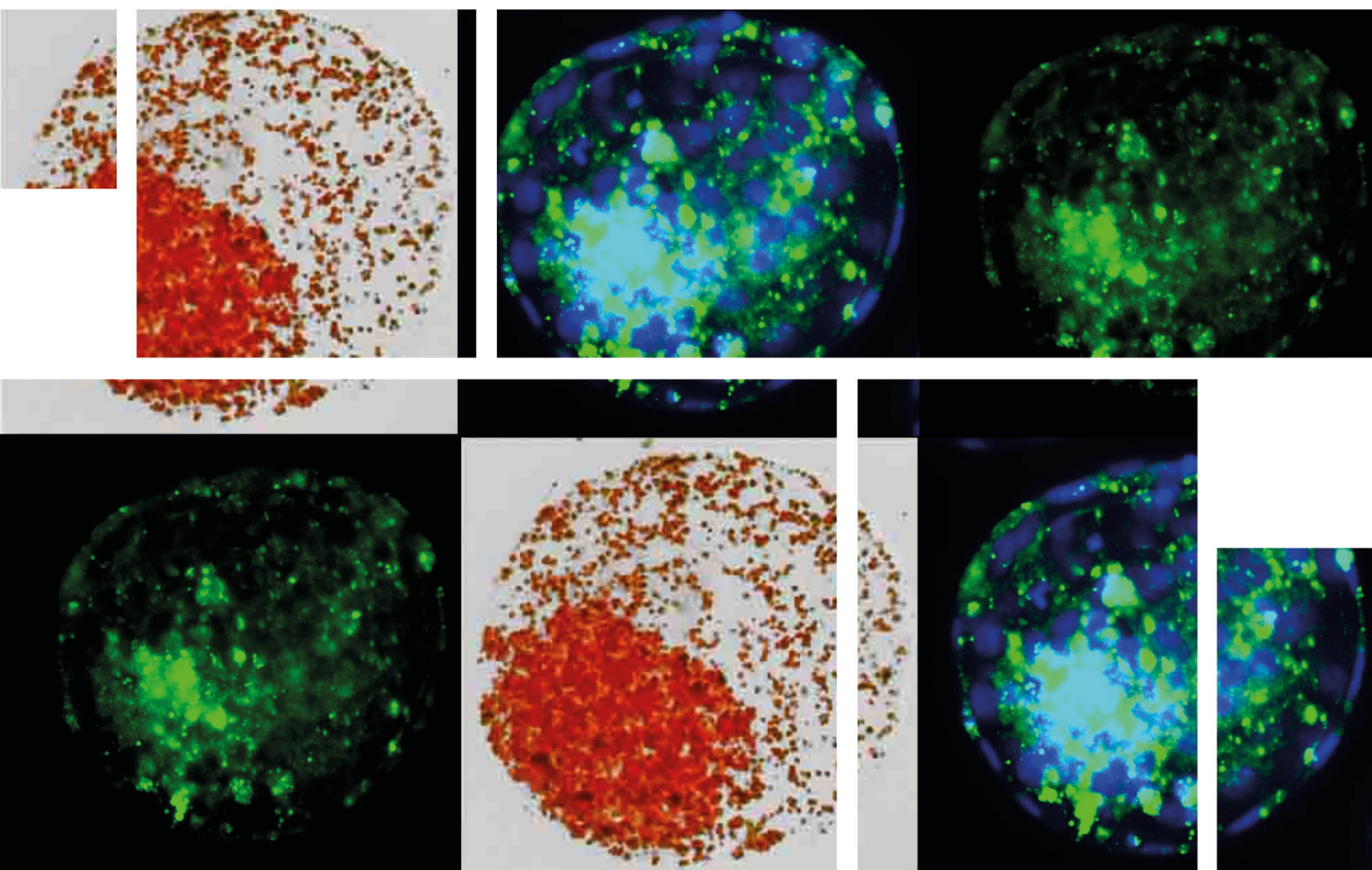




Avaliação do acúmulo lipídico em embriões bovinos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Leite
Ministério da Agricultura e Pecuária**

DOCUMENTOS 280

Avaliação do acúmulo lipídico em embriões bovinos

*Naiara Zoccal Saraiva
Clara Slade Oliveira
Carolina Capobiango Romano Quintão
Luiz Sergio de Almeida Camargo*

Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG
2023

Exemplar desta publicação disponível gratuitamente
no link:

<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>
(Digite o título e clique em "Pesquisar")

Embrapa Gado de Leite
Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Bairro Dom Bosco
36038-330 Juiz de Fora, MG
Fone: (32) 3311-7405
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicação

Presidente
Jorge Fernando Pereira

Secretário-Executivo
Carlos Renato Tavares de Castro

Membros
Adilson Ferreira da Motta, Cláudio Antônio Versiani Paiva, Deise Ferreira Xavier, Edna Froeder Arcuri, Fausto de Souza Sobrinho, Fernando César Ferraz Lopes, Francisco José da Silva Ledo, Frank Ângelo Tomita Bruneli, Jackson Silva e Oliveira, Juarez Campolina Machado, Leovegildo Lopes de Matos, Luiz Ricardo da Costa, Márcia Cristina Azevedo Prata, Marta Fonseca Martins, Pérsio Sandir D'Oliveira, Rui da Silva Verneque, Virginia de Souza Columbiano, William Fernandes Bernardo

Supervisão editorial
Carlos Renato Tavares de Castro, Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto
Carlos Renato Tavares de Castro

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento das ilustrações
Luiz Ricardo da Costa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Luiz Ricardo da Costa

Foto da capa
Naiara Zoccal Saraiva

1ª edição
Publicação digital (2023): PDF

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Gado de Leite

Avaliação do acúmulo lipídico em embriões bovinos / Naiara Zoccal Saraiva ... [et al.]. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2023.

PDF (19 p.) : il. -- (Documentos / Embrapa Gado de Leite, ISSN 1516-7453; 280).

1. Bovino leiteiro. 2. Reprodução animal. 3. Criopreservação. 4. Embrião animal. 5. Produção in vitro. I. Saraiva, Naiara Zoccal. II. Oliveira, Clara Slade. III. Quintão, Carolina Capobiango Romano. IV. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida. V. Série.

CDD (21. ed.) 636.08241

Rosângela Lacerda de Castro (CRB-6/2749)

© Embrapa, 2023

Autores

Naiara Zoccal Saraiva

Médica-veterinária, doutora em Reprodução Animal, pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Clara Slade Oliveira

Médica-veterinária doutora em Reprodução Animal, analista da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Carolina Capobiango Romano Quintão

Farmacêutica e bioquímica, mestre em Genética e Biotecnologia, analista da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Luiz Sergio de Almeida Camargo

Médico-veterinário, doutor em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Apresentação

Os sistemas de produção leiteira têm sido beneficiados pelos avanços tecnológicos da reprodução animal no Brasil, particularmente pela produção *in vitro* de embriões (Pive). Apesar das vantagens proporcionadas por essa biotécnica reprodutiva em gado de leite, ainda existe o desafio da menor resistência dos embriões produzidos *in vitro* ao processo de criopreservação, o que em parte está associado ao acúmulo de lipídios nas células.

Assim, a avaliação do comportamento de gotas lipídicas durante o desenvolvimento embrionário inicial é um fator determinante para o sucesso da criopreservação de embriões bovinos. O objetivo deste documento é apresentar métodos de coloração disponíveis para avaliação do acúmulo lipídico em embriões bovinos, em particular dois protocolos usados rotineiramente no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, que permitem adequada avaliação de lipídios neutros tanto em microscopia de epifluorescência quanto em microscopia de campo claro.

Além da descrição pormenorizada dos protocolos, são apresentados métodos para quantificação do acúmulo lipídico, com auxílio do programa de imagens ImageJ®. As informações obtidas com esses protocolos podem ser utilizadas em conjunto à morfologia embrionária para indicar sistemas de Pive com maior qualidade sob a ótica de comportamento lipídico. Por serem técnicas simples e que não exigem equipamentos sofisticados, podem ser adotadas rotineiramente por laboratórios de pesquisa e comerciais.

Elizabeth Nogueira Fernandes
Chefe-Geral
Embrapa Gado de Leite

Sumário

Introdução.....	6
Diferenças entre embriões produzidos in vitro ou in vivo relacionadas ao conteúdo lipídico	7
Fatores que afetam o conteúdo de lipídios de embriões PIV	8
Métodos para avaliação de conteúdo lipídico em embriões bovinos	9
Quantificação do conteúdo lipídico embrionário	10
Protocolo para avaliação de acúmulo lipídico em microscopia de epifluorescência	11
Protocolo para avaliação de acúmulo lipídico em microscopia de campo claro	12
Considerações finais	15
Referências	15

Introdução

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial de produção de embriões bovinos. Considerado o maior produtor mundial de embriões bovinos entre 2012 e 2013, tornou-se líder no uso da produção *in vitro* de embriões (Pive) e definiu tendências que seriam observadas nos anos subsequentes em diversos países (Gonçalves; Viana, 2019), com o uso da Pive como técnica de eleição para multiplicação de material genético superior, correspondendo a 92,0% do total de embriões gerados no país.

A criopreservação permite a formação de bancos de embriões visando à conservação de material genético e transporte em longas distâncias, como em casos de importações e exportações, além da conservação de embriões excedentes de um programa de Pive para programação logística visando uso posterior. O uso de receptoras, cujo custo possui alta representatividade em programas de Pive/TE (Transferência de Embriões), também é otimizado com embriões congelados. Dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Iets) destacam que mais de 50% dos embriões bovinos transferidos em todo o mundo foram previamente submetidos à criopreservação, o que demonstra a importância da técnica. Apesar da maioria dos embriões produzidos *in vitro* (PIV) ainda ser transferida a fresco, o percentual de congelados (33,7%) segue tendência de crescimento. Assim, a criopreservação se mostra como importante ferramenta reprodutiva a fim de atender a demanda crescente por embriões para a bovinocultura.

Existem evidências de que os embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo* e essa criotolerância reduzida estaria associada ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006). Acredita-se que um possível mecanismo para a redução da criotolerância dos embriões PIV seja a peroxidação dos lipídios, que é acentuada pelo processo de criopreservação, resultando em aumento dos radicais livres oriundos da deterioração de lipídios.

Sabe-se que a qualidade oocitária e embrionária tem relação direta com os índices de criosobrevivência destas estruturas. Neste contexto, os lipídios possuem papel importante, já que são fundamentais na estrutura celular, na modificação de propriedades físicas e na função metabólica das membranas biológicas. O perfil de ácidos graxos e a razão saturado/insaturado influenciam nas propriedades físicas da membrana plasmática, afetando a resistência e a criopreservação dos embriões (Zeron et al., 2002). Além da diferença na quantidade de lipídios citoplasmáticos, o perfil de lipídios mais abundantes na membrana plasmática das células também difere. A composição de ácidos graxos de oócitos de alta e baixa qualidade difere basicamente no fato de que oócitos de alta qualidade contêm mais ácido oleico, linoleico e araquidônico (Hochi et al., 1999), indicando que a composição de ácidos graxos dos oócitos e seu ambiente influencia a competência de desenvolvimento.

Em estudo descritivo da ultraestrutura de embriões taurinos e zebuínos produzidos *in vivo*, constatou-se que os embriões taurinos possuem maior acúmulo lipídico do que os zebuínos, porém, são os embriões taurinos que se mostraram mais resistentes ao processo de criopreservação (Visintin et al., 2002). Sudano et al. (2012) realizaram estudo com duas subespécies (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) e duas origens (PIV vs. TE) e observaram que embriões da raça Simental (taurinos) apresentaram maior sobrevivência após a vitrificação que embriões da raça Nelore (zebuínos), apesar do maior conteúdo lipídico.

Além disso, o perfil de lipídios de membrana do tipo fosfolípidos (PC) e esfingomielinas (SM) foi característico para cada grupo, sugerindo marcadores lipídicos positivos [PC (34:2) e PC (36:5)] e negativos [PC (32:0) e PC (34:1)] da criotolerância embrionária.

Assim, esses resultados sinalizam para a importância da análise do comportamento lipídico dos embriões PIV, sendo essa questão crucial para o sucesso da criopreservação embrionária. Nesse sentido, o objetivo deste documento é apresentar métodos disponíveis de avaliação do acúmulo lipídico em embriões bovinos e descrever modificações que a equipe do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite realizou em dois protocolos específicos de coloração de lipídios neutros, para torná-los mais acessíveis à rotina laboratorial. Vale destacar que esse estudo contribui para o alcance do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) número 8, contido na Agenda 2030 proposta pela Organização das Nações Unidas (ONU), da qual o Brasil é signatário, com foco na meta 8.2 (Produtividade - Diversificação, modernização tecnológica e inovação), ao prover protocolos laboratoriais simples que permitem a avaliação lipídica de embriões produzidos *in vitro* e poderão contribuir para o avanço de índices de criosobrevivência embrionária, fundamental para a maior produtividade em programas de melhoramento genético de bovinos.

Diferenças entre embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* relacionadas ao conteúdo lipídico

Um fator importante que deve ser considerado no estudo do metabolismo lipídico durante o desenvolvimento inicial é a origem do embrião. Há relatos na literatura de que genes relacionados ao metabolismo de lipídios estão mais expressos nos embriões obtidos *in vivo* do que naqueles produzidos *in vitro* (Gad et al., 2012). Resultados sugerem que embriões PIV podem ter deficiências em utilizar os lipídios internos para a produção de ATP, possivelmente devido ao metabolismo ineficiente das mitocôndrias embrionárias (Farin et al., 2004; Barceló-Fimbres; Seidel Jr., 2007). Nesse sentido, Sudano et al. (2012, 2014) mostraram efeitos da origem dos embriões (*in vitro* vs *in vivo*) sobre o acúmulo lipídico e criotolerância, e segundo os autores, aparentemente, o conteúdo lipídico é consequência de uma série de eventos depreciativos da qualidade dos embriões PIV ao longo do sistema de cultivo *in vitro*, destacando-se a provável teoria do “unquiet metabolism”, ou seja, a ocorrência de um metabolismo exacerbado, que foi evidenciado pelo grande número de genes diferentemente expressos entre os embriões PIV e TE (origem *in vivo*).

Os triglicerídeos (TAG), a principal classe lipídica encontrada no citoplasma de células de mamíferos, são armazenados como gotículas lipídicas (Ferguson; Leese, 1999; Mckeegan; Sturmey, 2011). Enquanto os TAG são os mais sintetizados e estocados, representando 40% - 50 % do total de lipídios em embriões bovinos produzidos *in vivo*, nos embriões PIV eles podem chegar até 88% (Ferguson; Leese, 1999). Para o desenvolvimento embrionário inicial, as gotículas lipídicas parecem funcionar como fonte de energia para oócitos e embriões. Nas membranas celulares eucarióticas, no entanto, os fosfolípidos (PLs) são os lipídios mais abundantes (Van Meer et al., 2008), particularmente, fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomielinas (SM). Os PLs são unidades estruturais de membranas funcionais e sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas da membrana celular, incluindo fluidez, permeabilidade e comportamento da fase térmica (Sudano et al., 2016). Inclusive, foram descritas alterações na composição da membrana lipídica por espectrometria de massa de ionização por dessorção a laser

assistida por matriz (MALDI-MS), comparando-se blastocistos derivados in vivo e in vitro (Sudano et al., 2012).

Além do maior conteúdo lipídico, embriões produzidos in vitro também apresentaram níveis aumentados de transcritos para o gene ACSL3 em comparação a embriões de origem in vivo (Sudano et al., 2016). ACSLs (acil-CoA sintetases de cadeia longa) são uma família de enzimas (ACSL1, 3, 4, 5 e 6) que ativam ácidos graxos de cadeia longa para gerar acilCoA de cadeia longa, substrato essencial para a síntese de várias espécies lipídicas, incluindo TAG, éster de colesterol e PL (Fujimoto et al., 2007; Yao; Ye, 2008), potencialmente envolvidas com as vias metabólicas de lipídios de membrana em embriões bovinos e deposição de lipídeos citoplasmáticos (Edidin, 2003).

Os mecanismos pelos quais os embriões PIV acumulam mais lipídios do que os embriões produzidos in vivo ainda não estão totalmente elucidados; no entanto, alternativas como diferentes condições de meio de cultura, incluindo a adição de reguladores metabólicos lipolíticos (Sanches et al., 2013; Paschoal et al., 2017) e a redução ou remoção de soro fetal bovino (Sudano et al., 2011, 2014; Del Collado et al., 2014, 2015; Murillo et al., 2017), vem sendo propostas para reduzir esse problema. Nesse sentido, análises de conteúdo, como as descritas neste documento, e perfil lipídico de membranas contribuem para a avaliação da eficácia dessas estratégias.

Fatores que afetam o conteúdo de lipídios de embriões PIV

A alta sensibilidade ao resfriamento e congelação de embriões in vitro aparentemente está relacionada ao maior acúmulo de lipídios em suas células (Abe et al., 2002), dispostos na forma de gotículas lipídicas citoplasmáticas que, por sua vez, são constituídas predominantemente de triglicerídeos (Mckeegan; Sturmey, 2011). Um possível mecanismo para a redução da criotolerância dos embriões PIV é a peroxidação dos lipídios, que é acentuada pelo processo de criopreservação, resultando num aumento dos radicais livres oriundos da deterioração de lipídios poli-insaturados (Seidel Jr., 2006). Dessa maneira, o estudo do conteúdo e da composição lipídica dos embriões se tornou um dos principais focos de pesquisa na área da criopreservação embrionária.

Acredita-se que o soro fetal bovino (SFB), suplemento proteico normalmente utilizado nos meios de cultivo, está intimamente ligado a esse processo. Há diversos aspectos negativos presentes na utilização desse composto, sendo o excessivo acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas um deles (Abe et al., 1999; Rizos et al., 2003). Embora a alta quantidade de lipídios seja um fator limitante para a criopreservação, existe a necessidade da presença dessas estruturas devido à importância das mesmas no fornecimento energético para o metabolismo celular. Quando ocorre demanda de energia na célula, ácidos graxos são metabolizados na mitocôndria via β -oxidação para obtenção de ATP. Porém, durante a β -oxidação, são liberadas as espécies reativas de oxigênio (EROs) que, em altas concentrações, podem lesionar as mitocôndrias, comprometendo seu funcionamento (Duvnjak et al., 2007). A relação negativa existente entre o excesso de lipídios na Pive e a criotolerância embrionária, juntamente aos problemas causados por uma alta concentração de EROs, são os motivos pelos quais tem se estudado o acúmulo lipídico em oócitos e embriões produzidos in vitro.

Sudano et al. (2012) mostraram que a despeito do acúmulo lipídico estar diretamente associado com a redução da criotolerância, a qualidade dos embriões representados pela porcentagem de células em apoptose prediz melhor a sua capacidade de sobreviver após a criopreservação. Dessa maneira, os resultados recentes da literatura sugerem que o estudo da real contribuição do conteúdo lipídico dos embriões sobre a criotolerância deve ser expandido para a composição lipídica embrionária. Ainda, aparentemente as variações na composição lipídica não se resumem à origem in vivo ou in vitro do embrião, mas também às subespécies e raças utilizadas nos diferentes sistemas de produção. Recentemente, também se constatou que ocorre uma flutuação do perfil lipídico de membranas no decorrer do desenvolvimento embrionário pré-implantacional em mamíferos (Sudano et al., 2016) que, por sua vez, é um processo complexo e que envolve mudanças estruturais e moleculares dinâmicas.

Métodos para avaliação de conteúdo lipídico em embriões bovinos

Sabendo-se do possível efeito indesejável do acúmulo lipídico na Pive, é de grande interesse a caracterização do comportamento de gotas lipídicas nos embriões obtidos por esse processo. As gotas lipídicas citoplasmáticas são compostas por um núcleo de lipídios neutros, rodeado por uma camada de lipídios anfipáticos (fosfolipídios e colesterol) e proteínas (Olofsson et al., 2009). O núcleo hidrofóbico da gota tem como componentes principais os triacilgliceróis (TAGs) e os esteróis (Walther et al., 2009). Os TAGs, por sua vez, são compostos de três ácidos graxos associados a uma molécula de glicerol (Lenhinger et al., 2002).

Além do conteúdo de lipídios, estudos atuais mostram a importância de se compreender o perfil lipídico das membranas durante o desenvolvimento pré-implantação em mamíferos. Nesse sentido, mudanças na composição estrutural das membranas de lipídios podem ser prontamente detectadas por espectrometria de massa (Sudano et al., 2012). MALDI-MS provou ser uma ferramenta poderosa em lipidômica (Schiller et al., 2004), gerando PL (principalmente PC, PE e SM no modo de íon positivo) e perfis de TAG com manipulação simples de amostras e interpretação de dados, inclusive em oócitos e embriões bovinos (Ferreira et al., 2010; Sudano et al., 2012; Leão et al., 2015).

Apesar da importância do uso de ferramentas lipidômicas, o acesso e custo das análises ainda são fatores limitantes para alguns laboratórios de pesquisa e comerciais, de maneira que métodos mais simples para coloração de lipídios em rotinas laboratoriais de Pive são de interesse e podem ser mais facilmente adotados pelos mesmos. Para avaliação do conteúdo lipídico, geralmente são realizadas análises morfológicas dos embriões no estágio de blastocisto, visualizando-se as gotas lipídicas citoplasmáticas, por meio do uso de marcadores de lipídios neutros fluorescentes, como o Nile Red (Yang et al., 2010), LipidTOX™ (Del Collado et al., 2015) e BODIPY® 493/503 (Del Collado et al., 2017). Há também relatos de uso do corante Sudan Black B (Abe et al., 2002; Sudano et al., 2011) para avaliações em microscopia óptica. O Sudan Black B é um corante lipofílico utilizado em avaliações do conteúdo lipídico tanto em oócitos (Annes et al., 2019) quanto em embriões bovinos (Abe et al., 2002; Sudano et al., 2011), sendo que as imagens obtidas são transformadas em escala de cinza e analisadas quanto à área ocupada pelos lipídios sobre a área total do embrião.

O Nile Red (NR) é um corante fluorescente lipofílico, com efeito solvatocrômico (muda de cor em função da polaridade do solvente) bastante usado em protocolos para avaliação do acúmulo lipídico. De acordo com Romek et al. (2011), essa coloração possibilita quantificar o conteúdo de triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol tanto em oócitos quanto em embriões individuais de mamíferos. O espectro de emissão do NR muda para comprimentos de onda mais curtos à medida que a polaridade do solvente diminui, de maneira que a sonda se mostra adequada para distinguir e quantificar os tipos de lipídios com vários graus de polaridade, como os triglicerídeos, colesterol e fosfolipídios presentes nessas estruturas.

Outro fluoróforo intensamente fluorescente e intrinsecamente lipofílico é o BODIPY® (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno), e as sondas que incorporam este fluoróforo são mais propensas a mimetizar as propriedades dos lipídios naturais. A coloração com BODIPY® 493/503 demonstrou, por citometria de fluxo, ser mais específica para gotículas de lipídios celulares do que a coloração com Nile Red (Gocze et al., 1994). Os autores compararam a variação dos histogramas de fluorescência dos dois fluoróforos e mostraram que a variabilidade lipídica usando o corante mais específico (BODIPY®) para gotículas, reduziu a variabilidade em cerca de 44%.

Ainda, outro corante fluorescente que permite a realização de ensaios de acúmulo lipídico é o chamado LipidTOX™, que possui afinidade extremamente alta para gotículas de lipídios neutros. Esse fluoróforo foi desenvolvido para caracterizar os efeitos de drogas e outros compostos no metabolismo lipídico em linhagens celulares de mamíferos e, normalmente, são adicionados após a fixação das células, não requerendo etapas de lavagem subsequentes após a incubação com a amostra. As principais vantagens desses corantes de lipídios específicos (BODIPY® e LipidTOX™) em relação aos corantes convencionais, incluem formulação pronta para uso e flexibilidade para protocolos de multiplex. Nesse documento, sugerimos a seguir dois protocolos para coloração de lipídios neutros, normalmente utilizados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, tanto para visualização em microscopia de epifluorescência quanto em microscopia de campo claro, dependendo da infraestrutura do laboratório. Publicações da equipe contendo análises com esses protocolos e imagens respectivas, são mencionadas a seguir.

Quantificação do conteúdo lipídico embrionário

Após as colorações, a quantificação de gotas lipídicas normalmente é feita em programas específicos para processamento e análise de imagens, como o ImageJ®, por exemplo. Esse programa foi desenvolvido por Wayne Rasband, no *National Institute of Mental Health* (EUA), em linguagem Java, sendo o cálculo das áreas realizado pela contagem de pixels das regiões selecionadas ou por um algoritmo específico (Rasband, 2011). No ImageJ®, é possível processar imagens de 8, 16 e 32 bits e de diversos formatos, como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS.

As seções são medidas usando uma função de histograma em cada camada correspondente (azul ou verde, de acordo com o fluorocromo) que atribui valores de intensidade entre 0 e 170 para cada pixel. Os níveis de fluorescência do fundo (*background*) podem ser medidos para cada imagem e subtraídos do valor total de fluorescência do embrião, dependendo da coloração. Para a individualização das gotas lipídicas, o programa deve ser ajustado para detectar, individualizar e quantificar a área das gotas. Informações mais específicas quanto

às ferramentas utilizadas estão descritas a seguir, de acordo com o protocolo de coloração sugerido.

Protocolo para avaliação de acúmulo lipídico em microscopia de epifluorescência

Para a análise de lipídios neutros por meio de sondas fluorescentes, nosso grupo utiliza protocolo descrito por Del Collado et al. (2017), com algumas adaptações, descritas a seguir (tabela 1). BODIPY® 493/503 (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes™, D3922) é um corante fluorescente específico para lipídios neutros e permite avaliação do acúmulo lipídico em embriões durante o desenvolvimento inicial com bastante eficácia. O protocolo que sugerimos prevê a fixação de blastocistos e blastocistos expandidos (BL e BX) no dia 7 (Dia 0 = fecundação) em paraformaldeído a 4% e permite análises em microscopia de epifluorescência convencional.

Tabela 1. Protocolo para coloração com BODIPY® 493/503.

SOLUÇÃO ESTOQUE	
	1 mL
Corante BODIPY®	1 µL
Etanol 100%	49 µL
SOLUÇÃO DE USO	
	1 mL
Solução estoque	1 µL
PBS 1% BSA (fração V)	49 µL

Procedimento

- Fixar blastocistos expandidos em solução de paraformaldeído a 4% por 10 minutos;
- Permeabilizar os embriões em solução de Triton X-100 a 0,5% (PBS 1% BSA), por 5 minutos a 38°C (etapa opcional);
- Lavar os embriões 2 X em gotas de 100 µL de PBS com 1% BSA;
- Corar as estruturas com 10 µg/mL de Hoechst 33342 e BODIPY® 493/503 (1:50, solução de uso) durante 1 hora, em temperatura ambiente (proteger a placa da luz);
- Lavar os embriões 3 X em gotas de 100 µL de PBS com 1% BSA para retirar o excesso de corante;
- Montar as lâminas com glicerina (mínimo volume possível) e cobrir com lamínula;
- Visualizar em microscópio de epifluorescência em 350/461 nM (Hoechst, azul) e 490/504 nM (BODIPY®, verde), de acordo com a Figura 1.

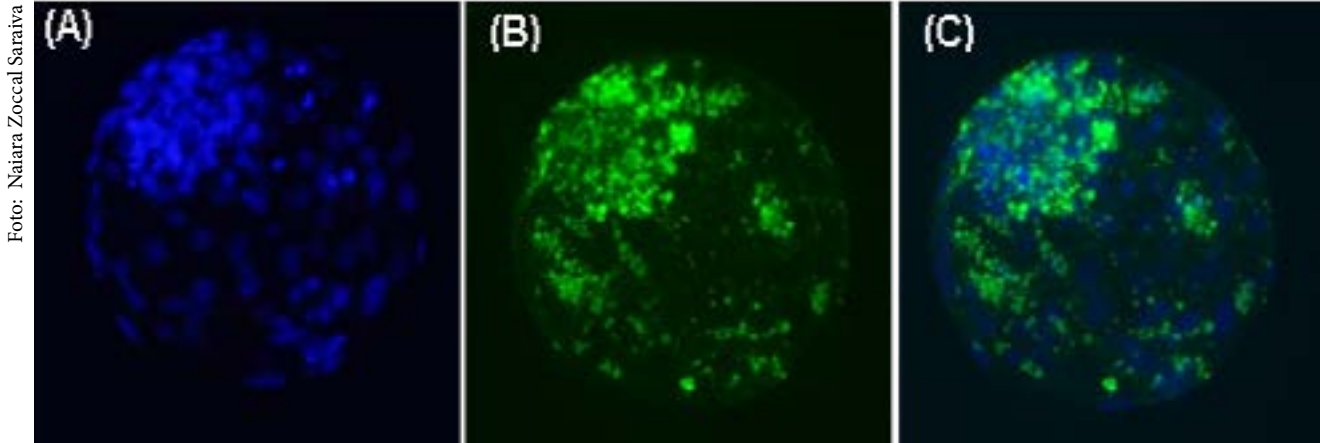


Figura 1. Imagens de blastocistos expandidos (BX) no D7, corados com BODIPY® 493/503 para análise de quantificação lipídica. (A) BX corado com Hoesht 33342 para quantificação de células totais; (B) BX corado com BODIPY® 493/503; (C) BX corado com Hoesht 33342 e BODIPY® 493/503.

Análise do conteúdo lipídico corado com BODIPY®:

- Abrir o software ImageJ®, acionar o comando “Open” no menu “File” e selecionar a imagem de interesse. Também é possível selecionar uma sequência de imagens, pelo comando “Import” seguido de “image sequence” no menu “File” (interessante caso tenham muitas imagens para processar);
- Transformar a imagem para escala de cinza, pelo comando “type” seguido de “32-bit”, no menu “Image” (também podem ser utilizados os comandos “8-bit” ou “16-bit”, ou a imagem original sem transformação);
- Abrir a função “Region of Interest” pelo comando “Tools” seguido de “ROI Manager”, no menu “Analyze”;
- Selecionar a área da estrutura a ser analisada, com a ferramenta apropriada na barra aparente do ImageJ® (“oval”, para imagens redondas, ou “polygon” ou “freehand” para estruturas com outros formatos). Clicar em “Add”, no “ROI Manager”. A seleção é feita somente na imagem trabalhada (importante no caso de usar “image sequence”).
- Analisar utilizando o comando “Measure” contido no “ROI Manager”. Os dados podem ser salvos ou copiados para o Excel.

IMPORTANTE: Este passo a passo indica as principais ações para mensuração de intensidade de fluorescência pelo ImageJ®. No entanto, passos adicionais podem ser necessários para a normalização dos resultados, dependendo de cada experimento. Recomenda-se extremo cuidado na aquisição das imagens, que não devem ter interferência da técnica entre grupos (exemplo, um grupo corado em dia diferente do outro, ou cada grupo fotografado com um parâmetro de ganho ou luz), e devem apresentar ausência ou mínimo background. Os resultados de “Area Fraction” (fração de área corada) e “Mean” (média de pixels) podem ser utilizados para comparação de grupos.

Protocolo para avaliação de acúmulo lipídico em microscopia de campo claro

Para avaliação de acúmulo lipídico em embriões durante o desenvolvimento inicial, as colorações de lipídios neutros são bastante utilizadas, porém, a maioria preconiza o uso

de sondas fluorescentes, o que implica na necessidade de microscopia de epifluorescência para as análises. Nesse sentido, nosso grupo adaptou protocolo inicialmente proposto para coloração de adipócitos com “OilRed O” (Janderová et al., 2003) para análises de lipídios neutros em oócitos e embriões, sendo que algumas modificações foram feitas ao longo do tempo (Monteiro et al., 2018; Leal et al., 2019; Oliveira et al., 2022).

O protocolo de coloração com “OilRed O” é simples e permite avaliação em microscópio óptico de campo claro. Informações semelhantes de acúmulo lipídico foram obtidas quando comparamos embriões bubalinos corados com “OilRed O” aos embriões expostos à sonda fluorescente BODIPY®, (Figueiró et al., 2020). O protocolo que sugerimos para coloração de lipídios neutros com “OilRed O” (Sigma-Aldrich, catalog number O-0625) em embriões bovinos, prevê a fixação de blastocistos e blastocistos expandidos (BL e BX) no dia 7, em paraformaldeído 4% e está descrito a seguir na tabela 2:

Tabela 2. Protocolo de coloração com “OilRed O”.

SOLUÇÃO ESTOQUE			
	5 mL	10 mL	20 mL
Corante OilRed O	0,0175 g	0,035 g	0,07 g
Isopropanol	5 mL	10 mL	20 mL
SOLUÇÃO DE USO			
	1 mL	2 mL	3 mL
Corante OilRed O	0,0175 g	0,035 g	0,07 g
Isopropanol	5 mL	10 mL	20 mL

Procedimento:

- Imergir as estruturas (oócitos ou embriões) em gotas de 200 µl a 400 µl de solução de etanol 50 % (etanol e água destilada) por 2 minutos;
- Transferir as estruturas com 100 µL de solução para tubo cônico (0,2 mL) e aguardar pelo menos 1 minuto com o tubo em posição vertical, para que elas se depositem no fundo do tubo;
- Retirar 90 µL de solução sobrenadante, observando em lupa para não retirar as estruturas (tempo total de passagem em etanol 50 %: 2 minutos);
- Acrescentar 100 µL de solução de uso de Oil Red (filtrada) e deixar por 15 minutos em temperatura ambiente;
- Retirar 90 µL de solução sobrenadante, observando em lupa;
- Adicionar 100 µL de PBS 1 % BSA no tubo cônico com as estruturas;
- Transferir o conteúdo para a placa e lavar mais 2 X em PBS 1% BSA (gotas de 50 - 100 µL);
- Montar as lâminas com glicerina e cobrir com lamínula;
- Visualizar em microscópio de campo claro, de acordo com a Figura 2.



Figura 2. Demonstração de gotas lipídicas embrionárias após coloração de blastocistos expandidos (BX) com OilRed O e visualização em microscopia óptica.

Análise do conteúdo lipídico corado com OilRed O:

- Abrir o *software* ImageJ®, acionar o comando “Open” no menu “File” e selecionar a imagem de interesse. Também é possível selecionar uma sequência de imagens usando o comando “Import” seguido de “image sequence” no menu “File” (interessante caso haja muitas imagens para processar);
- Transformar a imagem para escala de cinza, pelo comando “type” seguido de “32-bit”, no menu “Image” (também podem ser utilizados os comandos “8-bit” ou “16-bit”);
- Inverter a imagem, para que os pontos corados sejam mais luminosos e assim detectáveis pelo ImageJ®. Utilizar o comando “Invert”, no menu “Image”;
- Abrir a função “Region of Interest” pelo comando “Tools” seguido de “ROI Manager”, no menu “Analyze”;
- Selecionar a área da estrutura a ser analisada, com a ferramenta apropriada na barra aparente do ImageJ® (“oval”, para imagens redondas, ou “polygon” ou “freehand” para estruturas com outros formatos). Clicar em “Add”, no “ROI Manager”. A seleção é feita somente na imagem trabalhada (importante no caso de usar “image sequence”);
- Ajustar o limite de detecção no comando “Adjust” seguido de “Threshold”, no menu “Analyze”. Alterar a entrada e saída do histograma de forma que o programa detecte somente as áreas coradas. Este ajuste deve ser o mesmo para todas as imagens do experimento (caso não se trabalhe com “image sequence”, gravar os valores para repetir nas próximas imagens);
- Deixar o “Dark background” selecionado (disponível apenas para algumas versões do software);
- Executar a calibração efetuada clicando em “Apply”;
- Analisar utilizando o comando “Measure” contido no “ROI manager”. Os dados podem ser salvos ou copiados para Excel.

IMPORTANTE: Para ter certeza de que a calibração foi efetiva, recomendamos que seja realizado um teste com pelo menos duas imagens, uma muito e outra pouco corada.

Comparar os resultados de “Area Fraction” (fração de área corada) e “Mean” (média de pixels) para garantir que refletem a detecção adequada.

Considerações finais

Apesar das vantagens proporcionadas pela Pive para a bovinocultura, ainda existe o desafio da menor resistência desses embriões ao processo de criopreservação, sendo que a alta sensibilidade ao processo vem sendo associada ao maior acúmulo de lipídios nas células, predominantemente de TAGs. Embora a alta quantidade de lipídios seja um fator limitante para a criopreservação, existe a necessidade da presença dessas estruturas devido à sua importância no fornecimento energético dentro de qualquer célula. Assim, essa relação entre conteúdo lipídico e criotolerância deve ser considerada nos diferentes protocolos e sistemas de produção *in vitro*, de maneira que análises simplificadas do conteúdo de lipídios dos embriões, como os protocolos sugeridos com uso do “OilRed O” ou BODIPY®, contribuem nesse sentido e devem ser consideradas.

Ainda, relatos recentes sugerem que o estudo sobre conteúdo lipídico deve ser expandido para a composição lipídica dos embriões e que essa questão é crucial para o sucesso da criopreservação. Aparentemente, as variações na composição lipídica não se resumem apenas à origem *in vivo* ou *in vitro* do embrião, mas também às subespécies e possivelmente, às próprias raças utilizadas nos diferentes sistemas, mostrando a complexidade desse processo metabólico.

Referências

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum free medium or in serum supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 325-335, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199907\)53:3%3C325::aid-mrd8%3E3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199907)53:3%3C325::aid-mrd8%3E3.0.co;2-t)
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.1131>
- ANNES, K.; MULLER, D. B.; VILELA, J. A. P.; VALENTE, R. S.; CAETANO, D. P.; CIBIN, F. W. S.; MILAZZOTTO, M. P.; MESQUITA, F. S.; BELAZ, K. R. A.; EBERLIN, M. N.; SUDANO, M. J. Influence of follicle size on bovine oocyte lipid composition, follicular metabolic and stress markers, embryo development and blastocyst lipid content. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 3, p. 462-472, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1071/rd18109>
- BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL JUNIOR, J. E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 11, p. 1406-1418, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.20700>

DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N. Z.; LOPES, F. L.; CRUZ, M. H. C.; GASPAR, R. C.; OLIVEIRA, C. S.; PERECIN, F.; GARCIA, J. M. Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação in vitro de oócitos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 689-694, 2014.

DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N. Z.; LOPES, F. L.; GASPAR, R. C.; PADILHA, L. C.; COSTA, R. R.; ROSSI, G. F.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 28, n. 11, p. 1721-1732, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1071/rd15067>

DEL COLLADO, M.; SILVEIRA, J. C.; SANGALLI, J. R.; ANDRADE, G. M.; SOUSA, L. R. da S.; SILVA, L. A.; MEIRELLES, F. V.; PERECIN, F. Fatty acid binding protein 3 and transzonal projections are involved in lipid accumulation during in vitro maturation of bovine oocytes. **Scientific Reports**, v. 7, article 2645, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02467-9>

DUVNJAK, M.; LEROTI, I.; BARSIC, N.; TOMASIC, V.; VIROVIC JUKIC, L.; VELAGIC, V. Pathogenesis and management issues for nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 34, p. 4539-4550, 2007. DOI: <https://doi.org/10.3748%2Fwjg.v13.i34.4539>

EDIDIN, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 414-418, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm1102>

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 53-62, 2004. DOI: https://doi.org/10.2527/2004.8213_supple53x

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, n. 2, p. 373-378, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1160373>

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; CATHARINO, R. R.; GARCIA, J. S.; GOZZO, F. C.; SANVIDO, G. B.; SANTOS, L. F.; LO TURCO, E. G.; PONTES, J. H.; BASSO, A. C.; BERTOLLA, R. P.; SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V.; SANGALLI, J. R.; EBERLIN, M. N. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 5, p. 1218-1227, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1194%2Fjlr.D001768>

FIGUEIRÓ, M.; GARCIA, J.; LIMA, M. de; DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N. Is it possible to alter the embryo lipid accumulation with reduction of fetal bovine serum and use of l-carnitine for in vitro maturation of bubaline oocytes? **Zygote**, v. 28, n. 2, p. 109-115, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1017/S096719941900073X>

FUJIMOTO, Y.; ITABE, H.; KINOSHITA, T.; HOMMA, K. J.; ONODUKA, J.; MORI, M.; YAMAGUCHI, S.; MAKITA, M.; HIGASHI, Y.; YAMASHITA, A.; TAKANO, T. Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 1280-1292, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.m700050-jlr200>

GAD, A.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M.; TESFAYE, D. Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1/2, p. 76-83, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.014>

GOCZE, P. M.; FREEMAN, D. A. Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 Leydig tumor cells. **Cytometry**, v. 17, n. 2, p. 151-158, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.990170207>

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 156-159, 2019. Edição dos resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Gramado, RS, Brasil, 15 a 17 de maio 2019.

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 497-504, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00146-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00146-6)

JANDEROVÁ, L.; MCNEIL, M.; MURRELL, A. N.; MYNATT, R. L.; SMITH, S. R. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. **Obesity Research**, v. 11, n. 1, p. 65-74, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/oby.2003.11>

LEAL, G. R.; MONTEIRO, C. A. dos S.; SARAIVA, H. F. R. de A.; CAMARGO, A. J. dos R.; RODRIGUES, A. L. R.; OLIVEIRA, C. S.; SERAPIÃO, R. V. Evaluation of the Simulated Physiological Oocyte Maturation (SPOM) system on F1 Gyr× Holstein oocytes and embryos. **Animal Production Science**, v. 59, n. 4, p. 634-640, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1071/AN17895>

LEÃO, B. C.; ROCHA-FRIGONI, N. A.; CABRAL, E. C.; FRANCO, M. F.; FERREIRA, C. R.; EBERLIN, M. N.; FILGUEIRAS, P. R.; MINGOTI, G. Z. Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 23, n. 5, p. 732-741, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0967199414000380>

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Biossíntese de lipídios. In: LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 599-638.

MCKEEGAN, P. J.; STURMEY, R. G. The role of fatty acids in oocyte and early embryo development. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 24, n. 1, p. 59-67, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1071/rd11907>

MONTEIRO, C. A. S.; SARAIVA, H. F. R. A.; LEAL, G. R.; CAMARGO, A. J. D. R.; SERAPIÃO, R. V.; FERREIRA, A. M. R.; RODRIGUES, A. L. R.; NOGUEIRA, L. A. G.; OLIVEIRA, C. S. Breed composition does not influence the performance of Holstein-Gyr crossbred as oocyte donors for OPU/IVP. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 71-74, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-2017-AR978>

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551-1562, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.020>

MURILLO, A.; MUÑOZ, M.; MARTÍN-GONZÁLEZ, D.; CARROCERA, S.; MARTÍNEZ-NISTAL, A.; GÓMEZ, E. Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 2, p. 162-171, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.04.002>

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. 30, n. 2, p. 258-266, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0967199421000629>

OLOFSSON, S. O.; BOSTRÖM, P.; ANDERSSON, L.; RUTBERG, M.; PERMAN, J.; BORÉN, J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 448-458, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.08.001>

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.; 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. 87, p. 108-114, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.011>

RASBAND, W. **ImageJ**. [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/index.htm>. Acesso em: 3 nov. 2022.

RIZOS, D.; GUTIERREZADAN, A.; PEREZGARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>

ROMEK, M.; GAJDA, B.; KRZYSZTOFOWICZ, E.; KEPCZYNSKI, M.; SMORAG, Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 42-54, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.040>

SANCHES, B. V.; MARINHO, L. S. R.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; PONTES, J. H. F.; BASSO, A. C.; MEIRINHOS, M. L. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; FERREIRA, C. R.; SENEDA, M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 372-377, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.026>

SCHILLER, J.; SÜSS, R.; ARNHOLD, J.; FUCHS, B.; LESSIG, J.; MÜLLER, M.; PETKOVIĆ, M.; SPALTEHOLZ, H.; ZSCHÖRNIG, O.; ARNOLD, K. Matrix assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 5, p. 449-488, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.08.001>

SEIDEL JR., G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 228-235, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.025>

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; RASCADO, T. S.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; MARTINS JUNIOR, A.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. da C. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 124-131, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0967199412000196>

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; RASCADO, T. S.; MAGALHAES, L. C.; CROCOMO, L. F.; LIMA-NETO, J. F. de; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211-1220, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.033>

SUDANO, M. J.; RASCADO, T. D.; TATA, A.; BELAZ, K. R.; SANTOS, V. G.; VALENTE, R. S.; MESQUITA, F. S.; FERREIRA, C. R.; ARAÚJO, J. P.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. de C. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 472-484, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.025>

SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; TATA, A.; FERREIRA, C. R.; PASCHOAL, D. M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 6, article 130, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102897>

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112-124, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm2330>

VISINTIN, J. A.; MARTINS, J. F. P.; BEVILACQUA, E. M.; MELLO, M. R. B.; NICÁCIO, A. C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 345-359, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00675-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00675-6)

WALTHER, T. C.; FARESE JR, R. V. The life of lipid droplets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 459-466, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2008.10.009>

YANG, X.; DUNNING, K. R.; WU, L. L.; HICKEY, T. E.; NORMAN, R. J.; RUSSELL, D. L.; LIANG, X.; ROBKER, R. L. Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 22, n. 8, p. 1262-1271, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1071/rd10091>

YAO, H.; YE, J. Long chain Acyl-CoA synthetase 3-mediated phosphatidylcholine synthesis is required for assembly of very low density lipoproteins in human hepatoma Huh7 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 2, p. 849-854, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m706160200>

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 271-278, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.1156>



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA

