o oócito adquire competência para fertilização e desenvolvimento embrionário. Essa fase se inicia antes do nascimento da mãe. Ao nascimento da bezerra, o ovário possui folículos primordiais tendo o oócito parado na meiose na fase diplóteno da prófase I. Nesta fase, ocorre a regulação da síntese de proteínas, concomitante com a formação de organelas como: mitocôndrias, ribossomos, grânulos corticais e vesículas contendo fontes energéticas, diferenciando a célula em um gameta funcional. A retomada desta primeira meiose só será concluída ao início da vida reprodutiva do animal, durante a puberdade, com estimulação hormonal. O pico de LH pré-ovulatório, reinicia o processo meiótico adormecido, progredindo até a meiose II, quando acontece a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Nesta última fase ocorrem modificações nucleares e citoplasmáticas que irão, em conjunto, resultar na formação de um gameta com capacidade de ser fertilizado (LANDIM-ALVARENGA et al., 2006).

2.1.2 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

A fecundação *in vitro* ocorre através da incubação de oócitos maduros com espermatozoides capacitados, após a fusão das membranas e o emparelhamento dos pró-núcleos feminino e masculino, origina-se o zigoto (OLIVEIRA et al., 2014)

In vivo, para que ocorra a fecundação, o espermatozoide precisa percorrer o trato reprodutivo da fêmea até o oviduto ao encontro do oócito. Durante esse trajeto, os espermatozoides sofrerão modificações estruturais e bioquímicas, capacitação, tornando-se aptos à fecundação (GEORGADAKI et al., 2016). A capacitação ocorre quando o espermatozoide entra em contato com o fluido uterino onde há moléculas que desencadeiam as reações. Essas moléculas fazem seleção, maturação e manutenção na motilidade espermática (OKABE et al, 2018).

In vitro, tenta-se mimetizar este processo. A seleção espermática, etapa cujo objetivo é separar células moveis das não moveis, remover diluidores e crioprotetores utilizados na criopreservação deste sêmen, é feita, normalmente, através de gradientes específicos ou técnica de *swin-up*. Já a capacitação espermática é feita

por substâncias como a heparina, glicose, albumina sérica bovina e o bicarbonato (PARRISH et al., 2014).

Ao entrar em contato com o oócito, na presença de cálcio extracelular, o espermatozoide capacitado se liga aos receptores presentes na zona pelúcida e sofre a reação acrossômica, com liberação de enzimas proteolíticas que digerem a zona pelúcida do oócito, determinada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal (FLÉCHON et al., 2016).

Uma vez fecundado, são liberados o material genético, organelas do gameta masculino e moléculas de transcrição. Uma dessas organelas é o centríolo, de origem exclusiva paterna, é fundamental para as futuras divisões celulares do zigoto (INOUE et al., 2018). O material genético será descompactado e será formado o pró-núcleo masculino (SATHANATHAN et al., 2013). Já para formação do pró-núcleo feminino e liberação do segundo corpúsculo polar faz-se necessário reiniciar a divisão celular que estava parada em meiose II. Esse processo é desencadeado pela fosfolipase C zeta (PLCZ), molécula presente no espermatozoide (SANDERS e SWANN, 2016). Simultaneamente, ocorre o influxo de Ca^{+} , também desencadeado pela PLCZ, despolarizando a membrana plasmática, tornando-a rígida e evitando a polispermia (INOUE et al., 2018).

2.1.3 CULTIVO *IN VITRO*

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto expandido ou eclodido. Durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (HOSHI et al., 2003)

Esse desenvolvimento embrionário pode ser dividido em dois momentos: inicial e tardio. Na fase inicial os embriões realizam poucas transcrições, utilizando proteínas e RNA materno. Já a fase tardia começa após ativação no genoma embrionário, também chamado de transição materno-zigótica, quando o embrião começa a traduzir o próprio genoma. Em bovinos essa transição acontece com 8 a 16 blastômeros (GRAF et al., 2014; JIANG et al., 2014).

A formação destes blastômeros se dá através das clivagens embrionárias e a velocidade das clivagens interfere na qualidade do embrião, visto que, foi observado que blastocistos que sofreram clivagens iniciais rápidas tinham taxa de apoptose inferior aos de clivagens lentas, e contrapartida maior taxa de bloqueio embrionário (GARCIA et al., 2015).

Alterações neste ambiente de cultivo podem comprometer as etapas de clivagem, ativação do genoma embrionário no estágio de oito a 16 células, compactação da mórula e formação de blastocisto entre os dias seis e sete após a FIV (LONERGAN et al., 2003). O meio base de cultivo com melhores resultados de desenvolvimento embrionário é o *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF), desenvolvido com base no fluido do oviduto de ovelhas, podendo conter ou não Soro Fetal Bovino (SFB), a adição do SFB é um fator importante no cultivo *in vitro* de embriões bovinos por acelerar o desenvolvimento de mórula e blastocisto (MACHATY et al., 2012).

No entanto, a adição de SFB tem sido apontada como o principal responsável pelas diferenças morfológicas e fisiológicas em embriões PIV, como por exemplo, o aumento no número e tamanho dos grânulos lipídicos (RIZOS et al., 2003).

O tempo de cultivo *in vitro* varia de 7-9 dias dependendo do objetivo, normalmente controla-se a temperatura a 38 °C, e varia-se a atmosfera entre baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) ou alta tensão de oxigênio (5% de CO₂, em ar (20% de O₂)). A avaliação da taxa de formação de blastocisto para transferência ou criopreservação é realizada rotineiramente no dia 7. Para taxas de eclosão as avaliações podem ser feitas até o dia 9. A eclosão é um processo onde a zona pelúcida (ZP) se rompe liberando o blastocisto eclodido antes da implantação. É um fator importante para avaliar a qualidade do embrião (BELAKIER et al., 2012), assim como o número de células nos blastocistos pode ser um indicador importante da sua qualidade e implantação (DU QY et al., 2016)

2.2 DIFERENÇAS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Apesar de blastocistos bovinos serem produzidos com algum sucesso sob uma ampla gama de condições de cultivo *in vitro*, a PIV em seu estado atual de desenvolvimento claramente fornece condições abaixo do ideal. É esperado que embriões PIV possuam qualidade inferior aos produzidos *in vivo*, pois as condições de PIV não conseguem simular perfeitamente ao ambiente encontrado *in vivo*

(LONERGAN & FAIR, 2008). Algumas das principais limitações estão relacionadas com anormalidades morfológicas e metabólicas do embrião PIV, que os tornam mais sensíveis a criopreservação, visto que, a qualidade é influenciada por vários fatores incluindo: tempo, temperatura, composição dos meios de cultura e o oxigênio (VERMA et al., 2018)

Sabe-se que os embriões possuem as células embrionárias trofoblásticas, e entre estas células existem junções comunicantes tanto nos embriões PIV como nos embriões produzidos *in vivo* (BONI et al., 1999). No entanto, estas aparecem em maior número em embriões produzidos *in vivo*. Em função disso, os embriões produzidos *in vivo* apresentaram uma melhor comunicação entre seus blastômeros quando comparados aos embriões PIV. Abe et al. (1999) também observaram que os embriões PIV apresentam microvilosidades mais curtas e menos numerosas; espaço perivitelínico mais estreito contendo fragmentos e debris celulares; zona pelúcida (ZP) mais fina e com uma camada externa mais porosa; e maior quantidade de gotas lipídicas citoplasmáticas em relação aos embriões produzidos *in vivo* (PASCHOAL et al., 2014).

Estas diferenças parecem ser agravadas ou minimizadas conforme o tipo de cultivo utilizado. Embriões bovinos fertilizados *in vitro*, mas cultivados *in vivo* tiveram a mesma criotolerância que os embriões produzidos inteiramente *in vivo*. Já os embriões produzidos inteiramente em placa apresentaram menor criotolerância (LONERGAN et al., 2003), sugerindo que a redução na criotolerância parece estar associada às alterações nas condições do cultivo embrionário. (PASCHOAL et al., 2014)

Com relação aos baixos índices de embriões PIV, pode-se dizer que um dos fatores agravantes é o soro fetal bovino (SFB) presente em quase todos os meios de cultivo *in vitro* (CIV) e é bem provável que esse SFB aumente o lipídio citoplasmático, influenciando na qualidade dos embriões e reduzindo sua sobrevivência após a criopreservação. Como é quase impossível de produzir embrião na ausência total desta proteína, que é um fator importante no CIV de embriões bovinos, pois este acelera o desenvolvimento de mórula e blastocisto, uma alternativa seria modificar as condições de cultivo (MEN et al., 2006; PASCHOAL et al., 2012; Paschoal et al, 2015).

2.3 GORDURAS NO METABOLISMO EMBRIONÁRIO

Os lipídios são biomoléculas essenciais das células, como um componente da membrana plasmática, eles também estão diretamente envolvidos na transdução de sinal como mediadores de lipídios, incluindo fosfatidilinositóis, esfingolipídios e eicosanoides. Lipídios também desempenham papéis importantes em uma série de processos biológicos essenciais, incluindo proliferação celular, migração, diferenciação, quimiotaxia, pinocitose sobrevivência e alterações metabólicas. Lipídios potencialmente servem como moléculas de sinalização que ajudam a coordenar eventos fundamentais durante o desenvolvimento embrionário, sua implantação e crescimento pós-implantação (SUDANO et al., 2016)

Normalmente, durante o desenvolvimento embrionário inicial o metabolismo energético é baixo, a partir da ativação do genoma embrionário esta demanda aumenta e atinge seu pico durante a blastulação, em função da intensificação na síntese proteica e atividade dos sistemas de transportes de íons, sendo assim, faz-se necessário maior aporte de adenosina trifosfato (ATP). O principal substrato para produção desta energia vem da acetilcoenzima A proveniente do metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos graxos (THOMPSON et al., 2000).

Os principais lipídios fornecedores de energia às células são os triacilgliceróis (TAG), cerca de 95% desta energia provem dos três ácidos graxos. Os triacilgliceróis são os mais abundantes no citoplasma das células dos mamíferos e estão armazenados na forma de gotículas. Esses lipídios têm como principal função o armazenamento de energia para oócitos e embriões durante os processos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, através da oxidação dos ácidos graxos para produção de ATP (AARDEMA et al., 2011).

Os TAG são metabolizados primeiramente pela lipase, ela atua liberando o grupamento glicerol, este é fosforilado pela glicerol-cinase e origina o glicerol-3-fosfato que é oxidado a diidroxiacetona-fosfato. Então, a triose-fosfato-isomerase age convertendo-a em gliceraldeído-3-fosfato que é oxidado na glicólise. Já os ácidos graxos serão oxidados nas mitocôndrias (NELSON e COX, 2018).

Para que os ácidos graxos sejam oxidados, é necessário que sejam convertidos em uma forma ativada (acil graxo-coA) pela enzima acil-coA-sintetase, produzindo uma acil graxo-coA, AMP e pirofosfato. Este acil graxo-coA é transportado para dentro da mitocôndria ligado ao grupo hidroxil da carnitina (NELSON e COX,

2018). Dentro da mitocôndria, a carnitina-acil-transferase II regenera o acil graxo-coA, liberando a carnitina (DUNNING et al., 2012; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012). Então, esse ácido graxo será beta-oxidado, ou seja, os ácidos graxos sofrem ciclos de remoção oxidativa da sua cadeia carbonada, gerando moléculas de acetil-coA. Quando se trata de cadeias ímpares de ácidos graxos, o último ciclo irá gerar uma de acetil-coA (2 carbonos) e uma molécula de 3 carbonos chamada de propionil-coA, que será oxidada em succinil-coA a qual é utilizada no ciclo de Krebs e cadeia respiratória (NELSON e COX, 2018).

Há uma variação muito grande na quantidade e tipo de ácidos graxos que compõe os lipídios presentes nos oócitos e embriões das diferentes espécies. Uma das hipóteses adotadas para explicar a quantidade de lipídios nos oócitos e embriões é de que quanto maior for o tempo entre a ovulação e a implantação embrionária, mais energia para sua manutenção é necessária, dessa forma a quantidade de lipídio acumulado seria maior nestas espécies (STURMEY et al., 2012). Oócitos e embriões murinos contém pouca quantidade de lipídios (LOEWENSTEIN e COHEN, 1964), e os felinos, caninos (GURAYA, 1965), suínos, bovinos e ovinos (MCKEEGAN e STURMEY, 2012) apresentam grande acúmulo lipídico em seus oócitos e embriões.

Durante a oogênese, desde a progressão do folículo primordial até o estágio de metáfase II ocorrem muitas modificações, envolvendo períodos de crescimento e de alterações nucleares e citoplasmáticas, havendo vários momentos em que os oócitos podem acumular esses lipídios afim de manter a produção de energia (STURMEY et al., 2009).

2.4 ACÚMULO DE LIPÍDEOS INTRACITOPLASMÁTICOS (LI)

A produção de energia via metabolização de carboidratos pelos oócitos e embriões é bem conhecida. Porém, os embriões em pré-compactação têm pouca capacidade de utiliza-la (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012). Além disso, a oxidação completa de uma molécula de glicose produz cerca de 30 moléculas de ATP. Em contrapartida a oxidação completa do ácido graxo palmitato, por exemplo, gera 106 moléculas de ATP (DUNNING et al., 2012). Após a maturação, a quantidade de lipídios se mantém estável durante a fertilização até a fase embrionária de oito células. No entanto, o elevado conteúdo de lipídios acumulados durante o cultivo *in vitro* atribui

menor criotolerância aos embriões, o que dificulta a criopreservação e, conseqüentemente, sua comercialização (SUDANO et al., 2016).

Durante o cultivo *in vitro* o metabolismo de lipídeos apresenta marcada influência no desenvolvimento, qualidade e na morte celular dos embriões. Sabe-se que embriões cultivados em atmosfera com baixa tensão de oxigênio (5%) ou na ausência de soro fetal bovino apresentam alteração de fosfatidilcolinas (fosfolípido constituinte de membrana celular) e maiores concentrações de ácido oleico (FERREIRA et al., 2009). Blastocistos bovinos obtidos *in vivo* apresentam concentração em torno de $33 \pm 0,70$ ng de triglicerídeos, valores que são semelhantes aos de embriões cultivados sem SFB. Embriões cultivados na presença de soro fetal (10%) no estágio de quatro até oito-células tem concentração aproximada de 34 ng. No entanto, há um incremento do estágio de oito-células até blastocisto eclodido (Be) atingindo concentração de $62 \pm 1,14$ ng (HONNOR et al., 1985).

Os mecanismos que explicam esse aumento não estão completamente elucidados, mas há a hipótese de internalização das lipoproteínas presentes no SFB pelas células embrionárias (ABE e HOSH, 2003); a presença do soro durante o cultivo alteraria a β -oxidação em função de uma alteração da função mitocondrial (CROSIER et al., 2001; ABE et al., 2002); e o embrião seria induzido a realizar uma neo-síntese de triglicerídeos em função da presença do soro (PASCHOAL et al., 2014).

Os níveis de lipídios citoplasmáticos observados em embriões PIV podem também estar relacionados com a quantidade e qualidade de mitocôndrias existentes nos blastômeros. De acordo com Crosier, et al. (2001), o aumento dos grânulos lipídicos está diretamente associado a uma redução no número de mitocôndrias maduras. Esta afirmativa foi confirmada por Abe et al. (2002) que observaram que embriões cultivados na presença de SFB, apresentaram um acúmulo de mitocôndrias imaturas juntamente com um excessivo aumento de gotas lipídicas. Tal associação seria explicada pela incapacidade destas mitocôndrias em metabolizar normalmente os lipídios. (PASCHOAL et al., 2014).

2.5 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

A criopreservação de embriões tem sido uma ferramenta muito útil para embriologia, desde o seu primeiro sucesso com embriões de camundongo em 1972 (WHITTINGHAM et al., 1972). Contudo, o primeiro animal nascer após o transplante

de embriões congelados e descongelados foi um bezerro (WILMUT e ROWSON, 1973). Esta tecnologia é o melhor método para a preservação a longo prazo de recursos genéticos animais. O uso de criopreservação também é essencial para realização da transferência de embriões com reduzido custo, evitando problemas de bem-estar animal e com um risco mínimo de transmissão de doenças. A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células por tempo indeterminado (SARAGUSTY E ARAV, 2011).

Atualmente, existem dois métodos de criopreservação de gametas: congelamento lento e vitrificação. O congelamento lento tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, que estão associadas a toxicidade química e choque osmótico. A vitrificação é um método rápido, que reduz a sensibilidade ao resfriamento e os danos de cristalização causados às células (ARAV et al., 2014)

Por muitos anos o congelamento lento foi o método de escolha para a criopreservação de embriões no lugar da vitrificação. Isso ocorreu porque a vitrificação necessitava altas concentrações de crioprotetores e amostras de volume relativamente altas (ARAV et al., 2014). Conforme foi desenvolvido o método “tamanho mínimo de gota”, tamanho mínimo que mantinha os oócitos ou embriões sem danos devido à dessecação, passaram a usar os métodos de vitrificação. O volume usado para a vitrificação ficou na faixa de 0,07 μ L (70 nL) e a concentração da solução de vitrificação foi cerca de 50% menor para vitrificação de grande volume (ARAV et al., 2014).

A vitrificação pode ser dividida em duas categorias: técnicas de superfície e técnicas de tubulação. Cada um desses dois grupos tem suas vantagens específicas. Nos métodos de superfície, pode ser controlado o tamanho da gota, uma alta taxa de resfriamento é obtida porque esses sistemas são abertos e há uma exposição direta às soluções de aquecimento. Já nos sistemas de tubulação existe a vantagem de atingir altas taxas de resfriamento em sistemas fechados, tornando-os mais seguros e fáceis de manusear. A diminuição do volume vitrificado e o aumento da taxa de resfriamento permitem uma diminuição moderada na concentração de crioprotetores de forma a minimizar seus efeitos tóxicos e osmóticos (YAVIN et al., 2009).

Além das injúrias causadas pela técnica, existem diferenças consideráveis de eficiência dependendo do estágio, espécie e origem (produzido *in vivo* ou *in vitro*). O

sucesso da criopreservação depende muito da qualidade dos blastocistos. Embriões classificados como grau I ou II apresentam alterações ultra estruturais leves após criopreservação. Atualmente existem dificuldades de criopreservação devido à baixa criotolerância do embrião PIV. Os embriões PIV apresentam maior sensibilidade à criopreservação que embriões *in vivo*. A média de concepção e nascimentos de ovócitos e embriões vitrificados é menor do que não vitrificados. A maior perda ocorre antes dos 45 dias de gestação devido principalmente à crioinjúria sofrida pelos embriões durante o processo de congelamento e reaquecimento (DIESEL, 2018)

De fato a criopreservação causa danos às células como: fraturas do citoesqueleto, alterações ultra estruturais decorrentes de desorganização de filamentos de actina; alteração na distribuição de organelas, incluindo áreas sem organelas citoplasmáticas e complexo de Golgi localizado longe do núcleo; alteração do padrão de distribuição e atividade mitocondrial; presença de grandes vesículas; diminuição de junções intercelulares; atraso na retomada de síntese de proteínas; mudanças nos níveis de expressão gênica; danos no DNA e alteração no “*imprinting*” gênico. Estas crioinjúrias podem indicar estresse oxidativo adicional durante a criopreservação (DIESEL, 2018).

Os fatores que são suspeitos de comprometer a criotolerância de embriões resultante dos procedimentos de PIV pode ter sua origem no metabolismo aberrante de oócitos e embriões durante a cultura, levando a um alto teor de lipídios citoplasmáticos com diferentes arranjos de padrão de gotículas de lipídios e as alterações na estrutura microtubular, bem como a relação volume / superfície que influencia a penetração de crioprotetores (SEIDEL et al., 2006)

Em temperaturas fisiológicas, as gotículas lipídicas estão geralmente em uma fase fluida, proporcionando elasticidade às membranas e estruturas intracelulares. No entanto, após o resfriamento e abaixo da transição de fase lipídica principal, a taxa de difusão das moléculas hidrofóbicas e a permeabilidade das membranas são diminuídas, levando à rigidez das membranas, redistribuição de lipídios intracelulares e potencialmente perturbação de organelas associadas a gotículas de lipídios (SUDANO et al., 2011) Além disso, o grau de saturação lipídica varia entre as espécies, raças e estádios embriológicos (BALDOCEDA et al., 2016).

2.6 DELIPIDAÇÃO CELULAR

Os lipídios são essenciais para a geração de ATP via fosforilação oxidativa na mitocôndria. Embora fosforilação oxidativa seja uma parte vital do metabolismo, ele produz espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido e peróxido de hidrogênio, que levam à peroxidação lipídica, bem como à propagação de radicais livres, apoptose e disfunção mitocondrial (YIN et al., 2015).

Os ovócitos e embriões de bovinos e suínos são caracterizados por grandes quantidades de conteúdo lipídico, armazenado principalmente sob a forma de gotículas no citoplasma. A maioria das gotas lipídicas em blastocistos produzidos *in vivo* ocorre na massa celular interna (MCI) e não nas células trofoblásticas, ao contrário dos embriões PIV. Além do aumento de gotas de lipídios ocorre distribuição uniforme no trofoblasto e MCI, o que pode indicar desequilíbrio no metabolismo mitocondrial, com menor utilização das reservas de gordura (SUDANO et al., 2012)

Na tentativa de melhorar a qualidade dos embriões para criopreservação diminuindo os ácidos graxos algumas metodologias como a redução mecânica e química dos lipídeos já foram utilizadas em embriões de mamíferos (OGAWA et al., 2010).

A centrifugação e a delipidação por micromanipulação, técnicas de delipidação mecânica, foram empregadas em embriões bovinos e suínos no estágio de quatro a oito células. Para a remoção mecânica, os embriões são centrifugados fazendo com que as gotículas de lipídeos se polarizem em uma extremidade do citoplasma (MEN et al., 2008). Através da centrifugação, também é possível a completa remoção das gotículas do citoplasma para o espaço perivitelíneo. Após a polarização ou extrusão das gotículas do citoplasma, é possível removê-las com o auxílio do micro manipulador. Já a delipidação química pode ser feito pela exposição das células a substâncias delipidantes (HARA et al., 2005).

Atualmente a delipidação mais utilizada é através de lipólise química utilizando cofatores que aumentam a utilização, reduzem a captação e síntese de ácidos graxos pelas células. Substâncias como o etossulfato de fenazina (PES) (BARCELÓ-FIMBRES, 2008), Forskolin (PANYABORIBAN et al., 2018), L-carnitina (LIANG et al., 2020) e isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA) (CARVALHO et al., 2019) têm sido estudadas.

O ácido linoléico conjugado altera o perfil dos ácidos graxos durante a maturação, inibindo a expressão de genes que codificam para enzimas lipogênicas e reduzindo o teor de lipídios, enquanto melhora a criorresistência, especialmente quando meios contendo soro fetal bovino são usados (CARVALHO et al., 2019).

A cultura de embriões na presença de etossulfato de fenazina (PES) diminuiu significativamente seu conteúdo lipídico. O PES é um aceptor de elétrons que oxida NADPH em NADP, o que aumenta o fluxo de glicose através da glicólise e da via da pentose fosfato, diminui o acúmulo de lipídios em embriões bovinos produzidos *in vitro*, e aumenta a sobrevivência do embrião após a criopreservação em relação aos controles (BARCELÓ-FIMBRES et al., 2008)

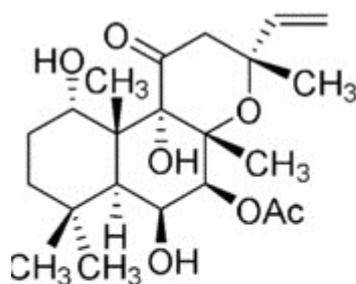
L-carnitina serve como um veículo intra-mitochondrial para a transferência de ácidos graxos de cadeia longa dentro da mitocôndria para oxidação β , o transporte de grupos acil de cadeia curta e média do peroxissomo para a mitocôndria, a regulação de acil-CoA / livre intracelular Razão de CoA e a remoção de resíduos de acila tóxicos da mitocôndria. Além disso, protege a célula de danos ao DNA, minimiza o insulto ao citoesqueleto dos oócitos e atua como um antioxidante para prevenir a apoptose embrionária. L-carnitina promove o metabolismo lipídico, bem como a produção de ATP na célula animal e foi relatado como um potente antioxidante com poucos efeitos colaterais (LIANG et al, 2020)

O mecanismo de delipidação do Forskolín estimula os níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPC) em sistemas celulares. Quando a célula contém altos níveis de cAMP, a lipase estimula a adenilato ciclase. A lipase é hidrolisada entre os ácidos graxos e a região do glicerol dos triacilgliceróis dentro do embrião. (PANYABORIBAN et al., 2018).

2.7 FORSKOLIN

O Forskolín (7_-acetoxo-8,13-epoxo-1_,6_,9_-trihidroxiabd-14-ene-11-one) é um diterpeno, um produto natural complexo, que se tornou uma ferramenta de pesquisa padrão em biologia (Figura 1). Este diterpeno, extraído das raízes de *Coleus forskohlii*, mostrou ser um estimulador alostérico de adenilil ciclases (ACs) ligadas à membrana geradoras de AMPC. Essas enzimas estão envolvidas na ação de várias moléculas pequenas, mais notavelmente aqueles que afetam os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (HYLSE et al., 2017)

A substância é capaz de ativar a adenilato ciclase (ATP pirofosfato-liase) em cultura de tecidos. O Forskolin causa uma elevação do AMP cíclico, estas concentrações celulares aumentadas de AMPc ativam as lipases endógenas através da via AMPc / proteína quinase, causando lipólise do triacilglicerol (revisado em Honnor), ocorrendo a liberação de ácidos graxos + glicerol (CUELLO et al., 2013)



Forskolin (1)

Figura 1 - Fórmula química Forskolin

O excesso de lipídios intracitoplasmáticos em embriões PIVE continuam sendo o fator mais importante afetando a taxa de sucesso da criossistência em embriões após o descongelamento. O conteúdo de lipídios nos embriões PIV de ruminantes é bastante alto no estágio inicial e diminui no estágio de blastocisto, resultando em uma redução da criotolerância em embriões em estágio inicial em comparação com os blastocistos. Esse problema pode ser resultado da absorção de lipídios do soro no meio de cultura pelo embrião, o que pode afetar o metabolismo mitocondrial das células embrionárias (LEROY et al., 2005)

Os métodos de deleção parcial de lipídeos são de grande interesse para criopreservar embriões com maiores conteúdos lipídicos, pois diminuem a chance de lesões em organelas durante o processo de desidratação, criopreservação e descongelamento (CUELLO et al., 2013). A estimulação química da lipólise com Forskolin tem sido sugerida como método alternativo para melhorar taxas de sucesso da vitrificação para embriões produzidos *in vitro*, já que reduz o conteúdo lipídico de ovócitos de suínos (CUELLO et al., 2013) e de blastocistos (MEN et al., 2006).

O Forskolin foi usado pela primeira vez para reduzir o conteúdo de lipídios em embriões de suínos. Embriões suínos tratados com Forskolin tiveram maior tolerância ao congelamento e taxa reduzida de apoptose. Este foi capaz de reduzir o acúmulo

de lipídios em embriões de blastocisto bovino, proporcionando resultados promissores de desenvolvimento embrionário aprimorado e fertilidade (PASCOAL et al., 2017). Entretanto, ainda há uma carência de estudos elucidem qual a melhor concentração e período de exposição ao componente.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados disponíveis na literatura levam a crer em resultados reprodutivos mais favoráveis a suplementação com o delipidador químico Forskolin, tendo efeito efetivo na redução do conteúdo intracitoplasmático de lipídeos. A adição ao meio de cultivo eleva a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos, tornando-os mais tolerantes às injúrias causadas pela criopreservação.

Respeitando os limites éticos, espera-se que estudos bem desenhados no futuro somem dados aos até então disponíveis, que forneçam as evidências necessárias para o incremento do componente na rotina laboratorial de reprodução assistida nos dias de hoje.

REFERÊNCIAS

- AARDEMA, H.; VOS, P.L.A.M.; LOLICATO, F. et al. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 62–69, 2011.
- ABE, H.; HOSH, H. Evaluation of bovine embryo produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, p.193-202, 2003.
- ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S. et al. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and *in vitro*. **Anatomy and Embryology**, v.199, p.519-27, 1999
- ABE, H.; SHIKU, H.; AOYAGI, S. et al. *In vitro* Culture and Evaluation of Embryos for Production of High Quality Bovine Embryos. **Journal of Mammalian Ova Research**, v.21, p. 22- 30, 2004.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002
- ALEXOPOULOS, N.I.; MADDOX-HYTTEL, P.; TVEDEN-NYBORG, P. et al. Developmental disparity between *in vitro*-produced and somatic cell nuclear transfer bovine days 14 and 21 embryos: Implications for embryonic loss. **Reproduction**. v.136, n.4, p.433–45, 2008.
- ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.81(1), p. 96-102, 2014
- BARCELÓ-FIMBRES, M.; BRINK, Z.; SEIDEL, G.E. Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. **Theriogenology**, v.71(2), p.355–368, 2009.
- BALDOCEDA, L.; GAGNÉ, D.; FERREIRA, C.R. et al. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by l-carnitine. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.
- BURNUM, K.E.; CORNETT, D.S.; PUOLITAIVAL, S.M. et al. Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. **Journal of Lipid Research**, v.50, p. 2290–2298, 2009.

BALAKIER, H.; SOJECKI, A.; MOTAMEDI, G. et al. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? **Fertility and Sterility**, v.98(1), p.77–83, 2012.

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; et al. Intercellular communication in in vivo- and *in vitro*-produced bovine embryos. **Biology Reproduction**, v.61(4), p.1050–5, 1999.

CAMARGO, L.S.A.; BOITE, M.C.; WOHLRES-VIANA, S. et al. Osmotic challenge and expression of Aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced *in vitro*. **Cryobiology**, v. 63, p. 256-262, 2011.

CAMPOS-CHILLÓN, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F. et al. Avaliação *in vitro* de um procedimento de vitrificação por transferência direta para embriões bovinos. **Theriogenology**, v.65 (6), p.1200-1214, 2006.

CARVALHO, B.P.; COSTA, F. Q.; DETONI, D. et al. Use of conjugated linoleic acid (trans 10, cis 12) to cultivate bovine embryos: effect on cryoresistance and lipid content. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 48, 2019.

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J. et al Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or *in vitro*. **Biology Reproduction**, v.64, p.1375-1385, 200.

CUELLO, C.; GOMIS, J.; ALMIÑANA, C. et al. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of *in vitro*-produced pig embryos. **Animal Reproduction Science**, v.136(4), p.296–302, 2013.

DIESEL, Tiago Omar. **Delipidação química na produção *in vitro* e criopreservação de embriões bovinos**. 2018. 92 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018

DOCHI, O. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. **Journal of Reproduction and Development**, v.65 (5), p.389-396, 2019

DOCHI, O.; IMAI K.; TAKAKURA, H. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos with ethylene glycol. **Japanese Society of Zootechnical Science Annual Meeting Abstracts**, 1991.

DU, Q.Y.; WANG, E.Y.; HUANG, Y. et al. Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. **Fertility and Sterility**, v.105(4), p.910–919, 2016.

DUNNING K.R.; ROBKER, R.L. The role of l-carnitine during oocyte *in vitro* maturation: essential co-factor? **Animal Reproduction Science**, v.14(3), p.469–75, 2017.

DUNNING, K.R., ROBKER, L.R. Promoting lipid utilization with L-carnitine to improve oocyte quality. **Animal Reproduction Science**, v. 134, p. 69– 75, 2012.

FLÉCHON, J.E. The acrossome of eutherian mammals. **Cell and Tissue Research**, v.363, n.1, p.147-157, 2016.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A; ADONA, P.R. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71(5), p.836–48, 2009.

GURAYA, S.S. A histochemical analysis of lipid yolk deposition in the oocytes of cat and dog. **Journal of Experimental Zoology**. v. 160, p. 123–136, 1965.

GARCIA, S.M.; MARINO, L.S.R.; LUNARDELLI, P.A. et al. Developmental block and programmed cell death in bos indicus embryos: Effects of protein supplementation source and developmental kinetics. **PLoS ONE**, v.10, n.3, p.1-16, 2015.

GARDNER, A.J.; EVANS, J.P. Mammalian membrane block to polyspermy: New insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. **Reproduction, Fertility and Development**, v, 18, n.1-2, p.53-61, 2006.

GEORGADAKI, K.; KHOURY, N.; SPANDIDOS, D.A. et al. The molecular basis of fertilization (review). **International Journal of Molecular medicine**, v.38, n.4, p.979-986, 2016.

GRAF, A.; KREBS, S.; HEININEN-BROWN, M. et al. Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from rna sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, v.149, n.1-2, p.46-58, 2014.

GONÇALVES, R.L.R.; VIANA, J.H.M. Current status of cattle embryo production in Brazil and in the world. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v.43, n.2, p.156-159, abr./jun. 2019

HARA, K.; ABE, Y.; KUMADA, N. et al Extrusion and removal of lipid from the cytoplasm of porcine oocytes at the germinal vesicle stage: centrifugation under hypertonic conditions influences vitrification. **Cryobiology**, v.50, p.216-222, 2005.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003

HONNOR, R.; DHILLON, G.; LONDOS, C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v.985, n.260(28), p.15139–45, 1985.

HYLSE, O.; MAIER, L.; KUČERA, R. et al. A Concise Synthesis of Forskolin. **Angewandte Chemie International Edition**, v.56(41), p.12586–12589, 2017.

INOUE, D.; WITTBRODT, J.; GRUSS, O.J. Çoss and rebirth of animal microtubule organizing center: How maternal expression of centrosomal proteins cooperates with the sperm centriole in zygotic centrosome reformation. **BioEssays**, v.40, n.4, p.1-9, 2018.

JIANG, Z.; SUN, J.; DONG, H. et al. trascrptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genimics**, v.15, n.1, p.1-15, 2014.

KOCOSKI, L.; DOUCHI, O.; CHAN, H. et al. The effect of different cryopreservation methods on the survival rate in bovine embryos. **Proc 7th Annu Meet Assoc Embryo Transf Eur**. 154 (Abstract). 1991.

LEIBO, S.P. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.21, p.767–790. 1984.

LEROY, J.; GENICOT, G.I.; DONNAY, A. Avaliação do conteúdo de lipídios em oócitos e embriões bovinos com vermelho do Nilo: uma abordagem prática, **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p. 76 – 78, 2005.

LIANG, Y.; YOISUNGNERN, T.; HUANG, Y. et al. Effects of L-carnitine on embryo development of vitrified swamp buffalo oocytes following *in vitro* fertilization. **Livestock Science**, v.232, p.103933, 2020.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUITIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRA, P.M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. Temporal divergence in the pattern of Messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst *in vitro* or in vivo. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1424-1431, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro* produced bovine embryos - dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

LOEWENSTEIN, J. E., COHEN, A. I. Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 12, p. 113–121, 1964.

LIMA, M.R. **Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos e na sobrevivência à vitrificação**. 2015. xvi, 74 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2015.

MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P. Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. **Veterinary Record**, v.115, p.327–328, 1984.

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

MENEGHEL, M.; DALL'ACQUA, P.C.; AMBROGI, M. et al. Lipid content and cryotolerance of *in vitro*-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.4, p.395–400, 2017

MEN, H.; ZHAO, C.; CRITSER, J. K. A simplified mechanical delipidation approach to increase the cryosurvival of porcine early stage embryos. **Cryobiology**, v.57, n.3, p.338. 2008.

MEN H.; AGCA, Y.; RILEY, L.K.; CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipidation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology** 2006;66:2008-16, 2006.

MCKEEGAN, P.J.; STURMEY, R.G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reproduction Fertility and Development**, v. 24, p. 59–67, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7a ed. Porto Alegre, Ed. Arned, 2018.

OGAWA, B.; UENO. S.; NAKAYAMA, N.; et al. Developmental ability of porcine *in vitro* matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, p. 356-361, 2010.

OKABE, M. Sperm-Egg interaction and fertilization: Past, presente, and future. **Biology of reproduction**, fev. 2018.

OLIVEIRA, C.S.; SERAPIÃO, R.V.; QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica –Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175). 2014.

PANYABORIBAN, S.; THARASANIT, T.; CHANKITISAKUL, V. et al. Treatment with chemical delipidation forskolin prior to cryopreservation improves the survival rates of

swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos indicus*) *in vitro* produced embryos. **Cryobiology**, 2018.

PARRIDH, J.J. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparina. **Theriogenology**, v.81, n.1, p.67-73, 2014.

PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D. et al. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v.18, p.1-12, 2012.

PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; SILVA, A.O. et al. Development of *in vitro* produced bovine embryos in a medium with decreasing concentration of fetal calf serum (Abstract). **Animal Reproduction**, p. 273, 2009.

PASCHOAL, D.M.; SUDANO M.J.; MAZIERO R.; et al. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos after lipid decrease with forskolin. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, p.212-213, 2015.

PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D. et al. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v.22, n.2, p.146–57, 2014.

PASCHOAL, M.D.; SUDANO, J.M.; SCHWARZ, R.K. et al. Cell apoptosis and lipid content of *in vitro* – produced , vitrified bovine embryos treated with forskolin. **Theriogenology** [Internet], v.87, p.108–14, 2017.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. **Nature**, v.313, p. 573-575, 1985.

RIZOS, D.; GUITIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and Messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v.68, p.236-243, 2003.

SATHANANTHAN, A.H. Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: A a personal survey. **Micron**. V.44, n.1, p.1-20, 2013.

SANCHES, B.V.; MARINHO, L.S.R.; FILHO, B.D.O. et al. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v.80, n.4, p.372–377, 2013.

SANDERS, J.R.; SWANN, K. Molecular triggers of egg activation at fertilization in mammals. **Reproduction**, v.152, n.2, p.41-50, 2016.

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

SEIDEL, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, n.1, p. 228–35, 2006.

SZÉLL, A.; SHELTON, J.N.; SZÉLL, K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. **Cryobiology**, v.26, p.297–301, 1989.

SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M.; OOE, M. et al. Effect of sucrose concentration used for one-step dilution upon *in vitro* and *in vivo* survival of bovine embryos refrigerated in glycerol and 1, 2-propanediol. **Theriogenology**, v.34, p.1051–1057, 1990.

SUDANO, J.M.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.D. et al. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, 75 (2011), pp. 1211-1220

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

STURMEY, R.G.; REIS, A.; LEESE, H.J. et al. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44(3), p. 50–58, 2009.

SUDANO, M.J.; SANTOS, V.G.; TATA, A. et al. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* *In vitro*- and *In Vivo*-Produced Blastocysts1. **Biology of Reproduction**, v.87, n.6, p.1–11 2012.

SUDANO, M.J.; RASCADO, T.D.S.; TATA, A. et al. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v.86(2), p.472-484, 2016.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO T.D.S. et al. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v.75, n.7, p.1211–20, 2011.

THOMPSON, J.G.; MCNAUGHTON, C.; GASPARRINI, B.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compactation and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. **Journal Reproduction Fertility**, v. 118, p. 47-55, 2000.

VERMA, M.; PANDEY, S.; BHAT, IA. et al. Impact of L-carnitine on lipid content and post thaw survivability of buffalo embryos produced *in vitro*. **Cryobiology**. p.1–7, 2018.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v.14, p.476-481, 2017.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; GONÇALVES, R.L.R. et al. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction**, v.15, p.963-970, 2018.

VIANA, J.H.M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more *in vitro*-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer News**, v.36(4), p.8-25, 2018.

VOELKEL, S.A.; HU, X.Y. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p.23–37. 1992.

YAVIN, S.; AROYO, A.; ROTH, Z. et al. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. **Human Reproduction**, v.24, p. 797-80, 2009.

YIN, H.; SANCHETI, Z.; LIU, E. Cadenas Mitochondrial function in ageing: coordination with signalling and transcriptional pathways J. **Physiol.** 2015.

WHITTINGHAM, D.; LEIBO, S.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to 196 and 269°C. **Science (80-)** v.9, p.411–4, 1972.

WILMUT, I.; ROWSON, L.E. The successful low-temperature preservation of mouse and cow embryos. **Journal of reproduction and fertility**. v.33, n.2, p.352-3, 1973.

CAPITULO 2

AÇÃO DO FORSKOLIN NA FASE DE CULTIVO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* E SUA IMPLICAÇÃO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS: METANÁLISE

RESUMO

Melhores taxas de reexpansão embrionária e implantação foram relatadas após o uso de Forskolin durante a cultura de embriões, principalmente devido à redução de lipídios intracitoplasmáticos que acarretam melhora na criopreservação. No entanto, alguns estudos divergem sobre os efeitos. Portanto, o objetivo desta meta-análise foi avaliar o efeito do Forskolin nos resultados de trabalhos que realizaram a cultura embrionária *in vitro* com o componente. Para comparar os resultados dos trabalhos dos grupos com Forskolin e controle foi usado o método multivariado da máxima verossimilhança restrita (REML), para identificar heterogeneidade entre os estudos foi usado o teste Q, e para quantificar a heterogeneidade foi usada a estatística I^2 . Com base na análise estatística dos resultados dos trabalhos anteriores infere-se que os embriões cultivados com Forskolin na concentração de 10 μM tem chance de reexpansão 71% maior que no controle, com intervalo de 95% de confiança entre 27% e 132%, e não há diferença estatisticamente significativa entre os embriões tratados com Forskolin na concentração de 5 μM e controle em relação à chance de reexpansão embrionária.

Palavras-chave: Delipidação; Criotolerância; Fertilização *in vitro*.

ABSTRACT

Better rates of embryonic re-expansion, implantation have been reported after the use of Forskolin during embryo culture, mainly due to the reduction of intracytoplasmic lipids that lead to improved cryopreservation. However, some studies differ on the effects. Therefore, the objective of this meta-analysis was to evaluate the effect of Forskolin on the results of studies that performed *in vitro* embryo culture with the component. The restricted maximum likelihood multivariate method (REML) was used to compare the results of the studies in the Forskolin and control groups, the Q test

was used to identify heterogeneity between the studies, and the I² statistic was used to quantify heterogeneity. Based on the statistical analysis of the results of previous studies, it is inferred that embryos cultured with Forskolin at a concentration of 10µM have a 71% greater chance of re-expansion than in the control, with a 95% confidence interval between 27% and 132%, and not there is a statistically significant difference between embryos treated with Forskolin at the concentration of 5µM and control in relation to the chance of embryonic reexpansion.

Keywords: Delipidation; Cryotolerance; *In vitro* fertilization.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões é uma tecnologia amplamente consolidada no mercado de reprodução de bovino. De acordo com a International Embryo Transfer Society (VIANA, 2019), a maioria dos embriões bovinos no mundo (68,7%) são produzidos por fertilização *in vitro*. Contudo, a disponibilidade dos embriões produzidos é baixa por dificuldade de conservação e transporte. Por isso, grande esforço tem sido investido no desenvolvimento de um protocolo eficiente para criopreservação de embriões bovinos.

Para otimizar a técnica, a utilização dos delipidadores químicos durante o cultivo de embriões tem sido objeto de estudo, visto que, sugere-se que os embriões FIV são menos resistentes aos métodos de criopreservação em comparação com embriões produzidos *in vivo* devido à maior quantidade de lipídios decorrente as condições de cultura (ABE et al., 2002).

Os lipídios, principais moléculas de armazenamento de energia intracelular, após serem absorvidos pelas células somáticas são quebrados, os ácidos graxos são esterificados em triacilglicerol (TAG) e ésteres de colesterol e armazenados como em gotículas (CARRO, M. et al., 2013). Durante o metabolismo da gordura, via fosforilação oxidativa, gera-se estresse oxidativo que levam à peroxidação lipídica, bem como à propagação de radicais livres, apoptose e disfunção mitocondrial (YIN et al., 2015).

Todo esse dano é acentuado pela criopreservação que causa fraturas do citoesqueleto, alterações ultraestruturais decorrentes de desorganização de filamentos de actina; alteração na distribuição de organelas, incluindo áreas sem organelas citoplasmáticas e complexo de Golgi localizado longe do núcleo; alteração do padrão de distribuição e atividade mitocondrial; presença de grandes vesículas; diminuição de junções intercelulares; atraso na retomada de síntese de proteínas; mudanças nos níveis de expressão gênica; danos no DNA e alteração no “imprinting” gênico. Além disso, em temperaturas fisiológicas, as gotículas lipídicas estão geralmente em uma fase fluida, proporcionando elasticidade às membranas e estruturas intracelulares. No entanto, após o resfriamento a taxa de difusão das moléculas hidrofóbicas e a permeabilidade das membranas são diminuídas, levando à rigidez das membranas, redistribuição de lipídios intracelulares (SUDANO et al., 2011), bem como a relação volume/superfície que influencia a penetração de crioprotetores (SEIDEL et al., 2006)

A capacidade de um embrião sobreviver à criopreservação é uma preocupação para comercialização. Sendo assim, a utilização de compostos que diminuem a alta concentração de lipídios é uma alternativa. A adição da Forskolin (7-acetoxi-8,13-exepoxi-1,6,9-trihidroxi-Labd-14-en-11-ona, C₂₂H₃₄O₇), que é derivada da família dos diterpenos, causa uma elevação do AMP cíclico, ativando as lipases endógenas através da via AMPc/proteína quinase, causando lipólise do triacilglicerol, ocorrendo a liberação de ácidos graxos + glicerol (CUELLO et al., 2013).

Então, o objetivo deste estudo foi, a partir de uma revisão sistemática, avaliar o efeito da adição de Forskolin durante o cultivo *in vitro* de embriões na criopreservação, avaliando as taxas de reexpansão do blastocele após criopreservação de embriões bovinos PIV, com isso desenvolver uma metanálise dos resultados dos trabalhos selecionados na revisão.

MÉTODOS

A revisão sistemática utilizada nesta metanálise foi feita com todos os estudos publicados disponíveis que avaliaram os efeitos de concentrações de Forskolin em cultura embrionária bovina correlacionando com as respectivas taxas de reexpansão. Os ensaios com a utilização de Forskolin em maturação de oócitos e fertilização de embriões não foram incluídos.

Os dados relevantes para o trabalho foram extraídos por um pesquisador por meio de ficha padronizada, elaborada a partir da identificação dos dados mais relevantes para o trabalho, contendo informações sobre autor, ano da publicação e desenho do estudo. As estratégias de busca incluíram pesquisas online nas bases de dados Scielo, Capes Periódicos, Pubmed, BVS, Lilacs, Ccochrane, Wiley online base, sem restrição de idioma, de 1980 a 2022. Foram usados os seguintes títulos de assuntos médicos e palavras de texto: *embryo*, *bovine*, *Forskolin*. O principal critério de inclusão a partir da leitura dos resumos dos trabalhos foi: Utilização do Forskolin em cultura embrionária *in vitro* bovina para avaliar criopreservação.

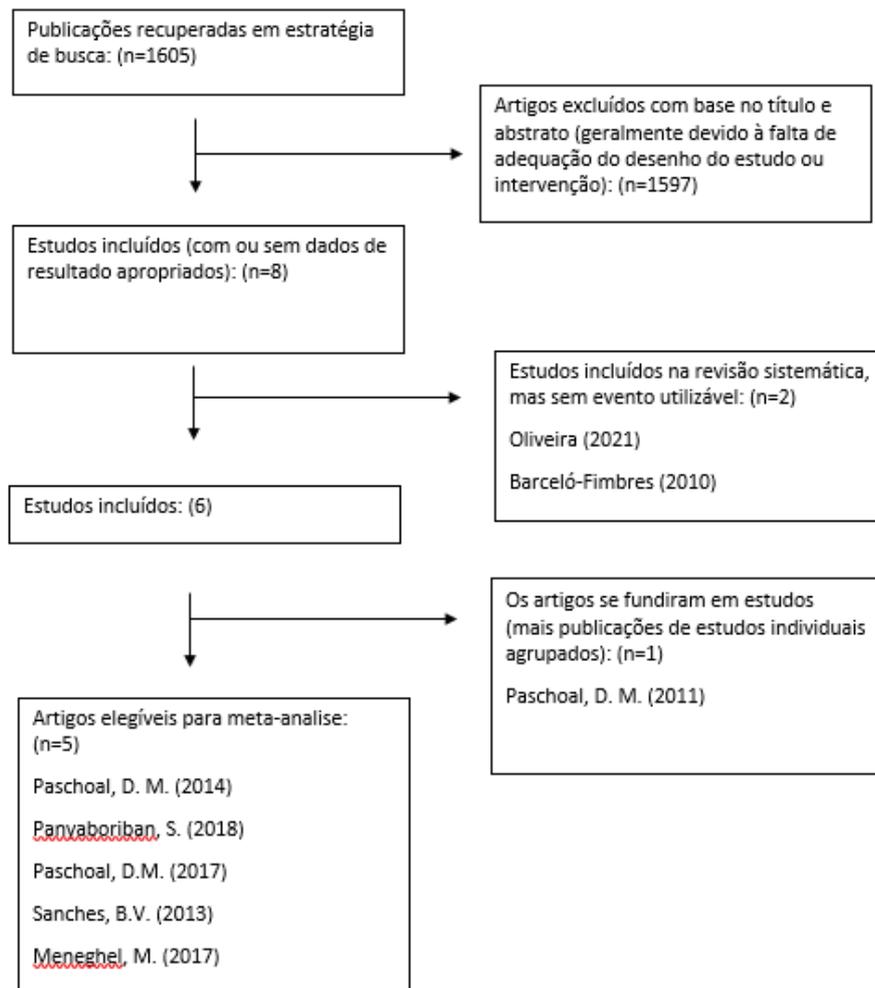


Figura 2 - QUOROM diagrama de fluxo de instrução que ilustra a seleção de ensaios incluídos na metanálise.

Entre os oito trabalhos selecionados dois foram descartados: um por utilizar coquetel de delipidadores na cultura, portanto não sendo possível estimar o efeito da

forscolina de forma isolada, e outro por impossibilidade de acesso ao texto completo. Por fim, mais um trabalho foi excluído por reutilizar dados de outro trabalho já incluso neste estudo. Assim, após revisão sistemática, foram selecionados 5 artigos, publicados entre 2013 e 2018, para realização da metanálise. Para estimar a razão de chances (*odds ratio*) do Forskolin em relação ao controle foram usados modelos fixo (concentração 10 μM) ou aleatório (concentração de 5 μM) através do método de Máxima Verossimilhança Restrita (ou Restricted Maximum Likelihood Method – REML) que estima valores para os diferentes parâmetros do modelo.

Para identificar heterogeneidade entre os estudos foi usado o teste Q, e para quantificar a heterogeneidade foi usada a estatística I^2 . Essa estatística estima a proporção da heterogeneidade observada nos estudos, podendo variar de 0% a 100%. Interpretativamente, uma escala com um valor de I^2 próximo a 0% indica não heterogeneidade entre os estudos, próximo a 25% indica baixa heterogeneidade, próximo a 50% indica heterogeneidade moderada e próximo a 75% indica alta heterogeneidade entre os estudos (Rodrigues & Ziegelmann, 2010).

O risco de viés não foi avaliado por causa do baixo número de estudos, visto que tal análise só é possível quando presentes conjuntos com pelo menos 10 trabalhos.

RESULTADOS

Descrições dos estudos

Abaixo são breves descrições de cada estudo:

Panyaboriban, S. (2018) examinou os efeitos do uso da Forskolin, durante a produção *in vitro* de embriões de búfalos e bovinos sobre teores lipídicos, criotolerância e competência de desenvolvimento subsequente desses embriões. Os embriões de búfalos e bovinos foram divididos em quatro experimentos. Experimento 1, embriões de búfalos e bovinos foram pré-tratados na presença e ausência de Forskolin 10 μM por 24 h. Conclui-se que 10 μM Forskolin foi capaz de reduzir o conteúdo lipídico em embriões em desenvolvimento em ambas as espécies ($P < 0,01$). O experimento 2 investigou os efeitos adversos de 10 μM de Forskolin no desenvolvimento embrionário. Nos Experimentos 3 e 4, Dia 2 e Dia 7 foram pré-tratados com 10 μM Forskolin por 24 h e posteriormente criopreservados. O sucesso

da criopreservação foi determinado pelo desenvolvimento embrionário pós-descongelado *in vitro*. Os resultados mostraram que a taxa de blastocisto do estágio de 4-8 células no grupo tratado com Forskolin aumentaram em ambas as espécies, enquanto as taxas de eclosão e de blastocisto eclodido de embriões bovinos tratados com Forskolin no dia 7 foram significativamente maiores do que as do grupo não tratado (52,1% vs. 39,4%; $P < 0,05$). No entanto, a delipidação com Forskolin não afetou a taxa de desenvolvimento do dia 7 de embriões de búfala ($P = 0,73$). Ficou evidente nesse estudo que a delipidação pelo tratamento com Forskolin aumentou a taxa de sobrevivência da criopreservação em embriões bovinos e búfalos produzidos *in vitro*.

Paschoal (2017) cultivou zigotos bovinos em SOFa mais SFB 2,5% por seis dias, quando a Forskolin foi adicionada em três concentrações: 2,5; 5; 10 μM . Em uma segunda avaliação, os embriões foram vitrificados e também foram avaliados taxa de reexpansão, número total de células e taxa de apoptose. Não houve diferença devido à Forskolin na formação de blastocistos ou taxas de reexpansão após a vitrificação. No entanto, as medições de lipídios foram menores e o número de células por embrião maior do que os controles para 2,5 μM de Forskolin, mas não para concentrações mais altas de Forskolin. O número de células intactas por embrião foi maior, e a taxa de apoptose foi menor em embriões frescos do que em embriões vitrificados. Concluiu-se que a Forskolin é um agente lipolítico eficaz mesmo em baixas concentrações, levando à formação de blastocistos com um número maior de células.

Sanches (2013) avaliou o efeito do Forskolin antes da vitrificação, na sobrevivência do embrião, viabilidade e taxas de prenhez de embriões bovinos. Para isso foram conduzidos dois experimentos, no experimento 1, os embriões foram alocados em dois grupos. No grupo de tratamento foram adicionados à cultura 10 μM de Forskolin *in vitro* no dia 5 que então foi incubada por 48 horas. No dia 7 da cultura, os blastocistos expandidos foram divididos em grupo controle e tratamento que foram ambos vitrificados. Não houve significativa diferença entre as taxas de reexpansão da blastocite e eclosão dos embriões expostos a Forskolin em comparação com os embriões controle em ambiente laboratorial. Já no experimento 2, novos blastocistos foram expostos ou não ao agente lipolítico, vitrificados e transferidos para receptoras. As vacas que receberam os embriões tratados apresentaram taxas de prenhez mais altas do que as vacas que receberam os embriões controle. Em conclusão, o

tratamento com Forskolin antes da vitrificação melhorou criotolerância de embriões bovinos, resultando em boa pós-transferência taxas de gravidez.

Meneghel, M. (2017) avaliou o conteúdo lipídico intracitoplasmático, o desenvolvimento e a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* tratados com diferentes concentrações de Forskolin antes da vitrificação. Os embriões foram distribuídos em quatro grupos, nos grupos de tratamento foi adicionado Forskolin ao meio de cultura nas concentrações: 2,5 μ M, 5,0 μ M ou 10,0 μ M. Os embriões do grupo controle foram cultivados sem Forskolin. No dia 7 de cultura, os blastocistos expandidos foram corados ou foram criopreservados. Não houve diferenças significativas no blastocisto entre o grupo Controle e os demais tratamentos, a produção de embriões foi menor no grupo com 10,0 μ M de foscolina em relação ao 2,5 μ M e Grupos 5,0 μ M. O conteúdo lipídico intracitoplasmático em blastocistos do grupo Controle foi semelhante ($P > 0,05$) ao encontrados nos grupos 2,5 μ M e 10,0 μ M, no entanto, no grupo 5,0 μ M foi menor ($P < 0,05$). Com base nesses resultados, o tratamento 5,0 μ M foi testado para criotolerância e observou-se que a taxa de reexpansão da blastocelule foi maior ($P < 0,05$) no grupo com 5,0 μ M em comparação com o grupo controle. Em conclusão, o pré-tratamento com Forskolin na concentração de 5,0 μ M por 24 horas antes da vitrificação é eficaz na redução do conteúdo lipídico intracitoplasmático e, conseqüentemente, melhora a criotolerância de embriões bovinos PIV.

Paschoal (2014) avaliou a viabilidade e criotolerância de embriões zebuínos produzidos *in vitro* com ou sem adição de soro fetal de vitela (FCS) e forscolina (F). Foram usados embriões produzidos *in vivo* como controle e quatro grupos experimentais: 2,5% FCS; 0% FCS; 2,5% FCS + F; e 0% + F. A presença de FCS no meio de cultura resultou na produção de embriões com uma taxa semelhante de células danificadas em comparação com embriões produzidos *in vivo*. Após a vitrificação, o grupo FCS 2,5% teve uma maior taxa de células danificadas quando comparado com os outros grupos ($P < 0,05$). Os resultados do experimento indicaram que a omissão de FCS e a adição de Forskolin não têm efeitos deletérios efeito sobre as taxas de produção de embriões. Além disso, embriões produzidos na presença de FCS tiveram maior sensibilidade à criopreservação, mas esse efeito foi revertido quando Forskolin foi adicionado ao meio, que melhorou a sobrevivência do embrião sem afetar o desenvolvimento e a qualidade do embrião após a vitrificação.

Meta-análise

As Figuras 1 e 2 apresentam o *forest plot* para as concentrações de 10 µM e 5 µM, respectivamente. O *forest plot* é um gráfico que possibilita a visualização das medidas estimadas e seus intervalos de confiança. Cada estudo é plotado no gráfico e sua representação tem dois elementos, uma caixa que indica a estimativa de cada estudo e uma linha horizontal, que indica o intervalo de confiança dessa estimativa. O tamanho da caixa é uma representação do tamanho amostral do estudo. Linhas horizontais pequenas indicam melhores precisões dos resultados do estudo. Um estudo com caixa grande e linha pequena tem maior impacto no tamanho do efeito estimado pela metanálise.

A Figura 2 mostra que o Forskolin, na concentração de 10 µM, tem chance de reexpansão 71% maior que no controle, com intervalo de 95% de confiança entre 27% e 132%. Foi observada baixa heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 20\%$), portanto foi usado modelo fixo para o cálculo da OR que é a razão entre as chances de um evento no grupo exposto para um evento no grupo controle

Modelo fixo pressupõe que o efeito de interesse é o mesmo em todos os estudos e que as diferenças observadas entre eles são devidas apenas a erros amostrais (este erro também é referido na literatura como variabilidade dentro dos estudos). De forma simplificada, é como se os métodos com efeitos fixos considerassem que a variabilidade entre os estudos ocorreu apenas pelo acaso e ignorassem a heterogeneidade entre eles (Rodrigues & Ziegelmann, 2010).

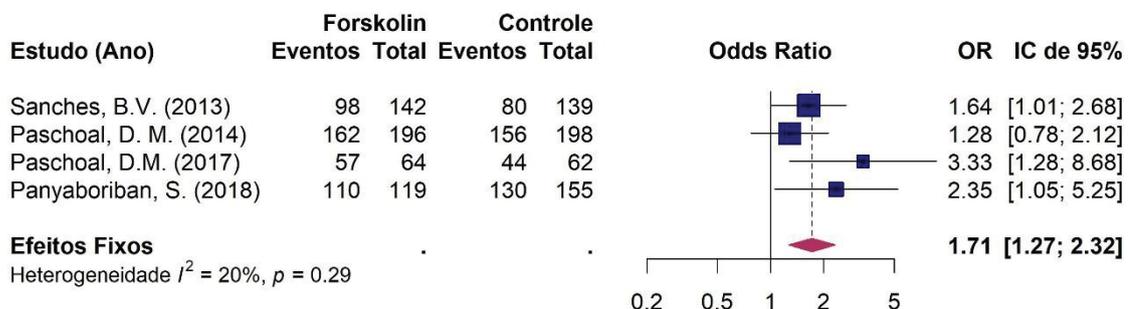


Figura 3 - Forest plot considerando concentração de 10 µM

A Figura 3 mostra que não há diferença estatística significativa entre Forskolin na concentração de 5 μ M e controle em relação à chance de reexpansão. Foi observada alta heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 77\%$), portanto foi usado modelo aleatório para o cálculo da OR.

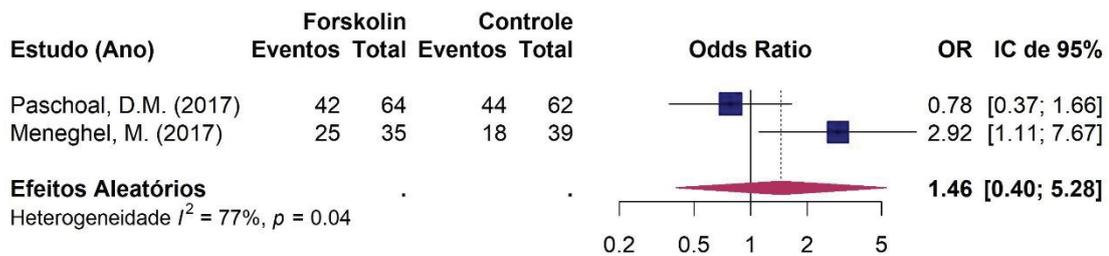


Figura 4 - Forest plot considerando concentração de 5 μ M

DISCUSSÃO

A revisão da literatura foi motivada diretamente pela necessidade de absorver o volume crescente de informações publicadas. A metanálise é uma investigação secundária que procura responder a uma certa questão usando uma estratégia bem definida para localizar evidências relevantes, avaliar os estudos disponíveis usando critérios metodológicos claros e resumindo formalmente os resultados. Este método consiste de uma abordagem analítica em que permite combinar resultados provenientes de diferentes estudos. Em comparação com as revisões narrativas, a metanálise tem a grande vantagem de ser menos influenciada pela opinião pessoal do revisor, fornecendo assim conclusões imparciais. Além disso, todos os resultados podem ser facilmente recalculados, sendo passível de replicação por outros investigadores e comparadas com as conclusões apresentadas. Mesmo quando não produz conclusões definitivas sobre a utilidade de um tratamento ou técnica, uma metanálise pode indicar a necessidade de mais estudos sobre o assunto. Além disso, as metanálises anteriores permitem a identificação das questões mais importantes a serem analisadas nos futuros estudos de pesquisa. Vários estudos avaliando os efeitos da Forskolin na cultura de embriões foram publicados, no entanto, as

conclusões desses estudos nem sempre foram consistentes. Portanto, dado o potencial do uso do componente, uma revisão deste assunto foi considerada útil.

Na revisão sistemática foi possível observar que muitos dos estudos sobre Forskolin na criopreservação não eram idênticos quanto a metodologia e os métodos de avaliação. Alguns estudos testavam mais de um componente em conjunto e mais de uma concentração, aumentaria muito o viés e a heterogeneidade do estudo. Portanto, a seleção dos trabalhos foi realizada de acordo com os critérios de desenho de estudo, fazendo uma busca específica por trabalhos que tratassem apenas sobre o Forskolin na cultura embrionária bovina, para melhorar criopreservação, procurando, desta forma, reduzir a heterogeneidade dos trabalhos incluídos, sem deixar de abranger a situação proposta pela pergunta do projeto. Apesar de tratar apenas de bovinos incluiu-se também o trabalho de Panyaboriban, S. (2018) que também faz o experimento em embriões bubalinos, mas por ser em experimentos separados foi possível extrair os dados apenas de bovinos.

Independente da forma de seleção, as diferenças foram investigadas e a heterogeneidade foi calculada pela estatística I^2 , que avalia quanto da variação do estudo decorre das diferenças entre os desfechos do estudo em comparação ao acaso. Foi observada baixa heterogeneidade entre os estudos ($I^2 = 20\%$).

A revisão de literatura foi realizada de forma ampla e abrangente na busca de reduzir o viés de publicação pela não restrição de idiomas durante a pesquisa nas bases de dados e pela inclusão de trabalhos publicados em periódicos de menor visibilidade científica. Entretanto, pelo baixo número obtido de trabalhos sobre o assunto não foi possível calcular o viés.

Após a revisão de literatura, foram combinados 5 artigos que investigaram o Forskolin para efeitos intensivos nos perfis lipídicos do embrião bovino e investigaram seu papel na reexpansão após criopreservação. Os resultados obtiveram diferença nos dados da literatura segundo suas conclusões – por exemplo, dentre os 5 estudos incluídos no presente trabalho, dois não concluíram, de uma maneira geral, a eficácia da do Forskolin diretamente na reexpansão após a criopreservação. O resultado do presente estudo diverge com resultados encontrados por Paschoal, et al. (2017) que não observaram diferenças no rendimento de blastocistos de embriões tratados com ou sem Forskolin 10 μ M durante 24 horas. Entretanto, encontraram atividade lipolítica eficaz ao tratar embriões bovinos com baixas doses de Forskolin e o número de células por embrião maior. Da mesma forma, Sanches et al. (2013), em ambiente

laboratorial, não encontraram diferenças nas taxas de produção de blastocistos após o tratamento de embriões com Forskolin 10 μM por 48 horas em comparação com embriões não tratados, mas obteve melhores resultados à campo. Já outros 3 estudos chegaram à conclusão que o componente melhora as taxas de reexpansão após a criopreservação. Todos concordam que ele melhora a criopreservação.

Na análise estatística chegou-se ao resultado de que a concentração de 10 μM , tem chance de reexpansão 71% maior que no controle, com intervalo de 95% de confiança. Entretanto, Meneghel, M. (2017) também obteve resultados demonstrando uma redução significativa no conteúdo lipídico citoplasmático e melhora na reexpansão na dose de 5,0 μM . Visto esse cenário, resolveu-se analisar se houve diferença estatística significativa também entre o uso de Forskolin na concentração de 5 μM e grupo controle em relação à chance de reexpansão, mas não houve. Foi observada alta heterogeneidade entre os estudos de Paschoal, et al. (2017) e Meneghel, et al. (2017) ($I^2 = 77\%$), necessitando de mais pesquisas para aumentar a confiabilidade dessa análise e que testem mais outras concentrações de Forskolin na eficácia da indução da lipólise celular para avaliar a efeitos desta droga no metabolismo, expressão gênica e proteoma embrionário. Além disso, o AMPc, por não ser uma molécula específica, regula várias funções fisiológicas, portanto ainda não se conhece todos os sítios de atuação nas células embrionárias (Sanches et al. 2013). Outros pontos a serem estudados são em relação ao tempo de exposição do embrião com o componente e em qual estágio de desenvolvimento é melhor adicionar o delipidador, visto que, ainda não há um consenso e não há trabalhos suficientes para fazer uma revisão sobre. Seria interessante avaliar a taxa de prenhez nas receptoras, assim como Sanches, et al (2013) realizou, visto que os resultados laboratoriais podem não refletir a verdadeira capacidade dos embriões.

CONCLUSÃO

Os resultados metanalíticos obtidos confirmam que o uso do agente lipolítico Forskolin, na concentração de 10 μM durante a cultura embrionária, é uma estratégia valiosa para melhorar a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*, visando produzir blastocistos com maiores taxas de sobrevivência pós-criopreservação.

A utilização de outras concentrações do componente carece de mais pesquisas.

REFERÊNCIAS

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development** v.61, p.57–66, 2002.
- Barceló-Fimbres, M.; Garay, A. A; Franco, E. L.; Quiñonez, S. G.; Ruiz, J. A.; Almeida, F.A.R.; Seidel, G.E. "Effects of Delipidation with Forskolin During *In vitro* Culture of Bovine Embryos and Recipient Synchronization on Pregnancy Rates." **Biology of Reproduction** v.83, p.677, 2010
- CARRO, M.; BUSCHIAZZO, J.; RÍOS, G.L.; ORESTI, G.M.; ALBERIO, R.H. Linoleic acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes. **Theriogenology** v.79, p.687–94, 2013
- CUELLO, C.; GOMIS, J.; ALMIÑANA, C. et al. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of *in vitro*-produced pig embryos. **Animal Reproduction Science**, v.136(4), p.296–302, 2013
- KARAGENC, L.; SERTKAYA Z.; CIRAY, N.; ULUG, U.; BAHCECI, M. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. **Reproductive BioMedicine Online**. v.9, p.409-417, 2004
- MENEGHEL, M.; DALL'ACQUA, P.C.; AMBROGI, M.; LEÃO, C.S.; ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; MINGOTI, G.Z. "Lipid Content and Cryotolerance of *in vitro*-produced Bovine Embryos Treated with Forskolin before Vitrification." **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.37.p.4: 395-400, 2017.
- OLIVEIRA, C.S.; FEUCHARD, V.L.D.S.; MARQUES, S.C.S.; SARAIVA, N.Z. Modulation of lipid metabolism through multiple pathways during oocyte maturation and embryo culture in bovine. **Zygote**. v.18, p.1-9, 2021
- PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J DA SILVA RASCADO, T.; MAGALHÃES, L.C, CROCOMO, L.F.; Neto, J.F.L.; GUASTALI, M.D.; DIAS MAZIERO, R.R.; Sanches, R.; Martins, A.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F "Forskolin Effect on *In vitro*-Produced Bovine Embryos after Vitrification." **Biology of Reproduction** v.85, p. 733. 2011
- PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D.; DIAS MAZIERO, R.R.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.; DA SILVA RASCADO, T.; MARTINS, A.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**. v.22(2), p.146-57. 2014
- PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; SCHWARZ, K.R.L.; MAZIERO, R.R.D.; GUASTALI, M.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.O.; MARTINS, A. JR.; LEAL, C.L.V.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Cell apoptosis and lipid content of *in vitro*-produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. **Theriogenology**. v.1; p.87:108-114, 2017.

- PANYABORIBAN, S.; THARASANIT, T.; CHANKITISAKUL, V.; SWANGCHAN-UTHAI, T.; TECHAKUMPHU, M. Treatment with chemical delipidation forskolin prior to cryopreservation improves the survival rates of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos indicus*) *in vitro* produced embryos. **Cryobiology**. v.84, p.46-51, 2018
- RODRIGUES, C. & ZIEGELMANN, P. Metanálise: um guia prático. Revista Clinical & Biomedical Research. v.30(4), p.435-446, 2010.
- SANCHES, B.V.; MARINHO, L.S.; FILHO, B.D.; PONTES, J.H.; BASSO, A.C.; MEIRINHOS, M.L.; SILVA-SANTOS, K.C.; FERREIRA, C.R.; SENEDA, M.M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**. v.1;80(4), p.372-7, 2013
- SEIDEL, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, n.1, p. 228–35, 2006.
- SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO T.D.S. et al. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v.75, n.7, p.1211–20, 2011.
- SUTTON, A. J.; ABRAMS, K. R.; JONES, D. R.; SHELDON, T. A.; & SONG, F. Methods for meta-analysis in medical research. 2000
- VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. International Embryo Technology Society, 2018.
- YIN, H.; SANCHETI, Z.; LIU, E. Cadenas Mitochondrial function in ageing: coordination with signalling and transcriptional pathways J. **Physiol**. 2015.