

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Efeito do butafosfan na qualidade oocitária e  
embrionária e na modulação da inflamação**

**Lucas Teixeira Hax**

Pelotas, 2016

**Lucas Teixeira Hax**

**Efeito do butafosfan na qualidade oocitária e embrionária e na modulação da  
inflamação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

**Orientador:** Marcio Nunes Corrêa

**Coorientador(es):** Augusto Schneider

Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

H411e Hax, Lucas Teixeira

Efeito do butafosfan na qualidade oocitária e embrionária e na modulação da inflamação / Lucas Teixeira Hax ; Marcio Nunes Corrêa, orientador ; Augusto Schneider, Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, coorientadores. — Pelotas, 2016.

104 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Butafosfan. 2. Reprodução. 3. Maturação in vitro. 4. Inflamação. 5. Obesidade. I. Corrêa, Marcio Nunes, orient. II. Schneider, Augusto, coorient. III. Pegoraro, Lígia Margareth Cantarelli, coorient. IV. Título.

CDD : 574.33

## **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro (EMBRAPA Clima Temperado)

Prof. Dr<sup>a</sup>. Jorgea Pradise (EMBRAPA Clima Temperado)

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino (UFPel, Centro de Ciências Químicas,  
Farmacêuticas e de Alimentos)

Prof. Dr. Marcio Nunes Corrêa (Orientador, UFPel, Faculdade de Veterinária)

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus por todas as condições de realizar essa atividade.

Agradeço aos meus pais, Mario e Vanda Hax e à minha família, pela formação que me permitiu chegar a esse momento e pelo incondicional apoio em todas as situações.

À minha namorada, amiga, colega e companheira que tanto admiro, Thaís Larré, pelo suporte emocional e apoio técnico nos mais variados momentos, me trazendo tranquilidade e alegrias para atravessar as diferentes fases desse período.

Ao meu amigo e colega Joao Rincón, companheiro de muitos momentos desse trabalho e fundamental para seu desenvolvimento.

Ao meu orientador, Dr. Marcio Nunes Corrêa, pelos ensinamentos, estrutura, apoio, compreensão e confiança no trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Augusto Schneider, que mais que um orientador foi sempre um amigo, que sempre me ajudou mesmo estando por vezes no outro lado do mundo.

À minha coorientadora, Dra. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro, que me acolheu de portas abertas no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Clima Temperado – ETB, e a toda equipe pelos ensinamentos, apoio no desenvolvimento das atividades e amizades construídas.

Ao frigorífico Famile e à equipe do serviço de inspeção estadual pelo apoio no fornecimento dos ovários.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERGS e à EMBRAPA pelo financiamento da pesquisa.

Ao Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária e a toda sua equipe pelo apoio, estrutura, oportunidades e amizades durante toda a graduação e pós-graduação.

## Resumo

HAX, Lucas. **Efeito do butafosfan na qualidade oocitária e embrionária e na modulação da inflamação.** 2016. 105f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A obesidade é uma enfermidade que afeta fêmeas bovinas no pré-parto e indivíduos da espécie humana. Essa doença é acompanhada de um quadro inflamatório crônico que leva a resistência à insulina e reduz a fertilidade em mamíferos. Uma alternativa para melhora da fertilidade são os programas de reprodução assistida. No entanto, a eficácia da produção *in vitro* de embriões (PIVE) é menor que a *in vivo* em virtude da reduzida aquisição de competência dos oócitos maturados em laboratório. Os processos compreendidos no desenvolvimento da obesidade e na maturação oocitária são regulados por cascatas de fosforilação. Nesse contexto, o butafosfan, uma molécula de fósforo orgânico doadora de íons fosfato, tem sido descrita como modulador metabólico. Além de modulador da lipólise, o butafosfan tem sido amplamente utilizado em fêmeas submetidas a protocolos de reprodução assistida, porém, com base em dados majoritariamente empíricos. Baseado nessas informações, o objetivo desse estudo foi verificar o efeito da molécula de butafosfan na qualidade oocitária e embrionária de bovinos e em marcadores ligados à sinalização inflamatória na gordura visceral de camundongos. Primeiramente, foi avaliado o efeito da adição de butafosfan ao meio de maturação *in vitro* (MIV) na qualidade do oócito e desenvolvimento de embriões bovinos. No segundo experimento, foi estudado o efeito do butafosfan em camundongos alimentados com dieta hipercalórica e submetidos à restrição alimentar. No primeiro estudo, foi observado que o butafosfan apresentou um efeito tóxico dose-dependente, reduzindo a taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário a medida que foi utilizada uma maior concentração durante a MIV. No segundo experimento, foi observado que a dieta hipercalórica aumentou a expressão gênica e a concentração sérica de marcadores inflamatórios ligados à obesidade e à resistência à insulina. No entanto, em animais tratados com butafosfan, esses marcadores regrediram a patamares semelhantes aos animais submetidos à restrição alimentar ou que receberam a dieta controle. A conclusão desses estudos é que, nas doses estudadas, a suplementação do meio de MIV com butafosfan prejudica o desenvolvimento embrionário. Por outro lado, o butafosfan reduz a sinalização inflamatória ligada à obesidade e a resistência a insulina. Tais resultados sugerem o butafosfan como alternativa para redução dos efeitos da obesidade, podendo assim contribuir de forma indireta com a fertilidade. Assim, é possível que o butafosfan possa ser empregado no tratamento da obesidade e, conseqüentemente, no aumento da fertilidade em indivíduos submetidos a programas de reprodução assistida.

**Palavras-chave:** Butafosfan, Inflamação, Obesidade, Reprodução, Maturação *in vitro*

## Abstract

HAX, Lucas. **Effect of butaphosphan in oocyte and embryo quality and in modulation of inflammation**. 2016. 105f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Obesity is a disease that affects pre-partum bovine female and humans. It is characterized by a chronic inflammation that leads to insulin resistance and reduces fertility in mammals. Assisted reproduction programs are an alternative for improving fertility. However, the efficacy of embryo *in vitro* production (IVP) is limited, which is attributed to a lower ability of oocytes to reach competence than oocytes matured *in vivo*. The processes involved in the obesity development and oocyte maturation are regulated by phosphorylation cascades. In this context, butafosfan has been described as a metabolic modulator. Butafosfan is a molecule of organic phosphorus that acts donating phosphate ions. This molecule has been described as a lipolysis modulator. In addition, butafosfan has been widely used in females submitted to assisted reproduction programs. However, its use is mostly based on empirical data. Thus, the aim of this study was to verify the effect of butafosfan on bovine oocyte and embryonic quality and on markers related to inflammatory signaling on visceral fat of mice. Firstly, the effect of butafosfan added in medium for *in vitro* maturation (IVM) was evaluated in terms of oocyte quality and development of bovine embryos. In the second experiment, the effect of butafosfan was studied in mice fed with a hypercaloric diet and submitted to food restriction. In the first study, butafosfan showed a dose-dependent prejudicial effect, reducing the cleavage rate and embryonic development as a higher concentration was used during IVM. In the second experiment, the hypercaloric diet increased the gene expression and the serum concentration of inflammatory markers related to obesity and insulin resistance. However, in animals treated with butafosfan, these markers were decreased to similar levels similar to those animals submitted to food restriction or that received the control diet. In conclusion, supplementation of IVM medium with butafosfan at the concentrations evaluated impairs embryonic development. Conversely, butafosfan reduces inflammatory signaling related to obesity and insulin resistance. These results suggest that butafosfan may be an alternative to reduce the effects of obesity, contributing indirectly to improve fertility. Thus, it is possible that butafosfan may be used to treat obesity and, consequently, improve fertility in individuals undergoing assisted reproduction programs.

**Keywords:** Butafosfan, Inflammation, Obesity, Reproduction, *In vitro* maturation

## Lista de Abreviaturas

- PIVE – Produção *in vitro* de embriões
- MIV – Maturação *in vitro*
- IVP – *In vitro* production
- IVM – *In vitro* maturation
- BEN – Balanço energético negativo
- AGNEs – Ácidos graxos não esterificados
- BHBA – Beta hidroxibutirato
- ATP – Adenosina trifosfato
- IK $\beta$  – Inibidor Kappa beta
- NF-K $\beta$  – Nuclear factor Kappa beta
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- FIV – Fertilização *in vitro*
- CIV – Cultivo *in vitro*
- $\mu$ m – micrometros
- MII – Metáfase II
- LH – Luteinizing hormone
- EGF – Epidermal growth factor
- AREG – Anfiregulina
- EREG – Epiregulina
- MPF – Maturation promoter factor
- Cdk1 – Ciclina catalítica dependente de kinase 1
- APC – Anaphase promoter complex
- CSF – Citostatic factor



cAMP – Ciclic adenosine monophosphate

AC – Adenilato ciclase

PKA – Proteína kinase A

PDE – Phosphodiesterase

MAPK – Mitogen activated protein kinase

MI – Metáfase I

DHA - Docosahexaenoic acid

$\mu\text{M}$  – Micromolar

CLA – Conjugated linoleic acid

LPA – Lysphosphatidic acid

GDF-9 – Growth differentiation factor

BMP15 – Bone morphogenetic protein 15

PLAC8 – Placenta específico 8

DNA - Deoxyribonucleic acid

SOD – Superóxido dismutase

PON-1 – Paraoxonase 1

HDL – High density lipoprotein

SFB – Soro fetal bovino

BSA-FAF – Bovine serum albumin – fat acids free

BSA – Bovine serum albumin

pH – Potencial hidrogeniônico

FSH – Follicule stimulant hormone

eCG – Equine corionic gonadotropin

hCG – Human corionic gonadotropin

FSK – Forskolina

IBMX – 3-isobutil-1-metilxantina

AMPK – 5' AMP-activated protein kinase

AMP – Adenosina monofosfato

NEFA – Non-sterified fatty acids

TNF $\alpha$  – Tumoral necrosis factor  $\alpha$

Il-6 – Interleucina 6

Il-1 $\beta$  – Interleucina 1 $\beta$

IRS-1 – Insulin receptor 1

Il-10 – Interleucina 10

STAT3 – Signal transducer and activator of transcription 3

ERK – Extracellular signa-regulated kinase

## Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	36
3.1 Hipótese.....	36
3.2 Objetivo Geral .....	36
3.3 Objetivos Específicos.....	36
4 CAPÍTULOS .....	37
4.1 Artigo 1 - Effect of butafosfan on oocyte maturation and bovine embryo development.....	37
4.2 Artigo 2 - Effect of butafosfan on the regulation of inflammatory markers in adipose tissue of mice submitted to a hypercaloric diet and dietary restriction .....	62
5 CONCLUSÃO GERAL.....	82
6 REFERÊNCIAS .....	83
8 ANEXOS .....	98
Anexo A – Artigo publicado durante o doutorado.....	98

## 1 1 INTRODUÇÃO GERAL

2

3 A obesidade compõe um grupo de enfermidades chamadas de “doenças da  
4 civilização” (Bastos et al., 2009). Caracterizada como uma doença inflamatória (Das,  
5 2001), a obesidade reduz a fertilidade em fêmeas mamíferas (Armstrong et al., 2001,  
6 Nolan et al., 1998). Conseqüentemente, a busca de alternativas para mitigar os  
7 problemas decorrentes da obesidade passa pelo entendimento do seu mecanismo  
8 de regulação.

9 Essa enfermidade acomete vacas que recebem um excesso de alimentação  
10 no período seco, visando altas produções no pós-parto e vacas de alto mérito  
11 genético em função do alto preparo que recebem para participação em exposições e  
12 campeonatos morfológicos. Em função do elevado mérito genético, esses animais  
13 são submetidos a programas de reprodução assistida a fim de acelerar a  
14 multiplicação desses indivíduos. No entanto, alguns animais não apresentam um  
15 adequado desempenho nesses programas, ficando muitas vezes inviável a  
16 aplicação de biotécnicas da reprodução para uma maior multiplicação desse material  
17 genético (Baruselli et al., 2010). Além disso, as biotécnicas reprodutivas também  
18 possibilitam o sucesso na gravidez de mulheres com problemas de fertilidade (Galli  
19 et al., 2014), da mesma forma que distúrbios metabólicos também interferem no  
20 resultado desse processo.

21 O sistema reprodutivo, bem como as repostas à sua manipulação, depende  
22 da condição metabólica do indivíduo (Webb et al., 2007). Nesse contexto, o  
23 butafosfan, uma molécula de fósforo orgânico, vem sendo estudada como  
24 modulador metabólico (Pereira et al., 2013), representando assim uma alternativa a  
25 ser especulada para a melhora do metabolismo do oócito e embrião, bem como na  
26 regulação de mediadores inflamatórios relacionados ao quadro de obesidade.

27 Em vacas, a utilização de butafosfan associado à cianocobalamina é  
28 amplamente difundida em fêmeas submetidas a programas de reprodução assistida,  
29 porém, com base apenas em dados empíricos. Segundo Lima (2014) e  
30 colaboradores, a utilização de butafosfan associado à cianocobalamina em vacas  
31 submetidas à aspiração folicular aumenta o número e a qualidade dos oócitos  
32 recuperados.

33 O butafosfan associado à cianocobalamina pode aumentar a saúde hepática  
34 via redução da intensidade do balanço energético negativo (BEN) no pós-parto de  
35 vacas leiteiras. Estudos apontam que esse efeito ocorre em razão da melhora da  
36 condição energética intracelular atribuída ao aumento na síntese de ATP  
37 proveniente do butafosfan (Furll et al., 2010, Pereira et al., 2013, Rollin et al., 2010).  
38 Por conseguinte, ocorre uma redução da mobilização lipídica e concentrações de  
39 ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e beta-hidroxibutirato (BHBA), compostos  
40 que apresentam efeito prejudicial à fertilidade (Vanholder et al., 2006).

41 Além do efeito na modulação da lipólise, é possível que o butafosfan interfira  
42 nos mecanismos de sinalização celular e molecular através da doação de íons  
43 fosfato que podem alterar a fosforilação e desfosforilação de moléculas envolvidas  
44 nesse processo. É conhecido que os eventos que compreendem a maturação  
45 oocitária, bem como a produção de adipocinas que relacionadas à obesidade, são  
46 regulados por cascatas intracelulares de fosforilação e desfosforilação (Chiellini et  
47 al., 2002, Colgan et al., 1996, Gavin and Schorderet-Slatkine, 1997, Thach, 1992).

48 Dessa forma, este trabalho buscou estudar o efeito do butafosfan na  
49 reprodução de forma local, utilizando-o como suplemento ao meio de MIV, e seu  
50 efeito sobre a qualidade de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*. Além  
51 disso, este estudo investigou o efeito metabólico do butafosfan na modulação da  
52 inflamação na gordura visceral de camundongos.

## 53 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

54

### 55 2.1 Butafosfan

56 O butafosfan é uma molécula de fósforo orgânico derivada do ácido fosfórico  
57 que atua como doadora de íons fostato, essenciais para o metabolismo celular  
58 (Viertel, 1991, Cuteri et al., 2007). O fósforo é fundamental para a manutenção das  
59 funções biológicas. Nas membranas, o fósforo compõe os fosfolipídios (Gatiboni et  
60 al., 2002), contribuindo para a estabilidade estrutural e crescimento das células.  
61 Além de compor as membranas que regulam a concentração celular dos solutos, o  
62 fósforo atua em um dos principais sistemas de tamponamento intracelular, o  
63 sistema-tampão fosfato, mantendo o equilíbrio ácido básico dos fluidos (Hill et al.,  
64 2008).

65 Dentre outras funções do fósforo está a composição de fosfoproteínas na  
66 fosforilação oxidativa e na síntese de adenosina trifosfato (ATP). Tabeleão e  
67 colaboradores (2014) observaram uma redução na contagem de células somáticas  
68 (CCS) em vacas diagnosticadas com mastite clínica que receberam butafosfan em  
69 relação a vacas com mastite clínica que não receberam a molécula (Tabeleão,  
70 2014). Segundo o autor, é provável que a redução na CCS tenha se dado pelo  
71 aumento na vida útil dos neutrófilos em função do fósforo doado pelo butafosfan.  
72 Esses íons fosfato servem de substrato para a enzima tirosina quinase, que atua na  
73 fosforilação das proteínas do citoesqueleto dos neutrófilos. A fosforilação do  
74 citoesqueleto permite a emissão de pseudópodes, diferenciação e proliferação dos  
75 neutrófilos, o que contribui para o aumento da sua vida útil.

76 Somado a isso, o fósforo proveniente do butafosfan pode contribuir na  
77 fosforilação do inibidor Kappa-B (IKB), permitindo a translocação do fator de  
78 transcrição nuclear Kappa-B (NF-KB) para o interior do núcleo. O NF-KB atua em  
79 nível nuclear estimulando a síntese de citocinas. Dessa forma, há um aumento na  
80 quimiotaxia decorrente das citocinas, aumentando o aporte de leucócitos no local da  
81 infecção, contribuindo para a diminuição da carga microbiana na glândula mamária e  
82 conseqüentemente acelerando a debelação da enfermidade. Assim, é possível que  
83 o butafosfan desempenhe um papel na modulação da inflamação, contribuindo para  
84 o sistema imune do indivíduo. Por outro lado, o aumento do aporte de fósforo pode

85 inibir essas reações, causando um efeito anti-inflamatório. No entanto, o efeito da  
86 adição de fósforo nas reações de sinalização celular e molecular ainda deve ser  
87 elucidado.

88 Mais de 80% do fósforo presente no organismo se encontra nos ossos e  
89 dentes (McDonald et al., 2002). Assim, quando a exigência de fósforo não é  
90 atendida pela dieta, as células dos tecidos moles são primeiramente afetadas, visto  
91 que seu suprimento de fósforo depende da disponibilidade do mineral na dieta. Em  
92 ruminantes, a hipofosfatemia causa redução na produção (McDowell, 1985,  
93 Ternouth, 1990) e pode prejudicar a viabilidade das hemácias no pós-parto, podendo  
94 culminar em um quadro de anemia hemolítica com hemoglobinemia (Riet-Correa et  
95 al., 2007). Tal situação ocorre em função da redução de ATP intracelular  
96 decorrente da hipofosfatemia. Dessa forma, há um acúmulo de cálcio intracelular  
97 que passa a ser tóxico para a célula, levando-a a perda de função e morte celular  
98 (Eisenberg et al., 2014).

99 Associado à cianocobalamina, o butafosfan apresentou efeitos positivos na  
100 foliculogênese de vacas (Lima, 2014). Segundo Lopes (2010) e colaboradores, em  
101 ruminantes, há um estímulo à foliculogênese e redução da mortalidade embrionária  
102 em função do aporte energético decorrente do tratamento com butafosfan associado  
103 à cianocobalamina.

104 Em nível hepático, o butafosfan associado à cianocobalamina pode aumentar  
105 a saúde do hepatócito em função de reduzir a intensidade do balanço energético  
106 negativo (BEN) no pós-parto de vacas leiteiras. Isso ocorre em virtude da melhora  
107 da condição energética intracelular atribuída ao aumento na síntese de ATP  
108 proveniente do butafosfan (Furll et al., 2010, Pereira et al., 2013, Rollin et al., 2010).  
109 Conseqüentemente, há uma menor mobilização lipídica e redução das  
110 concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e beta-hidroxibutirato  
111 (BHBA) nesse período.

112 A lipólise é acompanhada pela liberação de espécies reativas de oxigênio  
113 (EROs) que levam ao estresse oxidativo e danos celulares (Gaal et al., 2006). Nesse  
114 contexto, Rizzo têm estudado a utilização de minerais com o intuito de neutralizar a  
115 ação das EROs (Rizzo et al., 2013). Assim, o butafosfan pode atuar como  
116 antioxidante, visto que reduz a mobilização lipídica.

## 117 **2.2 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)**

118

### 119 **2.2.1 Contexto atual da PIVE**

120 A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma biotecnologia da  
121 reprodução que cresce de forma exponencial no mundo, sendo que o Brasil é  
122 responsável por mais de 70% da PIVE mundial (IETS 2014). O desenvolvimento  
123 dessa biotécnica foi possível em razão dos estudos da oogênese, compreendendo a  
124 maturação oocitária e seus processos desde o estágio de vesícula germinativa até a  
125 finalização da segunda divisão meiótica com a formação do primeiro corpúsculo  
126 polar (McGaughey, 1983).

127 Em 1935, Pincus e Enzmann demonstraram que oócitos imaturos completam  
128 a maturação *in vitro* após serem retirados da ação inibitória do folículo (Pincus and  
129 Enzmann, 1935). Posteriormente, foi demonstrado que oócitos maturados e  
130 fertilizados *in vitro* podem resultar em uma prole viável (Schroeder and Eppig, 1984).  
131 Somado a isso, a descoberta de que a temperatura de 39°C é a mais adequada para  
132 a maturação de oócitos *in vitro* (Lenz et al., 1983) contribuiu para o desenvolvimento  
133 da técnica de PIVE.

134 Além dos processos que envolvem a MIV, a descoberta da necessidade da  
135 capacitação espermática antes da fertilização *in vitro* (FIV) (Austin, 1951) possibilitou  
136 o aumento da eficácia da técnica. Outros estudos também contribuíram para a  
137 consolidação da PIVE, como a demonstração da possibilidade de cultivar embriões  
138 de oito células até o estágio de blastocisto em solução contendo gema de ovo  
139 (Hammond, 1949). A descoberta de que a adição de lactato como suplemento  
140 energético em uma solução de ringuer com albumina auxilia no estágio de  
141 desenvolvimento de embriões de duas células até blastocisto promoveu um avanço  
142 no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (Whitten, 1957).

143 Em 1970, Kane e colaboradores descobriram que os aminoácidos são  
144 essenciais para a clivagem e o desenvolvimento do blastocisto (Kane and Foote,  
145 1970). Da mesma forma, em 1983 Lenz e colaboradores observaram que a  
146 temperatura da MIV e da FIV deveriam ser de 39°C, mimetizando a temperatura



147 corporal da vaca (Lenz et al., 1983). Mais tarde, foi observado que o CIV deve ser  
148 realizado também a 39°C (Fukui and Ono, 1988).

149 Fukui e colaboradores (1991) observaram que os embriões cultivados *in vitro*  
150 se desenvolvem de maneira mais satisfatória em ambiente com tensão de oxigênio  
151 menor que 20% (Fukui et al., 1991). No entanto, apesar dos relevantes avanços das  
152 últimas décadas, enquanto 60-80% dos oócitos maturados *in vivo* adquirem  
153 competência, apenas 25-40% dos oócitos maturados *in vitro* se desenvolvem até o  
154 estágio de blastocisto (Farin et al., 2007). Por conseguinte, é provável que a  
155 maturação seja um dos problemas que impede o avanço da eficácia da PIVE.

156

### 157 **2.2.2 Maturação oocitária**

158 A aquisição de competência oocitária é o processo pelo qual o oócito passa  
159 que o permite ser maturado, fecundado, se desenvolver até blastocisto e induzir uma  
160 gestação (Farin et al., 2007). Essas modificações iniciam progressivamente na fase  
161 final da foliculogênese, fazendo com que o oócito ao atingir 100 µm quebre a  
162 vesícula germinativa e retome a meiose. Já com 110 µm, o oócito apresenta  
163 capacidade para completar a maturação até o estágio de metáfase II (MII) (Hyttel et  
164 al., 1997).

165 Esse processo se divide em maturação nuclear e citoplasmática. A primeira  
166 está relacionada à capacidade do oócito em completar a meiose. Nesse momento,  
167 que vai da quebra da vesícula germinativa até a metáfase II, ocorre o rompimento do  
168 envoltório do núcleo, rearranjo dos microtúbulos, a condensação dos cromossomos  
169 e seu alinhamento na linha equatorial e extrusão do primeiro corpúsculo polar. O  
170 início desses eventos se dá *in vivo* após o pico do hormônio luteinizante (LH) (Lopez  
171 et al, 2004) e *in vitro* após a retirada do oócito do interior do folículo (Sirard and  
172 Coenen, 2006).

173 Já a maturação citoplasmática é marcada pelo alinhamento dos grânulos  
174 corticais na membrana plasmática. Além disso, ocorrem eventos de redistribuição  
175 das organelas, aumento do conteúdo lipídico e redução do complexo de Golgi,  
176 levando o oócito à interrupção da transcrição pela condensação do nucléolo (Fair,  
177 2003, Sirard and Coenen, 2006, Wang and Sun, 2007).

178 A maturação citoplasmática confere ao oócito a capacidade de impedir a  
179 poliespermia, possibilitar a descondensação do espermatozóide no ooplasma e  
180 manter o desenvolvimento embrionário nas primeiras fases (van den Hurk and Zhao,  
181 2005, Yamada et al., 2009). Dessa forma, a maturação citoplasmática confere um  
182 rearranjo celular que possibilita ao oócito ser fecundado (Dode et al., 2006).

183 A maturação oocitária compreende processos nucleares e citoplasmáticos  
184 que podem ser influenciados pelo folículo cujo oócito foi puncionado (Dode et al.,  
185 2006). Hendriksen e colaboradores citam que o estágio de desenvolvimento  
186 folicular afeta a aquisição de competência do oócito (Hendriksen et al., 2000). É  
187 provável que esse efeito não se dê em virtude da imaturidade de oócitos não  
188 ovulados, mas sim em razão de serem provenientes de folículos em atresia (Hsu and  
189 Hsueh, 1997). Jewgenow e colaboradores observaram que complexos cúmulus-  
190 oócitos isolados de folículos em acentuado grau de apoptose apresentaram uma  
191 menor capacidade de aquisição de competência (Jewgenow et al., 1999). Por outro  
192 lado, folículos em um estágio recente de atresia podem estar associados à melhora  
193 na aquisição de competência oocitária (Hendriksen et al., 2000).

194 Dessa forma, é possível afirmar que a aquisição da competência oocitária  
195 passa pela relação entre o oócito, as células do cúmulus e as demais estruturas  
196 foliculares. No entanto, cabe salientar que o mecanismo de maturação oocitária *in*  
197 *vivo* difere do *in vitro* em alguns aspectos, haja vista que *in vitro*, caso não haja  
198 adição exógena, não há ação das gonadotrofinas sobre as células da granulosa e  
199 conseqüente expressão de fatores indutores da maturação nuclear (Dekel, 2005).

200

### 201 **2.2.3 Moléculas envolvidas na aquisição de competência oocitária**

202 As células do cúmulus e da granulosa secretam uma abundância de fatores  
203 que atuam na regulação da maturação oocitária. Sob ação do LH, as células da  
204 granulosa do folículo secretam fatores do tipo fator de crescimento epidermal (EGF-  
205 like factors), como anfiregulina (Areg) e epirregulina (Ereg) que atuam no oócito  
206 estimulando a retomada da meiose (Hsieh et al., 2009).

207 A retomada da meiose é ativada pelo fator promotor de maturação (MPF). O  
208 MPF é composto pela ciclina catalítica dependente de Kinase-1 (Cdk1) e uma

209 subunidade regulatória chamada de ciclina B1, que quando acoplados promovem a  
210 quebra da vesícula germinativa. Os estágios subseqüentes da meiose são regulados  
211 pelo complexo promotor da anáfase (APC). A meiose é interrompida em metáfase II  
212 sob ação do fator citostático (CSF). O MPF é regulado via ação de quinases e  
213 fosfatases. Já o APC e o CSF sofrem regulação através de poliadenilação e  
214 deadenilação (Belloc et al., 2008).

215 Outra molécula que atua na regulação da meiose é a adenosina 3'-5'  
216 monofosfato cíclico (cAMP). Derivado da adenosina trifosfato (ATP) pela ação da  
217 enzima adenilato ciclase (AC), o cAMP atua na regulação da meiose através da  
218 variação da sua concentração intraocitária (Kawamura et al., 2004). O cAMP pode  
219 ser produzido pelos oócitos ou chegar aos mesmos através das junções GAP das  
220 células do cumulus (Dekel et al., 1981).

221 O cAMP regula a proteína kinase A dependente de cAMP (PKA), que pode  
222 ser a PKA tipo I, localizada nos oócitos, e a tipo II, localizada nas células do cúmulus  
223 (Downs and Hunzicker-Dunn, 1995). A PKA na sua forma inativa é composta por um  
224 dímero composto por duas subunidades reguladoras ligado a duas subunidades  
225 catalíticas. Na presença de cAMP, este se liga às subunidades reguladoras da PKA,  
226 permitindo mudanças conformacionais que liberam as subunidades catalíticas.  
227 Essas subunidades promovem a fosforilação e desfosforilação de proteínas  
228 reguladoras do bloqueio da meiose (Francis and Corbin, 1994). Nos oócitos, a PKA  
229 tipo I ativa promove a manutenção do bloqueio meiótico. Já nas células do cúmulus,  
230 a PKA tipo II ativa promove a retomada da meiose e expansão das células do  
231 cúmulus (Downs and Hunzicker-Dunn, 1995).

232 A concentração de cAMP é regulada nos oócitos pela ação da fosfodiesterase  
233 (PDE) subtipo 3. Já nas células do folículo, a PDE subtipo 4 que desempenha essa  
234 função (Tsafiriri et al., 1996). As gonadotrofinas desempenham uma regulação  
235 seletiva nas PDEs. Dessa forma, o estímulo gonadotrófico pode desencadear a  
236 retomada da meiose. No entanto, a atividade das PDEs pode ser inibida por  
237 derivados de purinas existentes no fluído folicular. Consequentemente, a alta  
238 concentração de cAMP no interior do oócito impede o reinício meiótico (Damiani et  
239 al., 1996).

240 Segundo Su e colaboradores, as gonadotrofinas resultam no aumento da  
241 concentração de cAMP e conseqüente ativação da PKAII, levando à expressão de  
242 fatores indutores da quebra da vesícula germinativa e expansão das células do  
243 cúmulus. Dessa forma, o oócito retoma a meiose em função da interrupção da  
244 comunicação entre o complexo cúmulus-oócito proveniente do estímulo hormonal ou  
245 da remoção do mesmo do ambiente folicular (Su et al., 2003). Essa interrupção  
246 cessa a passagem de moléculas inibitórias e cAMP do folículo para o oócito. Por  
247 conseguinte, há a redução da concentração de cAMP no oócito e diminuição da  
248 atividade de PKAI, permitindo o retorno à meiose (Dekel et al., 1981). No entanto,  
249 não é a concentração absoluta de cAMP no interior da célula que determina a  
250 ocorrência desses eventos, mas sim a amplitude da variação da concentração entre  
251 células do cúmulus e oócito (Downs and Hunzicker-Dunn, 1995).

252 Além do cAMP, a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) também  
253 atua na regulação da maturação oocitária. A MAPK atua na expansão das células do  
254 cúmulus, na maturação nuclear, no rearranjo dos microtúbulos e formação do fuso  
255 meiótico e manutenção do oócito em MII (Su et al., 2003). Nas células do cúmulus, a  
256 MAPK é ativada pelas quinases RAS/RAF, enquanto que no oócito, sua ativação é  
257 feita pela proteína quinase MOS.

258 A ativação da MAPK se dá pela proteína quinase ativadora de MAPK  
259 (MAPKK) que fosforila resíduos de tirosina e treonina. A MAPKK é ativada mediante  
260 fosforilação mediada pela RAS/RAF no cúmulus e MOS no oócito (Silva, 2008).  
261 Quando ativa, a MAPK inibe reguladores negativos do MPF promovendo sua  
262 ativação no oócito. No entanto, *in vitro*, a maturação nuclear ocorre  
263 espontaneamente sem a necessidade da ativação da MAPK (Silva, 2008). No oócito,  
264 a MAPK ativa é responsável pela ativação da enzima cdc25fosfatase que atua na  
265 ativação do MPF.

266 A subunidade catalítica Cdk1 do MPF controla a divisão celular, enquanto a  
267 subunidade reguladora ciclina B1 age na ativação do pré-MPF (Dekel, 2005). A  
268 Cdk1 se apresenta fosforilada em resíduos de tirosina e treonina no MPF inativo ou  
269 pré-MPF (Gautier et al., 1988). A cdc25fosfatase desfosforila estes resíduos,  
270 permitindo a associação da Cdk1 com a ciclina B e conseqüente ativação do MPF  
271 (Gilchrist and Thompson, 2007).

272 O MPF ativo é necessário para a retomada da meiose e necessário em altas  
273 concentrações até o estágio de metáfase I (MI). A concentração intraoocitária de  
274 MPF é reduzida da MI até a extrusão do primeiro corpúsculo polar e torna a  
275 aumentar antes do início da meiose II (Josefsberg et al., 2003).

276 Apesar do vasto conhecimento a cerca dos processos que envolvem a  
277 aquisição de competência oocitária, a eficiência do processo *in vivo* ainda supera os  
278 resultados *in vitro*. Dessa forma, com base no conhecimento sobre os  
279 acontecimentos que envolvem a maturação oocitária, diversas alternativas têm sido  
280 estudadas para otimizar os resultados desses processos.

281

## 282 **2.3 Suplementos adicionados ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de embriões** 283 **bovinos**

284 Diversos pesquisadores ao redor do mundo vêm estudando alternativas para  
285 melhorar o processo de aquisição de competência oocitária *in vitro*. Uma das  
286 estratégias é a utilização de suplementos no meio de MIV para qualificar o processo  
287 de maturação e conseqüentemente aumentar os resultados da PIVE. Com base no  
288 conhecimento acerca do processo de maturação oocitária, diversas moléculas têm  
289 sido testadas para seus possíveis efeitos nos inúmeros processos que envolvem a  
290 capacitação do oócito.

291

### 292 **2.3.1 Suplementos lipídicos**

293 O oócito requer uma alta quantidade de energia para completar a meiose  
294 (Sturmey et al., 2009). Juntamente com a glicose e os aminoácidos, os ácidos  
295 graxos são fontes de energia para o oócito. Os ácidos graxos são uma fonte de  
296 energia fundamental para a garantir a qualidade oocitária (Prates et al., 2014).

297 Nesse contexto, Oseikria e colaboradores (Oseikria et al., 2016) avaliaram o  
298 efeito da adição do ácido decosahexaenóico (DHA), um ácido graxo poliinsaturado,  
299 na qualidade oocitária. Para tanto, os autores adicionaram diferentes doses de DHA  
300 ao meio de MIV e avaliaram a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário.  
301 Embora a adição de DHA não tenha afetado o percentual de oócitos maturados,

302 Oseikria e colaboradores (Oseikria et al., 2016) observaram que a suplementação do  
303 meio de MIV com 1 $\mu$ M de DHA induziu um significativo aumento nas taxas de  
304 clivagem em comparação ao grupo controle. Além disso, a suplementação com 1 $\mu$ M  
305 e 10 $\mu$ M de DHA promoveu a aceleração da clivagem permitindo a observação de um  
306 maior número de zigotos com quatro ou mais células no momento da avaliação. No  
307 dia 7 do cultivo *in vitro* (CIV), o grupo suplementado com 1 $\mu$ M de DHA apresentou  
308 um significativo aumento na taxa de blastocisto em comparação ao grupo controle.

309 Outra molécula estudada como alternativa para melhora na eficiência da PIVE  
310 é o ácido linolêico conjugado (CLA). O CLA pode alterar o perfil lipídico das  
311 membranas celulares e a sinalização celular, podendo alterar suas funções (Pereira  
312 et al., 2008). Absalón-Medina e colaboradores (Absalon-Medina et al., 2014) não  
313 observaram diferenças na taxa de maturação de oócitos maturados em meio  
314 suplementado com CLA. A adição de CLA ao meio de MIV não afetou a taxa de  
315 clivagem e de blastocisto neste estudo. No entanto, no mesmo estudo foi avaliado o  
316 efeito da adição de CLA ao meio de CIV, a qual resultou em um decréscimo dose  
317 dependente na taxa de blastocisto. Segundo os autores, o CLA interfere no perfil  
318 lipídico e sinalização celular de oócitos e embriões. No entanto, os autores não  
319 observaram efeito positivo do CLA na eficiência da PIVE. Por outro lado, o autor  
320 relata um efeito positivo do CLA quando utilizado em processos de criopreservação.

321 Nas últimas décadas, o ácido lisofosfatídico (LPA) tem apresentado diversos  
322 efeitos funcionais na reprodução de fêmeas (Ye and Chun, 2010). Esse derivado da  
323 membrana fosfolipídica tem sido reportado como um importante sinalizador  
324 molecular na proliferação (Goetzl et al., 1999), diferenciação (Spohr et al., 2008),  
325 morfogênese (Harma et al., 2012) e sobrevivência celular (Weiner and Chun, 1999,  
326 Ye et al., 2008). Boruszewska e colaboradores (Boruszewska et al., 2014)  
327 avaliaram o efeito da suplementação do meio de MIV com LPA nas taxas de  
328 clivagem e blastocisto e na expressão de genes marcadores de qualidade oocitária.  
329 A suplementação do meio de MIV com LPA alterou a expressão de marcadores de  
330 qualidade oocitária. Nos oócitos, o LPA promoveu um aumento na expressão do  
331 fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) nos oócitos. Porém, o LPA não  
332 influenciou a abundância de mRNA da proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) no  
333 mesmo tecido. Segundo os autores, a expressão de BAX, um gene pró-apoptótico,

334 diminui e a de BCL2, um gene anti-apoptótico, aumenta em oócitos maturados em  
335 presença de LPA, evidenciando um efeito positivo dessa molécula.

336 Entretanto, apesar do LPA promover uma melhora na expressão de genes  
337 relacionados à qualidade oocitária, esse efeito não se traduz em aumento nas taxas  
338 de clivagem e blastocisto (Boruszewska et al., 2014). Contudo, é possível que a  
339 melhora na maturação oocitária (Boruszewska et al., 2015) oriunda do LPA contribua  
340 posteriormente na implantação e desenvolvimento embrionário (Boruszewska et al.,  
341 2014). Isso é provável em virtude de o LPA aumentar a expressão do gene placenta  
342 específico 8 (PLAC8), responsável por codificar uma proteína relacionada à  
343 placentação, no blastocisto (Boruszewska et al., 2015).

344

### 345 **2.3.2 Suplementos Antioxidantes**

346 Durante o processo de PIVE são produzidas espécies reativas de oxigênio  
347 (EROs) em função da tensão de oxigênio do ambiente, presença de cátions  
348 metálicos na água e reagentes e exposição à luz, além das EROs produzidas pelo  
349 espermatozóide durante a FIV (Guerin et al., 2001). Embriões cultivados *in vitro* são  
350 mais susceptíveis aos danos causados pelas EROs em função da sua incapacidade  
351 de proteger sua frágil estrutura celular (Harvey et al., 1995).

352 As EROs estão envolvidas em diversos processos biológicos da PIVE,  
353 incluindo a maturação oocitária (Behrman et al., 2001). A eliminação de células  
354 inviáveis através da apoptose (Ufer et al., 2010) bem como a interação entre  
355 espermatozóide e oócito são eventos dependentes das EROs (Goncalves et al., 2010).  
356 Dessa forma, o adequado desenvolvimento da PIVE depende do correto balanço  
357 entre os antioxidantes e a produção de EROs.

358 Nesse contexto, o efeito protetor de várias substâncias antioxidantes e seus  
359 co-fatores tem sido estudado em oócitos e embriões (Goto et al., 1993). Em oócitos  
360 e embriões, a glutathione promove a detoxificação de peróxidos lipídicos e remoção  
361 de peróxido de hidrogênio (Johnson and Nasr-Esfahani, 1994). O  $\beta$ -mercaptoethanol  
362 e a cisteína são precursores da glutathione. Estes compostos promovem a redução  
363 da cistina, presente nos meios de PIVE, para cisteína, aumentando sua  
364 disponibilidade e conseqüente síntese de glutathione.

365            Dessa forma, Rocha-Frigoni e colaboradores (Rocha-Frigoni et al., 2014)  
366 analisaram o efeito da adição de cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol ao meio de MIV e  
367 catalase, outro composto com potencial antioxidante, ao meio de CIV, sobre a  
368 concentração de EROs, taxa de clivagem, taxa de blastocisto e número de células  
369 apoptóticas. Os autores não observaram diferença na taxa de clivagem entre os  
370 tratamentos. No entanto, a adição de catalase promoveu um aumento na taxa de  
371 blastocisto. Da mesma forma, os grupos suplementados com cisteína ou  $\beta$ -  
372 mercaptoethanol ou catalase apresentaram blastocistos com um menor número de  
373 células apoptóticas e uma menor concentração de EROs, evidenciando um efeito  
374 desses antioxidantes na regulação do processo de apoptose através da proteção  
375 contra o estresse oxidativo.

376            Outro elemento estudado como aditivo para melhora dos processos de PIVE  
377 é o manganês. Esse elemento está envolvido na ativação de enzimas como  
378 hidrolases, descarboxilases, transferases e quinases (Forest, 1993). Além disso, o  
379 manganês atua na proteção contra danos ao DNA prevenindo o dano oxidativo e  
380 reduzindo a apoptose (Anchordoquy et al., 2014b, Holley et al., 2011, Schrantz et al.,  
381 1999, Zidenberg-Cherr et al., 1983)

382            Segundo Anchordoquy e colaboradores, oócitos maturados em meio  
383 suplementado com manganês apresentaram uma maior atividade da enzima  
384 superóxido dismutase (SOD), que atua protegendo o DNA de danos oxidativos.  
385 Somado a isso, grupos de oócitos maturados em presença de manganês  
386 apresentam uma maior taxa de blastocisto e blastocistos com maior número de  
387 células em comparação a oócitos não tratados (Anchordoquy et al., 2016).

388            Além dos já citados, o zinco é outra molécula que também atua na defesa  
389 contra radicais livres (Powell, 2000). Segundo Anchordoquy e colaboradores, a  
390 adição desse mineral ao meio de MIV promove uma redução da apoptose nas  
391 células do cúmulus, aumento da atividade da enzima SOD e aumento da taxa de  
392 blastocisto (Anchordoquy et al., 2014a).

393            Um metabólito da vitamina A chamado tretinoína é outra substância também  
394 utilizada como suplemento para a MIV. Essa substância é importante para a  
395 proliferação e diferenciação celular e desenvolvimento embrionário (Chinsriwongkul  
396 et al., 2012). Em ratos, a maturação de oócitos em meio suplementado com



397 tretinoína elevou o número de oócitos maturados e melhorou o desenvolvimento  
398 embrionário (Nasiri et al., 2011, Tahaei et al., 2011).

399 Segundo Lucas e colaboradores (Lucas et al., 2015), a suplementação do  
400 meio de MIV com tretinoína nanoencapsulada aumenta a taxa de clivagem e  
401 blastocisto. No mesmo trabalho, os autores observaram que os embriões dos grupos  
402 tratados apresentaram menor nível de espécies reativas de oxigênio, sugerindo um  
403 efeito antioxidante da tretinoína.

404 Por fim, a paraoxonase-1 (PON1), uma enzima sintetizada pelo fígado (Ferre  
405 et al., 2002) que forma um complexo com a lipoproteína de alta densidade (HDL) e a  
406 apolipoproteína A, é uma substância que atua na proteção da membrana celular  
407 contra o estresse oxidativo. O efeito antioxidante da PON1 se dá através da  
408 prevenção à apoptose (Fuhrman et al., 2010). Dessa forma, Rincon e colaboradores  
409 observaram um efeito dose dependente da adição de PON1 ao meio de MIV.  
410 Oócitos maturados em meio suplementado com PON1 apresentaram um aumento  
411 na taxa de blastocisto (Rincon et al., 2016). Este estudo confirmou que a PON1  
412 apresenta um efeito positivo na aquisição de competência oocitária e  
413 desenvolvimento embrionário *in vitro*, demonstrando que a PON1 é uma alternativa  
414 para a melhora nos resultados da PIVE.

415

### 416 **2.3.3 Suplementos proteicos**

417 A maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário são favorecidos  
418 quando ocorrem em meio suplementado com fontes de proteína de origem animal  
419 (Carolan et al., 1995). Segundo Anciotto, o soro fetal bovino (SFB) utilizado na MIV  
420 apresenta melhores resultados em relação a outras fontes protéicas de origem  
421 animal (Anciotto, 2004). De acordo com diversos estudos, essa diferença ocorre em  
422 virtude da presença de fatores de crescimento, aminoácidos, peptídeos, proteínas,  
423 citrato (Keskintepe et al., 1995), vitaminas, substratos energéticos (Takahashi and  
424 First, 1992) e hormônios esteróides (Mingoti et al., 1995) no SFB.

425 No entanto, de acordo com Rizos e colaboradores (Rizos et al., 2003), a  
426 utilização de SFB está associada à redução da criotolerância embrionária. O SFB  
427 apresenta uma maior concentração lipídica em relação a outros suplementos

428 protéicos, como a albumina sérica livre de ácidos graxos (BSA-FAF) (Del Collado et  
429 al., 2015). Os ácidos graxos saturados podem penetrar no oócito (Adamiak et al.,  
430 2006), podendo ser metabolizados ou acumulados (Kuerschner et al., 2008). O  
431 excesso de acúmulo de lipídios causa modificações no metabolismo da mitocôndria  
432 oocitária (Crosier et al., 2000), organela responsável pelo suprimento energético até  
433 a fase de blastocisto (Van Blerkom, 2011), comprometendo a viabilidade do embrião.

434 Dessa forma, a BSA tem sido amplamente utilizada em meios de PIVE  
435 (Mingoti et al., 2002). Entretanto, a utilização de SFB no meio de MIV está associada  
436 a maior viabilidade oocitária em comparação à utilização de BSA como fonte  
437 protéica (Ancioto, 2004). Por outro lado, segundo Flood e Shirley, a BSA tem efeito  
438 protetor celular contra componentes tóxicos do meio em virtude de sua característica  
439 de ligação (Flood and Shirley, 1991). Além disso, a BSA previne que haja a adesão  
440 das células às placas de PIVE, pois desempenha função surfactante (Pinyopummintr  
441 and Bavister, 1994). A BSA também contribui promovendo o equilíbrio do pH e  
442 quelando metais pesados (Mehta and Kiessling, 1990).

443 Na busca por um embrião com menor conteúdo lipídico, conseqüentemente  
444 mais criotolerante, del Collado e colaboradores avaliaram a qualidade de embriões  
445 cuja MIV foi suplementada apenas com uma fonte protéica de baixo conteúdo  
446 lipídico, a BSA-FAF, em comparação à MIV suplementada com SFB. Os resultados  
447 deste estudo indicam que oócitos suplementados apenas com SFB apresentam um  
448 maior acúmulo lipídico. Contudo, apesar de apresentarem um maior número de  
449 mitocôndrias ativas, os oócitos maturados apenas com BSA-FAF apresentam menor  
450 taxa de maturação e de blastocisto (Del Collado et al., 2015), o que ocorre em  
451 virtude da assincronia durante a migração, causando uma maior distância entre as  
452 estruturas. Corroborando, Ali e Sirard (Ali and Sirard, 2002) relataram que oócitos  
453 maturados em meio contendo apenas BSA apresentam uma menor taxa de  
454 maturação nuclear e migração dos grânulos corticais.

455 No entanto, a redução do percentual de SFB de 10% para 5%, combinado  
456 com BSA-FAF promove um balanço oxidativo, promovendo uma melhor taxa de  
457 maturação e desenvolvimento de blastocisto e menor acúmulo de lipídios nos  
458 embriões (Del Collado et al., 2015)

#### 459 **2.3.4 Suplementos hormonais**

460 A maturação *in vitro* é realizada com meios suplementados com  
461 gonadotrofinas em espécies como bovinos (Zuelke and Brackett, 1990), eqüinos  
462 (Dell'Aquila et al., 2004) e suínos (Singh et al., 1993). Gonadotrofinas como o  
463 hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH) induzem a  
464 maturação nuclear e citoplasmática e melhoram o desenvolvimento embrionário  
465 (Guixue et al., 2001). No entanto, o tipo de gonadotrofina assim como a  
466 concentração a ser utilizada não é um consenso (Saeki et al., 1991).

467 O FSH e o LH são glicoproteínas sintetizadas e secretas pela hipófise  
468 anterior. O FSH estimula a maturação de folículos inclusos nas células do cúmulus e  
469 promove a proliferação e diferenciação das células da granulosa (Richards, 1980).  
470 Já o LH promove a maturação final do oócito através do estímulo à liberação de  
471 fatores de crescimento que permitem a retomada da meiose (Hsieh et al., 2009).  
472 Além disso, as gonadotrofinas atuam na regulação de moléculas envolvidas no  
473 bloqueio ou retomada da meiose (Su et al., 2003).

474 Além das gonadotrofinas de origem hipofisária, há também as gonadotrofinas  
475 coriônicas, de origem placentária, que podem mimetizar os efeitos do FSH e LH. A  
476 gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG)  
477 são hormônios que possuem efeito biológico similar ao FSH e LH. O eCG apresenta  
478 ação majoritariamente semelhante ao FSH e em menor grau ao LH (Papkoff, 1974),  
479 enquanto o hCG apresenta efeito mais similar ao LH (Morrow, 1986).

480 Apesar dos resultados positivos do uso de eCG na maturação folicular *in vivo*  
481 (Oliveira et al., 2014), o efeito deste e de outros ligantes do receptor de LH *in vitro*  
482 ainda necessitam ser elucidados. Segundo Nogueira e colaboradores, apesar de  
483 haver um único receptor de LH, sua ativação por diferentes ligantes, como LH, eCG  
484 ou hCG, pode resultar na ativação de diferentes rotas de sinalização ou alterar a  
485 intensidade dessa sinalização (Nogueira et al., 2010).

486 Outro hormônio estudado como suplemento para melhorar a maturação  
487 oocitária é o cortisol. Este glicocorticóide atua como modulador da apoptose  
488 (Komiya et al., 2008), na regulação da atividade mitocondrial (Datson et al., 2008)  
489 e no metabolismo de carboidratos e lipídeos (Reichardt et al., 2012).

490 Em mulheres, a concentração intrafolicular de cortisol apresentou efeito  
491 positivo na taxa de implantação embrionária (Keay et al., 2002). Além disso, Harlow

492 e colaboradores (Harlow et al., 1997) observaram uma maior concentração  
493 intrafolicular de cortisol próximo ao pico de LH.

494 Adicionado ao meio de MIV de oócitos bovinos, o cortisol não apresenta efeito  
495 na taxa de clivagem e número de células do blastocisto, apesar de conferir um  
496 aumento na taxa de blastocisto (da Costa et al., 2016). Neste mesmo estudo, os  
497 embriões provenientes de oócitos tratados com cortisol apresentaram uma maior  
498 expressão dos genes GLUT1, FASN e HSP70, evidenciando o efeito do  
499 glicocorticóide na modulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e resposta ao  
500 estresse respectivamente.

501 Além do disposto, diversos trabalhos têm descrito o efeito da utilização de  
502 insulina na PIVE de diferentes espécies (Herrler et al., 1998, Lewis et al., 1992, Rao  
503 et al., 1990, Zhang and Armstrong, 1990). No entanto, os resultados apresentados  
504 são contraditórios, provavelmente em função da concentração de insulina utilizada.  
505 Em razão da instabilidade *in vitro* da insulina (Hayashi et al., 1978), em alguns  
506 estudos, a concentração utilizada na PIVE é superior à fisiológica (Matsui et al.,  
507 1997).

508 Segundo Laskowski e colaboradores (2016), a adição de insulina ao meio de  
509 MIV, tanto na concentração fisiológica como cem vezes maior, não afeta a taxa de  
510 clivagem. No entanto, a taxa de blastocistos é menor em grupos maturados em meio  
511 de MIV suplementado com insulina (Laskowski et al., 2016).

512 Por fim, outro hormônio estudado como suplemento para a PIVE é a  
513 melatonina, uma molécula multifuncional produzida pela glândula pineal (Reiter et  
514 al., 2010). Dentre suas funções, a melatonina possui ação antioxidante, pois  
515 estimula a expressão de genes e ativação de enzimas como a glutathione peroxidase  
516 (GSH) e a superóxido dismutase (SOD) (Barlow-Walden et al., 1995). Além de  
517 proteger a mitocôndria contra o estresse oxidativo, a melatonina restringe eventos  
518 apoptóticos e a morte celular (Jou et al., 2010).

519 A capacidade antioxidante e antiapoptótica da melatonina provavelmente seja  
520 o mecanismo através do qual esta molécula promove o desenvolvimento de oócitos  
521 e embriões de diferentes espécies (Abecia et al., 2002, Ishizuka et al., 2000, Kang et  
522 al., 2009, Papis et al., 2007, Paradies et al., 2010, Sakaguchi et al., 2013, Tian et al.,  
523 2010). Tian e colaboradores (Tian et al., 2010) observaram a presença de

524 melatonina no fluído folicular de bovinos, bem como relataram os efeitos benéficos  
525 da melatonina na maturação oocitária *in vitro*.

526

### 527 **2.3.5 Suplementos reguladores de cAMP**

528 A adenosina monofosfato cíclica (cAMP) é um mensageiro intracelular que  
529 induz a maturação de oócitos (Conti et al., 2012). A produção de cAMP é estimulada  
530 pelo FSH e pelo LH através da enzima adenilato ciclase.

531 A concentração de cAMP no oócito determina a manutenção do bloqueio da  
532 meiose. A redução da concentração de cAMP no oócito culmina com a retomada da  
533 meiose (Sela-Abramovich et al., 2006). Dessa forma, durante o processo de  
534 maturação é fundamental a manutenção da concentração de cAMP para que a  
535 reorganização citoplasmática ocorra de forma sincronizada à maturação nuclear  
536 (Luciano et al., 2011).

537 Consequentemente, a utilização de agentes reguladores de cAMP que  
538 promovam a manutenção de sua concentração promovem um aumento no  
539 desenvolvimento da competência oocitária (Luciano et al., 2011). Oócitos tratados  
540 com adenilato ciclase ou inibidores da fosfodiesterase, como a forskolina (FSK) e o  
541 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), apresentam um aumento na concentração de cAMP  
542 e subsequente atraso na retomada da meiose, o que contribui para o processo de  
543 aquisição de competência (Shu et al., 2008).

544 Outra molécula que atua na modulação do cAMP é a proteína kinase  
545 ativadora de AMP (AMPK). Através da fosforilação oxidativa e da oxidação de ácidos  
546 graxos, a AMPK regula a homeostase celular, através da taxa Adenosina trifosfato  
547 (ATP): Adenosina mono fosfato (AMP) e geração de ATP (Hardie et al., 2012). Por  
548 sua vez, o ATP é necessário em quantidades suficientes para a formação do fuso  
549 meiótico (Zhang et al., 2006), oscilação do cálcio (Dumollard et al., 2006) e extrusão  
550 do corpúsculo polar (Stojkovic et al., 2001), eventos fundamentais para o  
551 acontecimento da maturação do oócito.

552 Segundo Takeo e colaboradores (Takeo et al., 2015), a suplementação do  
553 meio de MIV com o ribonucleosídeo 5-aminoimidazole-4-carboxamine (AICAR), um  
554 ativador específico de AMPK, melhora o processo de aquisição de competência

555 oocitária. A suplementação do meio de MIV com AICAR aumenta a atividade de  
556 AMPK nos oócitos. Além disso, blastocistos provenientes de oócitos tratados com  
557 AICAR apresentam um maior número de células em comparação à blastocistos  
558 oriundos de oócitos não tratados. De acordo com os autores, o tratamento dos  
559 oócitos com AICAR promove um aumento contínuo da concentração de ATP nos  
560 embriões até o estágio de oito células. Dessa forma, é possível afirmar que o AICAR  
561 melhora a capacidade de fertilização do oócito e seu desenvolvimento até o estágio  
562 de blastocisto (Takeo et al., 2015).

563

#### 564 **2.4 Interação entre reprodução e doenças metabólicas**

565 O sistema reprodutivo, bem como as repostas à sua manipulação, depende  
566 da condição metabólica do indivíduo (Webb et al., 2007). A foliculogênese, a  
567 qualidade oocitária e o desenvolvimento embrionário são afetados por hormônios e  
568 fatores de crescimento que sofrem regulação do eixo somatotrópico, cuja atividade é  
569 condicionada ao status energético do indivíduo (Monget and Bondy, 2000). Por outro  
570 lado, também está bem estabelecido que indivíduos obesos, tanto fêmeas bovinas  
571 como mulheres, tendem a apresentar reduzida fertilidade (Armstrong et al., 2001,  
572 Nolan et al., 1998). Quadros de obesidade frequentemente são acompanhados de  
573 resistência à insulina, o que compromete a ação do eixo somatotrópico no  
574 desenvolvimento folicular em ruminantes (McGarry, 2002).

575 Um dos mecanismos pelos quais a obesidade interfere na fertilidade é a  
576 excessiva liberação de ácidos graxos não esterificados (NEFA – non-esterified fatty  
577 acids) durante a lipólise, excedendo a capacidade de metabolização hepática  
578 (Drackley et al., 2001). Elevada concentração de NEFA é prejudicial para as células  
579 foliculares, acarretando redução da qualidade do oócito e conseqüentemente  
580 diminuição da fertilidade (Vanholder et al., 2006). Além disso, um estado de  
581 catabolismo pode alterar a expressão de receptores purinérgicos (Seo et al., 2014),  
582 os quais desempenham um importante papel na resposta imune (Beldi et al., 2008),  
583 o que pode interferir no desempenho produtivo e reprodutivo da fêmea. Dessa  
584 forma, o entendimento dos mecanismos metabólicos de regulação da obesidade,  
585 bem como alternativas para atenuar seus efeitos deletérios, contribui para a melhora

586 na eficiência de programas de reprodução assistida em indivíduos que apresentam  
587 quadros dessa enfermidade.

588

## 589 **2.5 Papel da gordura visceral no mecanismo inflamatório da obesidade**

590 Um dos principais focos das pesquisas em obesidade é o tecido adiposo  
591 (Trayhurn et al., 2007). A identificação do tecido adiposo como não apenas um  
592 estoque de energia e protetor térmico e mecânico, mas também como órgão  
593 secretor, tem impulsionado pesquisas em busca da compreensão dos mecanismos  
594 celulares e moleculares que modulam sua relação com diversos eventos no  
595 organismo (Tschop and Heiman, 2001).

596 Os avanços nas técnicas de biologia molecular permitiram a identificação de  
597 diversos produtos secretados pelo tecido adiposo (Fruhbeck and Gomez-Ambrosi,  
598 2001). Cada adipócito produz uma gama de substâncias, chamadas de adipocinas  
599 (Trayhurn and Wood, 2004), que impactam não apenas na função adipocitária, mas  
600 também em diversas funções metabólicas (Fonseca-Alaniz et al., 2006, Fruhbeck  
601 and Gomez-Ambrosi, 2001, Ronti et al., 2006).

602 Dentre mais de 50 adipocinas já catalogadas, o tecido adiposo secreta uma  
603 gama de citocinas pró e anti-inflamatórias associadas à obesidade (Yudkin et al.,  
604 1999). Em indivíduos obesos, a síntese de moléculas pró-inflamatórias está  
605 aumentada em relação a indivíduos magros (Ferrante, 2007). Dessa forma, Das  
606 (Das, 2001) sugere que a obesidade é uma doença inflamatória. Nesse contexto, os  
607 estudos sobre obesidade buscam a compreensão da relação entre estas citocinas e  
608 o quadro de obesidade.

609 As citocinas são hormônios protéicos que atuam na mediação e regulação de  
610 processos imunes e inflamatórios (Playfair e Lydyard, 1999). Dentre as citocinas pró  
611 e anti-inflamatórias produzidas pelo tecido adiposo se destacam a adiponectina, o  
612 fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 1 b (IL-1 $\beta$ ) e  
613 a leptina (Coelho et al., 2013).

614

### 615 **2.5.1 Interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

616 A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória presente no citoplasma na sua pró-  
617 forma inativa. A clivagem de sua pró-forma inativa é realizada pela enzima caspase-  
618 1, que leva a ativação da forma madura e biologicamente ativa da IL-1  $\beta$  (Thornberry  
619 et al., 1992). Essa ativação resulta na estimulação da produção de outros  
620 mediadores inflamatórios, levando ao influxo de células imunes circulantes,  
621 culminando em dano tecidual e uma forma especial de morte celular chamada de  
622 piroptose. Por essa razão, a IL-1 $\beta$  tem sido descrita como “pirógeno endógeno”  
623 (Dinarello, 2009).

624

### 625 **2.5.2 Fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

626 O TNF $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que tem a expressão do gene que a  
627 codifica aumentada no tecido adiposo de roedores obesos. Por essa razão, a  
628 obesidade foi reconhecida como uma condição de inflamação crônica de baixo grau  
629 (Hotamisligil et al., 1993).

630 O aumento da síntese de TNF $\alpha$ , juntamente com outras adipocinas, leva a  
631 uma maior infiltração de macrófagos no tecido adiposo (Kennedy et al., 2009). Como  
632 resultado, além do processo inflamatório, também se desenvolve uma resistência  
633 periférica à insulina. O TNF $\alpha$  inibe a fosforilação da tirosina existente no substrato-1  
634 do receptor de insulina (IRS-1) (Bullo et al., 2007). Além disso, o quadro inflamatório  
635 do tecido adiposo leva à diferenciação dos adipócitos que culmina na liberação de  
636 ácidos graxos não esterificados (AGNEs) que inibem o IRS-1 (Bullo et al., 2007).  
637 Dessa forma, na condição de obesidade, o tecido adiposo desempenha importante  
638 papel na regulação da Síndrome Metabólica.

639 O TNF $\alpha$  ativa a via de sinalização do fator de transcrição fator nuclear *kappa B*  
640 (NF- $\kappa$ B). Ativado, o NF- $\kappa$ B se transloca para o núcleo onde regula a transcrição de  
641 genes envolvidos na resposta imune e inflamatória (Baud and Karin, 2009). A ação  
642 do TNF $\alpha$  sobre o NF- $\kappa$ B se dá através das proteínas quinases ativadas por  
643 mitógenos (MAPK), uma família de quinases que atuam na regulação de  
644 crescimento, diferenciação e proliferação celulares através da fosforilação de serina  
645 e treonina (Hotamisligil et al., 1993). Além disso, o TNF $\alpha$  desenvolve um papel  
646 fundamental na regulação da síntese de interleucina 6 (IL-6) (Chiellini et al., 2002).



647

### 648 **2.5.3 Interleucina 6 (IL-6)**

649 A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que tem sua síntese  
650 aumentada em indivíduos obesos em comparação a indivíduos magros (Bullo et al.,  
651 2007). A obesidade leva à quimiotaxia e infiltração de macrófagos, causando  
652 inflamação local e aumento nas concentrações plasmáticas de IL-6 (Rogerio et al.,  
653 2008). O aumento da IL-6 atua de forma semelhante ao  $TNF_{\alpha}$ , levando à resistência  
654 periférica à insulina (Cave et al., 2008).

655 Além da ação pró-inflamatória, a IL-6 suprime a expressão de adiponectina,  
656 uma adipocina anti-inflamatória produzida pelo adipócito (Ouchi et al., 2003).  
657 Segundo Kern e colaboradores, a concentração de IL-6 e outras citocinas pró-  
658 inflamatórias aumentam com o acúmulo de gordura visceral (Kern et al., 2001). Em  
659 roedores, a retirada cirúrgica da gordura visceral aumentou a sensibilidade à  
660 insulina, tolerância à glicose e expressão do receptor de insulina (IR) no tecido  
661 músculo esquelético (Menon et al., 2014). É provável que esses resultados sejam  
662 decorrentes da diminuição da secreção de IL-6, desfazendo sua inibição do IR e  
663 permitindo a ligação da insulina a seu receptor (Menon et al., 2014). No entanto, o  
664 efeito pró-inflamatório da IL-6, bem como de outras citocinas pró-inflamatórias,  
665 parece ser mediado pela concentração de citocinas anti-inflamatórias, assim como o  
666 inverso é verdadeiro (Neumeier et al., 2006).

667

### 668 **2.5.4 Adiponectina**

669 A adiponectina é uma citocina anti-inflamatória que, juntamente com a leptina,  
670 representa a adipocina mais abundante no organismo (Weisberg et al., 2003). Essa  
671 adipocina inibe o  $TNF_{\alpha}$  e a IL-6, além de estimular a produção de IL-10, uma  
672 adipocina anti-inflamatória (Wulster-Radcliffe et al., 2004). Além do papel anti-  
673 inflamatório, a adiponectina desempenha uma ação anorexígena, de regulação do  
674 balanço energético e aumento à sensibilidade à insulina (Ronti et al., 2006). Essa  
675 citocina anti-inflamatória atua em diferentes tecidos, sendo seus receptores AdipoR1  
676 e AdipoR2 identificados no tecido músculo- esquelético, fígado, cérebro (Yamauchi

677 et al., 2003), células  $\beta$ -pancreáticas (Kharroubi et al., 2003) e macrófagos (Chinetti et  
678 al., 2004).

679 Em indivíduos obesos, a concentração plasmática de adiponectina se  
680 encontra reduzida em relação a indivíduos magros (Ouchi et al., 2003). Em  
681 contrapartida, após a redução da massa corporal há uma elevação na concentração  
682 sérica de adiponectina (Yang et al., 2001). Da mesma forma que a redução da  
683 concentração de adiponectina está associada ao aumento da resistência periférica à  
684 insulina em quadros de obesidade, a redução da gordura corporal leva ao aumento  
685 da concentração plasmática dessa adipocina e aumento da sensibilidade periférica à  
686 insulina (Shah et al., 2008).

687

#### 688 **2.5.5 Leptina**

689 A leptina é um hormônio polipeptídico que é expresso principalmente pelos  
690 adipócitos. Esse adipocina pró-inflamatória regula a ingestão alimentar, gasto  
691 energético e massa corporal servindo como um sinalizador entre o tecido adiposo e  
692 o sistema nervoso central (Campfield et al., 1995, Zhang et al., 1994). Além disso, a  
693 leptina apresenta um papel da resposta inflamatória, pois aumenta a produção de  
694 linfocinas pró-inflamatórias (Lord et al., 1998).

695 A síntese de leptina é estimulada pelas citocinas pró-inflamatórias  $\text{TNF}_\alpha$  e IL-6  
696 (Fruhbeck and Gomez-Ambrosi, 2001), o que evidencia a participação da leptina na  
697 modulação da função imune (Loffreda et al., 1998). Estudos demonstram que a  
698 concentração sérica de leptina é maior em adolescentes obesos em relação a  
699 indivíduos magros na mesma faixa etária (Viso Gonzalez et al., 2005), o que aponta  
700 para um efeito da capacidade de modulação imune da leptina no desenvolvimento  
701 da obesidade. Essa afirmação é suportada pelo fato de que a concentração sérica  
702 de leptina é reduzida mediante a redução da massa corporal (van Rossum et al.,  
703 2000). Nos macrófagos, a leptina induz a ativação da MAPK, sinal de tradução e  
704 ativação da transcrição 3 (STAT3) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK),  
705 culminando na síntese de  $\text{TNF}_\alpha$  e IL-6 (Greenway and Smith, 2000).

706 Cabe salientar que mecanismos de mediação inflamatória citados estão  
707 associados à gordura visceral, tida como gordura “ruim”, em comparação à gordura

708 subcutânea, tida como gordura “boa”. Essa afirmação suporta-se no fato de que a  
709 remoção cirúrgica da gordura visceral em animais de laboratório aumenta a  
710 tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (Barzilai et al., 1999, Gabriely et al.,  
711 2002, Kim et al., 1999). Ao mesmo tempo, o transplante de gordura subcutânea para  
712 a cavidade visceral também aumenta a tolerância à glicose e a sensibilidade à  
713 insulina (Tran et al., 2008).

## 714 3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

715

### 716 3.1 Hipótese

717

718 A hipótese deste trabalho foi a de que o butafosfan melhora os resultados da  
719 produção *in vitro* de embriões bovinos e reduz a resposta inflamatória em  
720 camundongos submetidos a uma dieta hipercalórica.

721

### 722 3.2 Objetivo Geral

723

724 O objetivo desse estudo foi verificar o efeito da molécula de butafosfan na  
725 qualidade de oócitos e embriões bovinos e na regulação de marcadores  
726 relacionados à sinalização inflamatória no tecido adiposo visceral de camundongos.

727

### 728 3.3 Objetivos Específicos

729

- 730 • Determinar o efeito da adição de butafosfan ao meio de MIV na maturação  
731 nuclear de oócitos bovinos;
- 732 • Determinar o efeito da adição de butafosfan ao meio de MIV na taxa de  
733 clivagem de oócitos bovinos;
- 734 • Determinar o efeito da adição de butafosfan ao meio de MIV na taxa de  
735 blastocisto;
- 736 • Determinar o efeito da adição de butafosfan ao meio de MIV na expressão de  
737 genes marcadores de qualidade de oócitos e embriões bovinos;
- 738 • Determinar o efeito do butafosfan na concentração sérica de marcadores  
739 inflamatórios em camundongos submetidos a diferentes cenários metabólicos;
- 740 • Determinar o efeito do butafosfan na expressão de genes ligados ao processo  
741 de sinalização inflamatória na gordura visceral de camundongos submetidos a  
742 diferentes cenários metabólicos;

743

744 **4 CAPÍTULOS**

745

746 **4.1 Artigo 1**

747

748 **Effect of butafosfan on oocyte maturation and bovine embryo development**

749 (Manuscrito a ser submetido à revista *Animal Reproduction Science*)

750

751 **ABSTRACT**

752 While 60 to 80% of oocytes matured *in vivo* reached competence, the proportion of  
753 maturation *in vitro* is rarely higher than 40%, highlighting the need for better  
754 alternatives to improve *in vitro* maturation (IVM) and embryo *in vitro* production (IVP).  
755 Oocyte maturation is regulated by several factors, including phosphorylation and  
756 dephosphorylation pathways. Therefore, butafosfan represents an alternative to  
757 modulate these factors by donating phosphate ions. The aim of this study was to  
758 evaluate the effect of butafosfan in oocyte maturation and embryo IVP. A total of 809  
759 cumulus-oocyte complexes (COCs) were distributed in groups with IVM medium  
760 supplemented with different concentrations of butafosfan (GC=0.00 mg/mL; T1=0.05  
761 mg/mL; T2=0.1 mg/mL and T3=0.2 mg/mL). Then, 20 oocytes per group were  
762 collected to evaluate nuclear maturation and gene expression on cumulus cells and  
763 oocytes and the remaining oocytes were inseminated and cultured until day 7, when  
764 blastocysts were collected to gene expression analysis. A dose-dependent effect of  
765 butafosfan was observed in the decrease of cleavage rate and embryo development.  
766 No difference between groups was observed in maturation rate and expression of  
767 genes related to oocyte quality. Our results suggest that butafosfan was prejudicial  
768 for oocytes, compromising cleavage and embryo development.

769 **Keywords:** butafosfan, *in vitro* maturation, oocytes, gene expression.

## 770 1. Introduction

771

772 *In vitro* production (IVP) of bovine embryos is a reproductive technique that  
773 allows to improve the genetic gain by reducing the interval between generations and  
774 increasing offspring of individuals of high genetic merit. However, advances in IVP  
775 are compromised due to only 25-40% of oocytes matured *in vitro* reaching  
776 competence, while rates of 60 to 80% are observed *in vivo* (Farin et al., 2007). This  
777 is attributed to differences in the maturation process *in vitro* and *in vivo* (Combelles et  
778 al., 2002). During maturation, oocytes should complete meiosis with correct  
779 chromosome segregation and cytoplasmic rearrangement (Ferreira et al., 2009), to  
780 achieve competence and to reach the blastocyst stage (Luciano et al., 2011). Despite  
781 *in vitro* maturation (IVM) supports nuclear maturation process, cytoplasmic  
782 maturation is often compromised (Combelles et al., 2002).

783 Oocyte maturation is regulated by different process, including phosphorylation  
784 and dephosphorylation of proteins and cellular signals (Colgan et al., 1996, Gavin  
785 and Schorderet-Slatkine, 1997, Thach, 1992). Moreover, ATP concentration is crucial  
786 for formation of meiotic spindle (Zhang et al., 2006), calcium oscilation (Dumollard et  
787 al., 2006), polar body extrusion and competence development during oocyte  
788 maturation (Hao et al., 2009, Stojkovic et al., 2001). The levels of ATP are associated  
789 with mitochondrial reorganization and total number of cells in blatocysts. Embryos  
790 with low concentration of ATP show a lower development and cell number when  
791 compared to embryos with higher levels of ATP (Stojkovic et al., 2001). Mitochondria  
792 are responsible for ATP production, required for protein synthesis in maturation and  
793 embryo development processes (Krisher and Bavister, 1998, Stojkovic et al., 2001).

794 Thus, the use of supplements to improve mitochondrial metabolism and ATP levels  
795 during IVM represents an alternative to obtain a better effectiveness in this process.

796 Butafosfan is a molecule of organic phosphorus that has been evaluated as  
797 metabolic modulator (Pereira et al., 2013), maybe representing an alternative to  
798 improve oocyte metabolism and thereafter, acquisition of competence. Some results  
799 suggest Empiric results a beneficial effect of butafosfan in cattle and horses assisted  
800 reproduction programs, although without scientific grounds. When associated to  
801 cyanocobalamin, butafosfan improved the number of small follicles in cows (Lima  
802 2014). Phosphorus is also essential for synthesis of nucleotides related to hormonal  
803 signaling (Cunningham 2002) and for cell growth, differentiation, and integrity (Berg  
804 et al., 2006). According to Hasi Su-rong and colleagues, ATP concentration is higher  
805 in muscle and liver tissues of rats treated with butafosfan (Hasi Su-rong et al., 2004).  
806 The fundamental aim of this study was to evaluate the effect of butafosfan addition in  
807 the maturation medium in oocyte maturation, bovine embryo development and  
808 expression of genes associated with acquisition of oocyte competence and embryo  
809 quality.

810

## 811 **2. Material e methods**

812

### 813 *2.1 Oocyte collection and selection of cumulus-oocyte complexes (COCs)*

814 Bovine ovaries were collected from a local abattoir and transported to the  
815 laboratory in NaCl 0.9% solution with gentamicin 0.5% at 30 °C. The COCs were  
816 aspirated from follicles (3-8 mm in diameter) using a sterile needle, selected just  
817 COCs grade 1 and 2 using a stereo microscope according to Leibfried & First



818 (Leibfried and First, 1979) and then, washed three times in washing medium  
819 (Biotecnologia Animal<sup>®</sup>, Brasília, DF, Brazil).

## 820 *2.2 Experimental design and in vitro maturation (IVM)*

821 The COCs (n=809) were randomly distributed in groups of approximately 60  
822 oocytes for each routine, in a total of six routines, as follows: control group (CG)  
823 (n=207); treatment 1 (T1) (n=178); treatment 2 (T2) (n=217) and treatment 3 (T3)  
824 (n=207). Groups in 500  $\mu$ L drops of IVM medium TCM (Biotecnologia Animal<sup>®</sup>,  
825 Brasília, DF, Brazil) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) were placed  
826 in Nunc plates. The dose of butafosfan to be supplemented was the serum  
827 concentration, half and twice the dose. For groups T1, T2 and T3, the maturation  
828 medium was supplemented with 0.05, 0.1 and 0.2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  of butafosfan (Bayer  
829 Saúde Animal, São Paulo, SP, Brazil), respectively. The IVM was performed at 39 °C  
830 in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, maximum saturation for 24 h.

## 831 *2.3 In vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC)*

832 *In vitro* fertilization (IVF) was performed for 24 h after MIV, with semen  
833 obtained from the same ejaculate from a *Bos taurus* bull. Oocytes were washed in  
834 IVF medium (Biotecnologia Animal<sup>®</sup>, Brasília, DF, Brasil) and placed in Nunc<sup>®</sup> plates  
835 in 400  $\mu$ L drops of the same medium supplemented with 0.6% of bovine serum  
836 albumin fatty-acid-free (BSA-FAF). Semen was thawed at 35 °C for 30 s and  
837 spermatic selection was performed using MiniPercoll density gradient method. Then,  
838 oocytes were inseminated with sperm concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL and cultured  
839 at 39 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, maximum saturation for 20 h.

840 After IVF, presumptive zygotes were denuded from cumulus cells by repeated  
841 pipetting in washing medium (Biotecnologia Animal<sup>®</sup>, Brasília, DF, Brasil). Denuded

842 oocytes were washed in medium for *in vitro* culture (ICV) (Biotecnologia Animal<sup>®</sup>,  
843 Brasília, DF, Brasil) and transferred to Nunc plates in 200 µL of the same medium for  
844 ICV supplemented with 5% of FBS and covered with 400 µL of mineral oil. The  
845 culture was conducted at 39 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, maximum saturation  
846 for seven days after IVF. After 72 h (day 3) and 120 h (day 5), 50% of the medium for  
847 IVC was replaced by fresh medium. The cleavage rate was evaluated at day 2 and  
848 the rate of blastocysts was recorded at day 7 based on number of inseminated  
849 oocytes.

#### 850 *2.4 Analysis of nuclear maturation*

851 After IVM, five oocytes of each group, totaling 120 oocytes, were denuded by  
852 repeated pipetting, washed three times with PBS and fixed for 15 min in 4%  
853 paraformaldehyde. Then, a solution of PBS with 0.5% of TRITON X-100 was used for  
854 short-term storage. These oocytes were stained with Hoescht (33342) and fixed on  
855 microscope slides to evaluate nuclear maturation. Oocytes with polar body extrusion  
856 were classified as matured, indicating the metaphase II stage, while those with  
857 other chromatin configuration were classified as non-matured.

#### 858 *2.5 Analysis of gene expression*

859 After IVM, 15 oocytes of each group, totaling 360 oocytes, were denuded by  
860 repeated pipetting to collect cumulus cells and oocytes, which were stored in 100 µL  
861 of TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) at -70°C for subsequent evaluation  
862 of gene expression. At day 7, embryos were also collected and stored in 100µL of  
863 TRIzol at -70°C to evaluate the expression of genes related to embryo quality. Total  
864 RNA was extracted from cumulus cells, oocytes and embyos using TRIzol Reagent  
865 (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) and quantified in a NanoVue

866 spectrophotometer (General Electric Healthcare Limited, UK). Synthesis of cDNA  
867 was performed using iScript Reverse Trascrption Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad,  
868 Hercules, Califórnia, USA) according to manufacturer's instructions. Real-time PCR  
869 reactions were run on an Applied Biosystems 7500 RT-PCR (Applied Biosystems,  
870 Foster City, EUA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster  
871 City, EUA) and primers described on Table I. The expression of several genes was  
872 evaluated, as follows: *BAX* and *BCL2* as apoptosis markers; *AREG* and *EREG* as  
873 genes related to cumulus cells expansion and resumption of meiosis; *GDF9* and  
874 *BMP15* as indicators of oocyte quality; *GLUT1* and *PFKP* for analysis of energy  
875 metabolism in oocytes; and *PLAC8* that is related to ability of embryo implantation.  
876 Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, using H2A gene (*H2a*) as intern control.

**Table1. Primers used in RT-PCR**

<b>Gene</b>	<b>Primers sequence (5'-3')</b>	<b>Fragment length (bp)</b>	<b>Annealing temperature</b>	<b>Reference</b>
H2AFZ	F: GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG R: TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC		60°C	Portela et al 2010
BCL2	F: GAGTTCGGAGGGGTCATGTG R: GCCTTCAGAGACAGCCAGGA	203	60°C	Boruszewska et al 2015
BAX	F: GTGCCCCGAGTTGATCAGGAC R: CCATGTGGGTGTCCCAAAGT	126	60°C	Boruszewska et al 2015
PLAC8	F: TTTACCGCTCTGTGCCCTTT R: CCATGTGAACTTGACCAAGCAT	95	60°C	Boruszewska et al 2015
AREG	F: CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT R: CGTTCTTCAGCGACACCTTCA	100	60°C	Boruszewska et al 2015
EREG	F: TCACCGCGAGAAGGATGGAG R: GTACTIONAAGACCAGGACGAGC	73	60°C	Boruszewska et al 2015
GLUT1	F: GATCCACAGAGCGCAGCC R: TGTCAGCTTCTTGCTGGTGG	90	60°C	Boruszewska et al 2015
PFKP	F: TCAGAGAACCGTGCCTGGAAGAAA R: TGACCACAAGCTCCTTGATCTGCT	112	60°C	Boruszewska et al 2015
GDF9	F: AGCGCCCTCACTGCTTCTATAT	80	60°C	Hosoe et al 2011

BMP15 R: TTCCTTTTAGGGTGGAGGGAA  
F: ATCATGCCATCATCCAGAACC  
R: TAAGGGACACAGGAAGGCTGA

---

72

60°C

Hosoe et al 2011

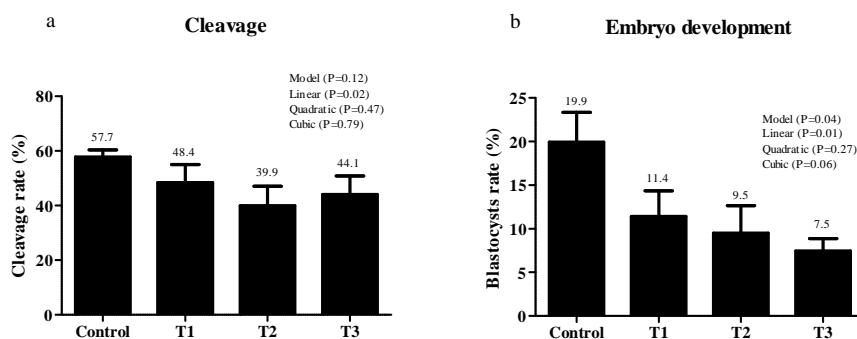
## 878 2.6 Statistical analysis

879 The analyses were carried out with SAS 9.0 (SAS, Cary, NC, EUA) using a  
 880 General Linear Model approach. Results are shown as mean  $\pm$  standard error of the  
 881 mean. Polynomial regression model was used to determine the linear, quadratic or  
 882 cubic effect of supplementation with 0.0, 0.05, 0.1 and 0.2 mg of butafosfan per mL  
 883 of IVM medium in the maturation, cleavage and blastocysts rates. The same was  
 884 performed to analyze the expression of genes *BAX*, *BCL2*, *AREG*, *EREG*, *GDF9*,  
 885 *BMP15*, *GLUT1*, *PFKP* in cumulus cells and oocytes, *BAX*, *BCL2* e *PLC8* in embryos,  
 886 and the *BAX/BCL2* relation in cumulus cells, oocytes and embryos.

887

## 888 3. Results

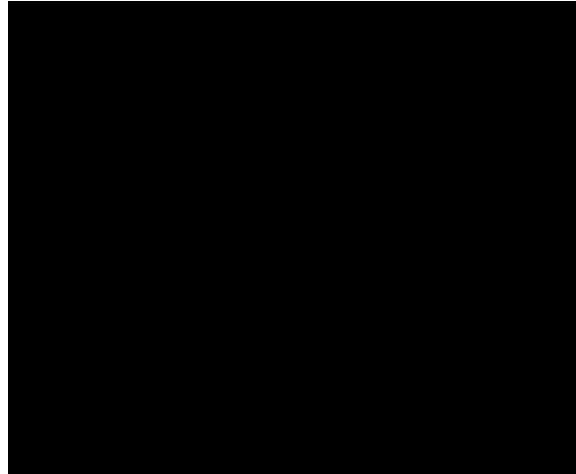
889 A linear effect was observed in cleavage rate ( $P=0.02$ ) and blastocyst rate  
 890 ( $P=0.01$ ), Figure 1. The increase in butafosfan doses resulted in reduction of  
 891 cleavage rate and embryo development.



892

893 Figure 1. Cleavage rate (a) and embryo development (b) after supplementation of  
 894 IVM medium with different doses of butafosfan. The cleavage rate and the embryo  
 895 development were verified at D2 and D7 respectively.

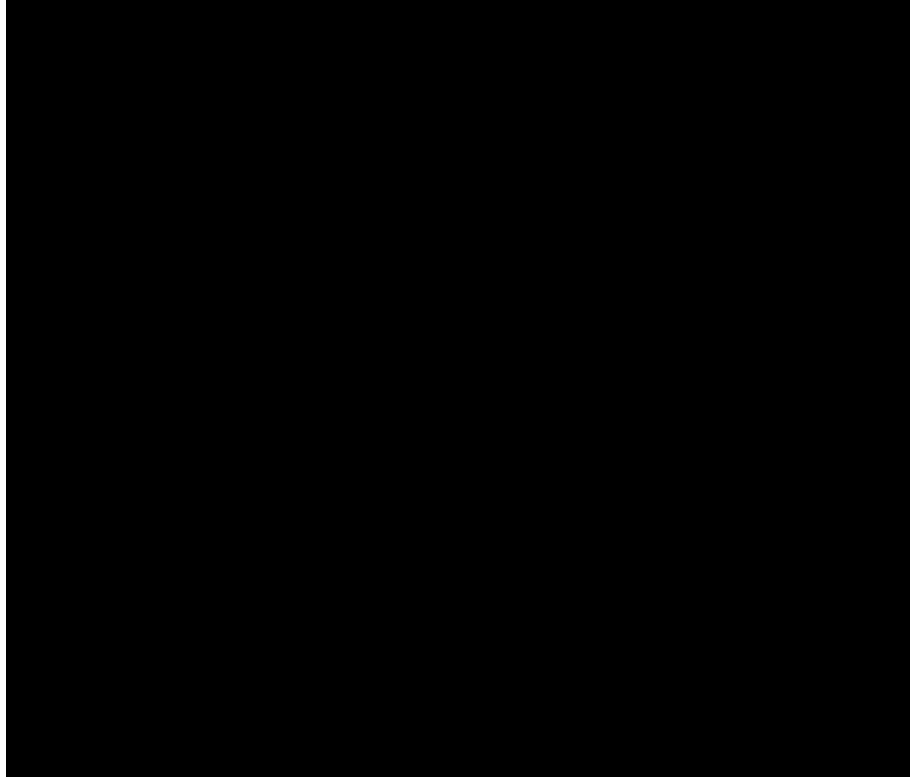
896 No difference was observed in oocyte nuclear maturation rate ( $P>0.05$ ), as  
897 observed in Figure 2.



898

899 Figure 2. Oocyte nuclear maturation rate (%), analysed by Hoescht staining after *in*  
900 *vitro* maturation.

901 Relative expression of genes *BAX*, *BCL2*, *AREG*, *EREG*, *GDF9*, *BMP15*,  
902 *GLUT1*, *PFKP* and *BAX/BCL2* relation in oocytes was also statistically equal  
903 between groups ( $P>0.05$ ), Figure 3.

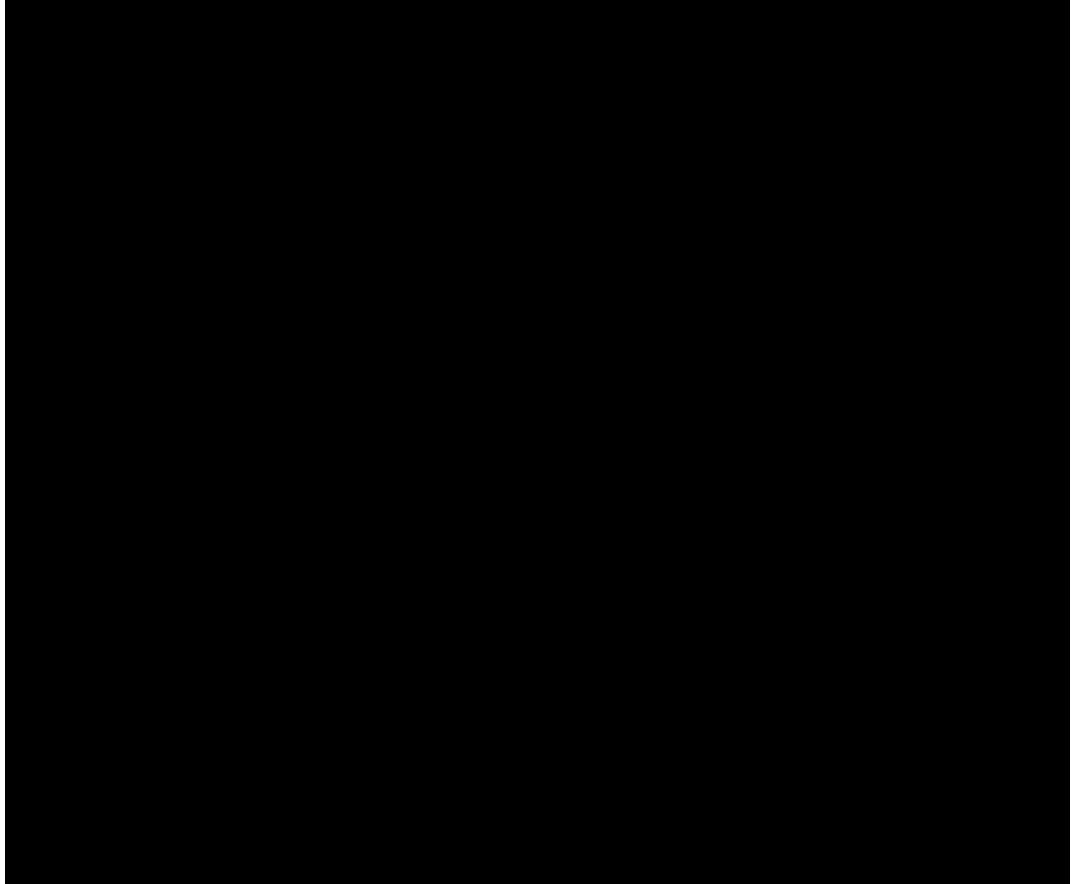


904

905 Figure 3. Relative expression of genes *BAX* (a), *BCL2*(b), *AREG* (d), *EREG* (e),  
906 *GDF9* (f), *BMP15* (g), *GLUT1* (h), *PFKP* (i) and *BAX/BCL2* relation (c) on oocytes.  
907 Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, using *H2a* as intern control, and are  
908 expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

909 In cumuls cells, relative expression of these genes showed no statistical  
910 difference between groups ( $P>0.05$ ), Figure 4.





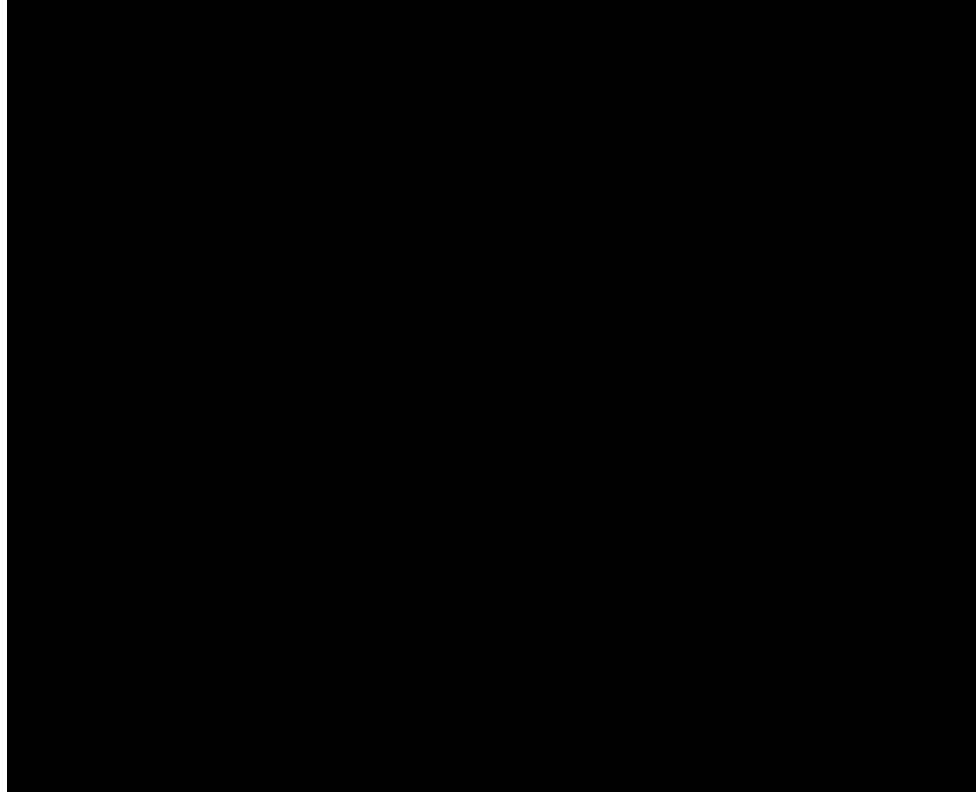
911  
912

913 Figure 4. Relative expression of genes *BAX* (a), *BCL2*(b), *AREG* (d), *EREG* (e),  
914 *GDF9* (f), *BMP15* (g), *GLUT1* (h), *PFKP* (i) and *BAX/BCL2* relation (c) on cumulus  
915 cells. Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, using *H2a* as intern control, and  
916 are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

917

918 No difference between groups was observed in relative expression of genes  
919 *BAX*, *BCL2* e *PLC8* and in the *BAX/BCL2* relation in embryos ( $P>0.05$ ), Figure 5.

920



921

922 Figure 5. Relative expression of genes *BAX* (a), *BCL2* (b) and *PLAC8* (d) and  
923 *BAX/BCL2* relation (c) in embryos. Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, using  
924 *H2a* as intern control, and are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean.

925

#### 926 4. Discussion

927 In this work, it was observed that increasing doses of butafosfan in IVM  
928 medium linearly decreased the cleavage rate. The same effect was observed for  
929 embryo development, which was lower as the concentration of butafosfan was  
930 higher, suggesting that butafosfan is prejudicial for oocytes. Tabeleão proposed that  
931 butafosfan may interfere in phosphorylation of molecules involved in cellular and  
932 molecular signaling (Tabeleão 2014). For reaching competence, oocytes need to  
933 complete nuclear and cytoplasmic maturation (Ferreira et al., 2009). Nuclear

934 maturation occurs by meiosis resumption through activation of promoting maturation  
935 factor (PMF). PMF is regulated by different kinases and phosphatases (Belloc et al.,  
936 2008). Thus, butafosfan may have presented a negative effect in PMF regulation,  
937 compromising meiosis resumption and oocytes nuclear maturation.

938         However, our results did not show any difference in oocyte maturation rate in  
939 groups supplemented or not with butafosfan in IVM medium, suggesting that its  
940 deleterious effect on cleavage rate and embryo development is not associated with  
941 nuclear maturation. Cytoplasmic maturation comprises the rearrangement of  
942 cytoplasmic organelles (Yamada and Isaji 2011), increase of lipid content and  
943 reduction of the Golgi complex, leading the oocyte to interrupt transcription by  
944 nucleolus condensation (Sirard and Coenen, 2006, Wang and Sun, 2007). This  
945 process gives the oocyte the ability to prevent polyspermy, to allow decondensation  
946 of the sperm in the ooplasm and to maintain embryonic development in the early  
947 stages (van den Hurk and Zhao, 2005). Thus, cytoplasmic maturation results in a  
948 cellular rearrangement that enables the oocyte to be fertilized (Dode 2006). Based on  
949 that, in this study butafosfan possibly affect acquisition of cytoplasmic competence,  
950 impairing fertilization, cleavage and embryo development.

951         Cumulus cells play a crucial role in oocyte maturation and competence  
952 acquisition (Tanghe et al., 2002). Here, the effect of butafosfan in the expansion of  
953 cumulus cells was also evaluated by gene expression analysis. *AREG* and *EREG* act  
954 in cumulus cells expansion (Ashkenazi et al., 2005, Park et al., 2004). These genes  
955 codify proteins responsible for mediate the effect of luteinizing hormone (LH) on  
956 cumulus cells (Ashkenazi et al., 2005). However, no decrease was observed in  
957 relative expression of *AREG* and *EREG* in groups with lower cleavage rates and  
958 embryo development. Conversely, Boruszewska and colleagues reported an

959 increase on relative expression of these genes in cumulus cells of oocytes  
960 matured in medium supplemented with lysophosphatidic acid. Moreover, they  
961 observed a superior rate of embryo development when compared to control group  
962 (Boruszewska et al., 2015). Thus, butafosfan may have not interfered in cumulus cells  
963 expansion.

964         The effect of butafosfan in apoptosis of cumulus cells, oocytes and embryos  
965 was evaluated by relative expression analysis of *BAX* and *BCL2* genes and  
966 *BAX/BCL2* relation. Yang & Rajamahendran reported that *BAX/BCL2* relation is  
967 associated with oocyte and embryo quality (Yang and Rajamahendran, 2002).  
968 Assou *et al* reported that higher mRNA levels of *BCL2*, an anti-apoptotic gene, in  
969 cumulus cells are associated with an increase in embryo quality (Assou et al., 2008).  
970 However, when groups with higher cleavage rates and embryo development were  
971 compared to those with lower rates, no difference was observed in expression of  
972 *BCL2* and *BAX*, a pro-apoptotic gene, or in *BAX/BCL2* relation for cumulus cells,  
973 oocytes or embryos, suggesting that treatment with butafosfan did not increase  
974 apoptosis. In another study, IVM medium was supplemented with recombinant  
975 paraoxanase-1 and a higher blastocyst rate was observed when compared to control  
976 group, however, no difference in *BAX/BCL2* relation was observed in cumulus cells,  
977 oocytes or embryos (Rincon et al., 2016). Thus, it is likely that the *BAX/BCL2* ratio is  
978 not directly associated with embryonic development.

979         Expression of genes related to oocyte quality was also evaluated by real-time  
980 PCR. Several studies have demonstrated that GDF-9 and BMP15 are markers for  
981 oocyte quality (Gendelman et al., 2010, Gendelman and Roth, 2012, Hussein et al.,  
982 2006). According to Su and colleagues, GDF-9 and BMP15 regulate the crosstalk  
983 between oocytes and granulosa cells, as well as the metabolism of cumulus cells (Su

984 et al., 2008). During IVM, bovine oocytes express *GDF-9* and *BMP15* (Gendelman  
985 et al., 2010, Gendelman and Roth, 2012, Pennetier et al., 2004). Gendelman *et al*  
986 (2010) reported that *GDF-9* expression is higher in oocytes with earlier cleavage than  
987 in oocytes with later cleavage. Additionally, supplementation of IVM medium with  
988 *GDF-9* and *BMP15* improved the competence development in bovine oocytes  
989 (Hussein et al., 2006). However, we did not observe any significant difference in  
990 expression of these genes in groups evaluated. Boruszewska *et al* also found no  
991 difference in *BMP15* expression in oocytes with higher *GDF-9* levels (Boruszewska et  
992 al., 2014). According to the authors, despite the increase in *GDF-9* expression in  
993 oocytes matured with lysophosphatidic acid, there was no increase in cleavage rate  
994 and blastocyst production compared to the control group. Therefore, it is possible  
995 that there are factors regulating the expression of *GDF-9* and *BMP15* that are not  
996 associated with oocyte quality.

997 Genes involved in glucose metabolism were also evaluated in this study.  
998 Glucose is an important energetic substrate for cumulus cells expansion, oocyte  
999 maturation and embryonic development (Rose-Hellekant et al., 1998). GLUT1 is the  
1000 most abundant passive glucose transporter and its expression is detected in oocytes  
1001 and embryos (Augustin et al., 2001). During IVM, GLUT1 promotes the passive  
1002 transport of glucose to COCs. According to Cetica *et al*, cumulus cells are  
1003 responsible for metabolize glucose and transfer pyruvate to the oocyte through gap  
1004 junctions (Cetica et al., 1999). Pyruvate is the energetic substrate of choice for  
1005 oocytes (Cetica et al., 1999). In cumulus cells, glycolysis is mediated by the PFKP  
1006 enzyme (Cetica et al., 2002). Thus, Boruszewska *et al* reported that oocytes  
1007 matured in the presence of lysophosphatidic acid had a high maturation rate and  
1008 reduced apoptosis, in addition to a high expression of GLUT1 and PFKP, suggesting

1009 that the level of expression of these genes is associated with oocyte and embryonic  
1010 quality (Boruszewska et al., 2015). Studies have described that butafosfan increases  
1011 ATP synthesis, improving the intracellular energetic status (Furll et al., 2010, Pereira  
1012 et al., 2013, Rollin et al., 2010). However, we did not observe significant difference in  
1013 GLUT1 and PFKP expression in cumulus cells and oocytes treated with different  
1014 concentrations of butafosfan.

1015 In the present study, the effect of butafosfan on the improvement of embryo-  
1016 maternal signaling ability was evaluated through expression analysis of *PLAC8*.  
1017 According to Rekik *et al*, *PLAC8* plays an important role in embryo-maternal signaling  
1018 (Rekik et al., 2011). Blastocysts produced *in vitro* that results in pregnancy show a  
1019 higher expression of *PLAC8* in comparison to resorbed blastocysts (El-Sayed et al.,  
1020 2006). However, no difference was observed in *PLAC8* mRNA levels in groups  
1021 treated with butafosfan.

1022 This results suggest that the beneficial effects of butafosfan observed in other  
1023 studies are probably not due to a local action and maybe related to improve  
1024 metabolic conditions of treated animals.

1025

## 1026 **5. Conclusion**

1027 The supplementation of IVM medium with different doses of butafosfan  
1028 decreases the cleavage rate and embryo development, with no difference in  
1029 maturation rate and in expression of genes related to oocyte and embryo quality.  
1030 Therefore, we suggest that butafosfan presents a deleterious effect to oocytes.  
1031 Considering that no effect was observed in nuclear maturation with addition of

1032 butafosfan in IVM medium, its effect on cytoplasmic maturation needs to be  
1033 investigated.

1034

1035 **References**

1036 Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M. & Tsafiriri, A., 2005.

1037 Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the  
1038 ovulatory response. *Endocrinology*. 146, 77-84.

1039 Assou, S., Haouzi, D., Mahmoud, K., Aouacheria, A., Guillemin, Y., Pantesco, V.,

1040 Reme, T., Dechaud, H., De Vos, J. & Hamamah, S., 2008. A non-invasive test  
1041 for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus  
1042 cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod*. 14, 711-9.

1043 Augustin, R., Pocar, P., Navarrete-Santos, A., Wrenzycki, C., Gandolfi, F., Niemann,

1044 H. & Fischer, B., 2001. Glucose transporter expression is developmentally  
1045 regulated in *in vitro* derived bovine preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*.  
1046 60, 370-6.

1047 Belloc, E., Pique, M. & Mendez, R., 2008. Sequential waves of polyadenylation and

1048 deadenylation define a translation circuit that drives meiotic progression.  
1049 *Biochem Soc Trans*. 36, 665-70.

1050 Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2006). Glycolysis and gluconeogenesis. In

1051 *Biochemistry*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., New York, NY. pp. 433–474.

1052 Boruszewska, D., Sinderewicz, E., Kowalczyk-Zieba, I., Grycmacher, K. & Woclawek-

1053 Potocka, I., 2015. The effect of lysophosphatidic acid during *in vitro* maturation  
1054 of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose

- 1055 metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade,  
1056 oocyte and blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol.* 13, 44.
- 1057 Boruszewska, D., Torres, A. C., Kowalczyk-Zieba, I., Diniz, P., Batista, M., Lopes-da-  
1058 Costa, L. & Woclawek-Potocka, I., 2014. The effect of lysophosphatidic acid  
1059 during *in vitro* maturation of bovine oocytes: embryonic development and  
1060 mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence.  
1061 *Mediators Inflamm.* 2014, 670670.
- 1062 Cetica, P. D., Pintos, L. N., Dalvit, G. C. & Beconi, M. T., 1999. Effect of lactate  
1063 dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and  
1064 utilization of oxidative substrates on *in vitro* maturation. *Theriogenology.* 51,  
1065 541-50.
- 1066 Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G. & Beconi, M., 2002. Activity of key enzymes involved  
1067 in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*.  
1068 *Reproduction.* 124, 675-81.
- 1069 Colgan, D. F., Murthy, K. G., Prives, C. & Manley, J. L., 1996. Cell-cycle related  
1070 regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature.* 384, 282-5.
- 1071 Combelles, C. M., Cekleniak, N. A., Racowsky, C. & Albertini, D. F., 2002.  
1072 Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human  
1073 oocytes. *Hum Reprod.* 17, 1006-16.
- 1074 Cunningham, J.G. (2002). *Textbook of Veterinary Physiology.* 3rd ed., W.B.Saunders  
1075 Co., Philadelphia, PA.
- 1076 Dumollard, R., Duchon, M. & Sardet, C., 2006. Calcium signals and mitochondria at  
1077 fertilisation. *Semin Cell Dev Biol.* 17, 314-23.
- 1078 El-Sayed, A., Hoelker, M., Rings, F., Salilew, D., Jennen, D., Tholen, E., Sirard, M.  
1079 A., Schellander, K. & Tesfaye, D., 2006. Large-scale transcriptional analysis of



- 1080 bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to  
1081 recipients. *Physiol Genomics*. 28, 84-96.
- 1082 Farin, C. E., Rodriguez, K. F., Alexander, J. E., Hockney, J. E., Herrick, J. R. &  
1083 Kennedy-Stoskopf, S., 2007. The role of transcription in EGF- and FSH-  
1084 mediated oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci*. 98, 97-112.
- 1085 Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A. &  
1086 Navarro, P. A., 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and  
1087 biochemical modifications and acquisition of developmental competence.  
1088 *Theriogenology*. 71, 836-48.
- 1089 Furll, M., Deniz, A., Westphal, B., Illing, C. & Constable, P. D., 2010. Effect of  
1090 multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the  
1091 metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci*. 93, 4155-64.
- 1092 Gavin, A. C. & Schorderet-Slatkine, S., 1997. Ribosomal S6 kinase p90rsk and  
1093 mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase  
1094 activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 46,  
1095 383-91.
- 1096 Gendelman, M. & Roth, Z., 2012. In vivo vs. *in vitro* models for studying the effects of  
1097 elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental  
1098 competence and gene expression. *Anim Reprod Sci*. 134, 125-34.
- 1099 Gendelman, M., Aroyo, A., Yavin, S. & Roth, Z., 2010. Seasonal effects on gene  
1100 expression, cleavage timing, and developmental competence of bovine  
1101 preimplantation embryos. *Reproduction*. 140, 73-82.
- 1102 Hao, Z. D., Liu, S., Wu, Y., Wan, P. C., Cui, M. S., Chen, H. & Zeng, S. M., 2009.  
1103 Abnormal changes in mitochondria, lipid droplets, ATP and glutathione  
1104 content, and Ca(2+) release after electro-activation contribute to poor

- 1105 developmental competence of porcine oocyte during *in vitro* ageing. *Reprod*  
1106 *Fertil Dev.* 21, 323-32.
- 1107 Hasi Su-rong, D.U., Xiao-yan, Z.H.U., Bei-lei, J., 2004. Studies on Effects of  
1108 Compound Butaphosphan Solution on Endurance Capability and Energy  
1109 Metabolism in Mice. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica.* 35 (03), 290-294.
- 1110 Hosoe, M., Kaneyama, K., Ushizawa, K., Hayashi, K., Takahashi, T., 2011.  
1111 Quantitative analysis of bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth  
1112 differentiation factor 9 (GDF9) gene expression in calf and adult bovine  
1113 ovaries. *Reprod Biol Endocrinol.* 9, 33.
- 1114 Hussein, T. S., Thompson, J. G. & Gilchrist, R. B., 2006. Oocyte-secreted factors  
1115 enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol.* 296, 514-21.
- 1116 Krisher, R. L. & Bavister, B. D., 1998. Responses of oocytes and embryos to the  
1117 culture environment. *Theriogenology.* 49, 103-14.
- 1118 Leibfried, L. & First, N. L., 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and  
1119 their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci.* 48, 76-86.
- 1120 Lima, M. (2014). Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a produção de  
1121 oócitos e embriões *in vitro* de vacas Jersey. Dissertação - Programa de pós-  
1122 graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- 1123 Luciano, A. M., Franciosi, F., Modina, S. C. & Lodde, V., 2011. Gap junction-  
1124 mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine  
1125 oocyte growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s).  
1126 *Biol Reprod.* 85, 1252-9.
- 1127 Park, J. Y., Su, Y. Q., Ariga, M., Law, E., Jin, S. L. & Conti, M., 2004. EGF-like  
1128 growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science.* 303,  
1129 682-4.

- 1130 Pennetier, S., Uzbekova, S., Perreau, C., Papillier, P., Mermillod, P. & Dalbies-Tran,  
1131 R., 2004. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER,  
1132 ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and  
1133 preimplantation embryos. *Biol Reprod.* 71, 1359-66.
- 1134 Pereira, R. A., Silveira, P. A., Montagner, P., Schneider, A., Schmitt, E., Rabassa, V.  
1135 R., Pfeifer, L. F., Del Pino, F. A., Pulga, M. E. & Correa, M. N., 2013. Effect of  
1136 butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism and milk  
1137 production in dairy cows. *Animal.* 7, 1143-7.
- 1138 Portela, V. M., Machado, M., Buratini Jr, J., Zamberlam, G., Amorim, R.L.,  
1139 Goncalves, P., et al., 2010. Expression and function of fibroblast growth factor  
1140 18 in the ovarian follicle in cattle. *Biol Reprod.* 83, 339-346.
- 1141 Rezik, W., Dufort, I. & Sirard, M. A., 2011. Analysis of the gene expression pattern of  
1142 bovine blastocysts at three stages of development. *Mol Reprod Dev.* 78, 226-  
1143 40.
- 1144 Rincon, J., Madeira, E. M., Campos, F. T., Mion, B., Silva, J. F., Absalon-Medina, V.  
1145 A., Butler, W. R., Correa, M. N., Pegoraro, L. & Schneider, A., 2016.  
1146 Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo  
1147 development *in vitro*. *Reprod Domest Anim.* 51, 827-30.
- 1148 Rollin, E., Berghaus, R. D., Rapnicki, P., Godden, S. M. & Overton, M. W., 2010. The  
1149 effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum  
1150 beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle.  
1151 *J Dairy Sci.* 93, 978-87.
- 1152 Rose-Hellekant, T. A., Libersky-Williamson, E. A. & Bavister, B. D., 1998. Energy  
1153 substrates and amino acids provided during *in vitro* maturation of bovine  
1154 oocytes alter acquisition of developmental competence. *Zygote.* 6, 285-94.

- 1155 Sirard, M. A. & Coenen, K., 2006. *In vitro* maturation and embryo production in cattle.  
1156 Methods Mol Biol. 348, 35-42.
- 1157 Stojkovic, D., Zhang, P. & Crespi, V. H., 2001. Smallest nanotube: breaking the  
1158 symmetry of sp(3) bonds in tubular geometries. Phys Rev Lett. 87, 125502.
- 1159 Su, Y. Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Affourtit, J. P., Pangas, S. A.,  
1160 Matzuk, M. M. & Eppig, J. J., 2008. Oocyte regulation of metabolic  
1161 cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9  
1162 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. Development. 135, 111-21.
- 1163 Tabeleão, V.C. (2014). Efeito do butafosfan no metabolismo de vacas leiteiras  
1164 saudáveis ou com mastite clínica. Tese – Programa de pós-graduação em  
1165 Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas.
- 1166 Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M. & de Kruif, A., 2002. Minireview:  
1167 Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and  
1168 fertilization. Mol Reprod Dev. 61, 414-24.
- 1169 Thach, R. E., 1992. Cap recap: the involvement of eIF-4F in regulating gene  
1170 expression. Cell. 68, 177-180.
- 1171 van den Hurk, R. & Zhao, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their  
1172 growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology.  
1173 63, 1717-51.
- 1174 Wang, Q. & Sun, Q. Y., 2007. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular  
1175 and molecular predictors. Reprod Fertil Dev. 19, 1-12.
- 1176 Yamada, M. & Isaji, Y., 2011. Structural and functional changes linked to, and factors  
1177 promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. Reprod Med Biol.  
1178 2, 69-79.

- 1179 Yang, M. Y. & Rajamahendran, R., 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in  
1180 relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. Anim  
1181 Reprod Sci. 70, 159-69.
- 1182 Zhang, X., Wu, X. Q., Lu, S., Guo, Y. L. & Ma, X., 2006. Deficit of mitochondria-  
1183 derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. Cell  
1184 Res. 16, 841-50.
- 1185

1186 **4.2 Artigo 2**

1187

1188 **Effect of butafosfan on the regulation of inflammatory markers in adipose**  
1189 **tissue of mice submitted to a hypercaloric diet and dietary restriction**

1190 (Manuscrito a ser submetido à revista *Biochemical and Biophysical Research*  
1191 *Communications*)

1192 **ABSTRACT**

1193 Visceral fat plays an important role in regulation of obesity. Several pro and anti-  
1194 inflammatory adipokines are secreted by adipose tissue and act mediating obesity-  
1195 related mechanisms. Phosphorylation of enzymes and transcription factors regulates  
1196 the synthesis of adipokines. Understanding the process involved in adipokines  
1197 signaling, as well as looking for alternatives for their modulation may contribute to  
1198 treat obesity side effects. Butafosfan is a molecule of organic phosphorus that act as  
1199 donor of phosphate ions and may, therefore, interfere in the regulation mechanism of  
1200 adipokines synthesis. The aim of this work was to evaluate the effect of butafosfan in  
1201 the adipokines serum concentration and in the expression of genes related to obesity  
1202 in male mice. Animals were distributed in six groups with seven animals per group,  
1203 as follows: CRB- commercial diet with dietary restriction and butafosfan application;  
1204 CRS- commercial diet with dietary restriction and saline application; HCRB-  
1205 hipercaloric diet with dietary restriction and butafosfan application; HCRS-  
1206 hipercaloric diet with dietary restriction and saline application; HSRB- hipercaloric diet  
1207 without dietary restriction and butafosfan application; HSRS- hipercaloric diet without  
1208 dietary restriction and saline application. Analyses were performed for all groups with  
1209 dietary restriction (CRS, CRB, HCRS e HCRB) or for all groups with hypercaloric diet  
1210 (HSRS, HSRB, HCRS e HCRB). In both analyses, hypercaloric diet increased serum  
1211 IL-6 levels. Groups treated with butafosfan showed lower levels of Il-6 in serum as  
1212 well as *TNF $\alpha$*  mRNA in visceral adipose tissue. In conclusion, our results revealed  
1213 that butafosfan decreased serum concentration and gene expression of pro-  
1214 inflammatory adipokines, suggesting its possible benefit to reduce insulin resistance  
1215 associated to obesity.

1216 **Keywords:** butafosfan, obesity, inflammation, adipokines, gene expression.

## 1217 **Introduction**

1218 Obesity is an inflammatory disease [1] that has been studied based on the  
1219 composition and secretory activity of the adipose tissue [2]. Advances in molecular  
1220 biology allowed to determine that adipose tissue plays a role not only in energy  
1221 storage and thermal and mechanical protection, but also in secretion of molecules [3]  
1222 that act modulating cellular and molecular events [4]. Among the diverse range of  
1223 adipokines, adipose tissue secretes several pro and anti-inflammatory cytokines  
1224 associated to obesity [5].

1225 According to Ferrante, synthesis of pro-inflammatory adipokines is higher in  
1226 obese patients when compared with non-obese ones [6]. Thus, understanding the  
1227 relation between these cytokines and obesity is necessary to elucidate mechanisms  
1228 of regulation involved in this disease. Cytokines are protein hormones that act  
1229 regulating immunes and inflammatory processes [7]. In obesity, those highlighted are  
1230 adiponectin, tumoral necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin-6 (Il-6) and interleukin 1b  
1231 (Il-1 $\beta$ ) [8].

1232 Interleukin 1b is found in inactive form on cytoplasm. When activated by  
1233 caspase-1 [9], Il-1 $\beta$  has a pro-inflammatory effect, stimulating the production of  
1234 inflammatory mediators and the influx of immune cells, leading to inflammation and  
1235 tissue damage [10]. Similarly, TNF $\alpha$  is also a pro-inflammatory cytokine that is found  
1236 in higher levels in obese individuals [11]. TNF $\alpha$  synthesis lead to macrophage  
1237 infiltration in adipose tissue and inflammation [12]. TNF $\alpha$  activates the nuclear factor  
1238 *kappa*- $\beta$  pathway (NF-K $\beta$ ), which regulates transcription of genes related to immune  
1239 and inflammatory response [13]. This activation occurs by mitogen-activated protein  
1240 kinases (MAPK), that act by phosphorylation of serine and threonine residues and



1241 regulate cell growth, differentiation and proliferation [11]. Synthesis of Il-6 is also  
1242 regulated by  $TNF_{\alpha}$  [14].

1243 Interleukin- 6 (Il-6) is a pro-inflammatory cytokine that down-regulates the  
1244 expression of adiponectin, an anti-inflammatory adipokin produced by adipocytes  
1245 [15]. The accumulation of visceral fat leads to an increase in Il-6 levels, as well as of  
1246 other pro-inflammatory adipokins [16]. According to Bullo and colleagues, obesity is  
1247 associated to Il-6 increase, macrophage infiltration and local inflammation [17]. In  
1248 addition to the pro-inflammatory effect,  $TNF_{\alpha}$  and Il-6 lead to a reduction in glucose  
1249 tolerance and peripheral insulin resistance through inhibition of insulin receptor (IR)  
1250 expression [18], highlighting the role of obesity in diabetes mellitus type 2  
1251 development [12]. Other studies also demonstrated that surgical removal of visceral  
1252 fat in rats was associated to an increase of glucose tolerance and insulin sensitivity  
1253 [19-21]. On the other hand, transplantation of subcutaneous fat to the visceral cavity  
1254 increased glucose tolerance and insulin sensitivity [22], suggesting that visceral fat  
1255 plays a key role in modulating the development of metabolic diseases. Conversely,  
1256 adiponectin is an anti-inflammatory cytokine, which suppress  $TNF_{\alpha}$  [23]. Adiponectin  
1257 also regulates energy balance and insulin sensitivity increase [24]. In obesity, serum  
1258 adiponectin is decreased when compared to non-obese individuals [15]. Similarly,  
1259 plasma concentration of adiponectin is increased in slimming situations [25]. Thus,  
1260 modulation of lipid metabolism may be related to inflammatory process involved in  
1261 obesity.

1262 Butafosfan is a phosphoric acid-derived molecule that has been studied as  
1263 metabolic modulator [26-28]. Butafosfan is an organic phosphorus molecule that acts  
1264 as a donor of phosphorus ions, essential for cell metabolism. According to Pereira  
1265 and colleagues, the use of butafosfan associated to cyanocobalamin decreased non-

1266 esterified fatty acids (NEFA) and beta-hydroxybutyrate levels in cows in negative  
1267 energy balance, eliciting the role of this molecule in lipolysis modulation [27]. Other  
1268 studies have suggested that decrease in lipolysis possibly occurs due to a better  
1269 intracellular energetic condition associated to ATP synthesis, increased by  
1270 butafosfan-derivated phosphorus. Therefore, the fundamental aim of this study was  
1271 to evaluate the effect of butafosfan on expression of genes related to inflammation in  
1272 the adipose tissue of mice submitted to a hypercaloric diet and dietary restriction.

1273

#### 1274 ***Material e Methods***

1275 All animal experiments were approved by the Ethics Committee in Animal  
1276 Experimentation of the Federal University of Pelotas, under protocol number 6936.

#### 1277 *Animals*

1278 Male C57BL/6 mice aged 12 weeks were housed at the animal facility of the  
1279 Federal University of Pelotas. The animals were acclimated for one week before use  
1280 and kept for 10 weeks in photoperiod for 12/12 hours at 22 °C.

#### 1281 *Diet*

1282 Animals were fed with commercial ration Nuvilab® (Nuvital, Brazil) and  
1283 hipercaloric ration with the following formulation: 68% of Nuvilab®, 26% of  
1284 condensed milk, 1% of maize starch, 5% of vegetal oil and 2.5% of water. The  
1285 hipercaloric ration was pelleted and dried at 50 °C for 4 h. Ration was carried out  
1286 every 48h to keep quality.

#### 1287 *Treatment with butafosfan*

1288           Animals were injected subcutaneously with 50mg/kg of butafosfan at 12 hour-  
1289 intervals. A stock solution of butafosfan was prepared at 2.5mg/mL using saline.

1290    *Experimental design*

1291           Firstly, animals were distributed in six groups with seven animals per group.  
1292 Two groups received commercial ration and the other ones received hypercaloric  
1293 diet, both *ad libitum*, for a 9-week period. The animals were weighed weekly. The  
1294 ration supply and the leftovers were weighed in order to evaluate the average  
1295 consumption of each group. At week 10, animals of each diet were randomly  
1296 distributed in the following treatments: CRB- commercial diet with dietary restriction  
1297 and butafosfan application; CRS- commercial diet with dietary restriction and saline  
1298 application; HCRB- hypercaloric diet with dietary restriction and butafosfan  
1299 application; HCRS- hypercaloric diet with dietary restriction and saline application;  
1300 HSRB- hypercaloric diet without dietary restriction and butafosfan application; HSRS-  
1301 hypercaloric diet without dietary restriction and saline application. For one week,  
1302 groups that received dietary restriction were deprived of 40% of the previous average  
1303 of feed consumption. In this period, animals received butfosfan (CRB e HCRB e  
1304 HSRB) or saline solution (CRS e HCRS e HSRS) every 12 h. Animals were  
1305 euthanized at the end of week 10.

1306    *Euthanasia and collection of visceral adipose tissue*

1307           Animals were anesthetized by innalation with Halotano (Cristália, Brazil) and  
1308 decapitated. Blood samples were collected from cervical region in microtubes without  
1309 anticoagulants, kept in ice and then, centrifuged. Visceral fat was collected from  
1310 abdominal cavity and stored in at -80 °C for subsequent RNA extraction.

1311    *Analysis of serum interleukins*

1312 Blood samples were analysed using ELISA kits for mouse IL1- $\beta$  e IL-6 (Sigma  
1313 Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO, USA) to detect these pro-inflammatory cytokines. Briefly, 100  
1314  $\mu$ L of samples and standards were added in each well, incubated for 2,5 h at room  
1315 temperature and washed five times with PBS-T. Subsequently, antibody detection  
1316 solution was added for each cytokine and incubated for 1 h and, following five  
1317 washes with PBS-T, a working substrate was added to each well and incubation  
1318 proceeded for 45 min. After washing, TMB colorimetric reagent was added to each  
1319 well, incubated for 30 min and washed five times with PBS-T. A stop solution was  
1320 added to each well and the optical density was measured using a microplate reader  
1321 at 450 nm (Thermo Plate Reader, Brazil). Absorbance results were used to calculate  
1322 the total concentration of cytokines based on the standard curve.

### 1323 *Analysis of gene expression*

1324 The mRNA was isolated from adipose tissue using TRIzol reagent (Invitrogen,  
1325 Carlsbad, Califórnia, USA). Synthesis of cDNA was performed using iScript Reverse  
1326 Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA). Analysis of  
1327 gene expression was performed by Real-Time PCR in an Applied Biosystems 7500  
1328 RT-PCR equipment (Applied Biosystems, Foster City, USA), using SYBR Green  
1329 Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) and primers described on Table I.  
1330 The expression of adiponectin was evaluated as an anti-inflammatory marker, while  
1331 *TNF $\alpha$*  and interleukin 1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ) levels were analysed as inflammatory markers.  
1332 Results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, using *Gapdh* as intern control.

### 1333 *Statistical analysis*

1334 The analyses were carried out with GraphPad Prism5 (Graphpad Software  
1335 INC, EUA). Two-Way ANOVA was used to analyze the levels of serum interleukins

1336 and relative expression of mRNA comparing HSRS, HSRB, HCRS and HCRB groups  
1337 as well as for CRS, CRB, HCRS and HCRB groups. For interaction cases, the  
1338 Student's t-test was used to compare mean of groups. Differences were considered  
1339 significant at a *P* value of < 0.05.

1340

## 1341 **Results**

### 1342 *Diet*

1343 Ration consumption was not different between groups of mice that received  
1344 the control diet (33.46±1.6 g/day) and the hypercaloric diet (36.45±0.77 g/day)  
1345 (P=0.3) in the first 9 weeks of experiment. At week 9, a greater body weight  
1346 (35.89±1.06g) was observed in the group submitted to hypercaloric diet than in the  
1347 control groups (33.64±0,07) (P=0.03).

### 1348 *Interleukins serum levels*

1349 The effect of diet and butafosfan application in serum concentration of Il-1β  
1350 and Il-6 was evaluated in mice submitted to dietary restriction (CRS, CRB, HCRS and  
1351 HCRB groups), Figure 1. Il-1β levels were lower in animals that received hypercaloric  
1352 diet and butafosfan (HCRB) compared to the group submitted to control diet and  
1353 butafosfan (CRB) (P=0.02). Serum concentration of IL-6 was higher in HCRS group  
1354 when compared to other groups. IL-6 serum levels were affected by diet (P<0.0001)  
1355 and treatment (P<0.0001).

1356 The effect of dietary restriction and butafosfan was also evaluated in groups  
1357 that received hypercaloric diet (HSRS, HSRB, HCRS and HCRB). No difference was  
1358 observed in Il-1β serum concentration. Mice submitted to dietary restriction that

1359 received hypercaloric diet and saline solution (HCRS) showed higher levels of Il-6 in  
1360 serum which were reduced by butafosfan treatment ( $P<0.0001$ ). There was an effect  
1361 of treatment ( $P<0.0001$ ) and diet ( $P<0.0001$ ) in Il-6 serum levels. Results of  
1362 interleukins serum concentration can be observed in Figure 2.

### 1363 *Gene expression*

1364 Expression of genes *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  and *Adiponectin* was also evaluated for  
1365 animals submitted to dietary restriction (CRS, CRB, HCRS and HCRB groups). No  
1366 difference was observed in adiponectin levels in evaluated groups. Mice with dietary  
1367 restriction that received hypercaloric diet and saline solution (HCRS) had higher  
1368 levels of *IL-1 $\beta$*  expression in comparison to CRS and HCRB groups ( $P=0.03$ ). An  
1369 effect of treatment was observed ( $P=0.03$ ) on relative *TNF $\alpha$*  expression (Figure 3).

1370

1371 In groups HSRB, HSRB, HCRS and HCRB, the effect of dietary restriction and  
1372 butafosfan application was also evaluated. No difference was observed in  
1373 *adiponectin*, *IL-1 $\beta$*  and *TNF $\alpha$*  levels between groups. There was an effect of  
1374 treatment on relative expression of *TNF $\alpha$*  where butafosfan decreased *TNF $\alpha$*   
1375 expression (Figure 4).

1376

### 1377 **Discussion**

1378 In this study, the effect of butafosfan in inflammatory signaling of visceral  
1379 adipose tissue was investigated in mice submitted to dietary restriction or  
1380 hypercaloric diet. Comparing animals in dietary restriction, a hypercaloric diet  
1381 increased Il-6 concentration. According to Bullo and colleagues, obese individuals

1382 have an increase in Il-6 synthesis when compared to non-obese ones [17]. Here,  
1383 even animals that received hypercaloric diet and were submitted to dietary restriction  
1384 showed higher levels of Il-6 in serum when treated with saline solution. Conversely,  
1385 the treatment with butafosfan showed similar levels of this adipokin in comparison to  
1386 those that received control diet. Possibly, butafosfan acts by modulating Il-6  
1387 synthesis in individuals submitted to hypercaloric diet, to balance its concentration to  
1388 that observed in individuals with normal diet.

1389         Moreover, the hypercaloric diet increased relative expression of *Il-1 $\beta$* , but the  
1390 treatment with butafosfan reduced this levels to similar patterns of animals the  
1391 received a control diet, suggesting that butafosfan reduces inflammatory signaling in  
1392 high caloric intake situations. Similarly, mice that received a hypercaloric diet had a  
1393 high mRNA levels of *TNF $\alpha$* . Hotamisligil and colleagues observed an increased  
1394 expression of *TNF $\alpha$*  in obese rats [11] as obesity is classified as an inflammatory  
1395 disease [1]. However, the treatment with butafosfan reduced mRNA levels of *TNF $\alpha$*  to  
1396 the same levels of mice that received a control diet. Thus, we suggest that butafosfan  
1397 may has a beneficial effect in reducing insulin resistance associated to obesity  
1398 considering its role in reduction of pro-inflammatory factors.

1399         Surprisingly, a higher concentration of *Il-1 $\beta$*  was observed in CRB than in  
1400 HSRB group, different from that observed in gene expression analysis. It is well-  
1401 known that synthesis of pro-inflammatory molecules is increased in obese individuals  
1402 [6]. Thus, lower levels of *Il-1 $\beta$*  were expected to occur in animals that received normal  
1403 diet in comparison to hypercaloric diet groups. Thornberry and colleagues described  
1404 that *Il-1 $\beta$*  found in cytoplasm is an inactive form, and its activation depends on the  
1405 caspase-1 activity [9]. This may explain the high levels of *Il-1 $\beta$*  found in CRB group.

1406 Wiesenborn and colleagues observed that expression level of *Adiponectin* in  
1407 epididymal adipose tissue was not correlated to its plasmatic concentration, which  
1408 suggests that other factors may act in adipokines regulation [29]. In this study, no  
1409 difference was observed in relative expression of *Adiponectin* between groups  
1410 submitted to dietary restriction. Ouchi and colleagues reported that non-obese  
1411 individuals showed a lower adiponectin serum concentration than obese ones [15].  
1412 Similarly, Yang *et al* observed an increased level of adiponectin serum concentration  
1413 in individuals that lost weight [25]. Thus, it was expected to observe a different  
1414 expression of *Adiponectin* in groups fed with control diet and hypercaloric diet.  
1415 However, Wiesenborn et al. (2014) suggested that metabolic benefits of dietary  
1416 restriction may reduce the use of adiponectin, sustaining its serum concentration but  
1417 suppressing its production in adipose tissue [30].

1418 Comparing only groups in hypercaloric diet, serum concentration of Il-6 was  
1419 lower in mice treated with butafosfan. The serum concentration of Il-6 of mice not  
1420 submitted a dietary restriction but treated with butafosfan was similar to level of mice  
1421 submitted a dietary restriction. In another study, it was observed that obesity  
1422 increases Il-6 levels in serum [31]. Also, in the present study groups that received  
1423 butafosfan showed a lower expression of *TNF $\alpha$*  in comparison to those treated with  
1424 saline, suggesting that butafosfan may has an anti-inflammatory effect in metabolic  
1425 modulation of obese individuals.

1426 Adipokines act in their own regulation [3, 23]. Their synthesis is stimulated by  
1427 NF-K $\beta$ , which is translocated from cytoplasm to nucleus after phosphorylation of its  
1428 inhibitor (IK $\beta$ ) by inhibitor-K $\beta$  kinase (IKK). This pathway is regulated by several  
1429 molecules, including MAPKs that act phosphorylating serin and threonin residues  
1430 [13]. Therefore, a possible mechanism of action of butafosfan may be alteration of



1431 these phosphorylation processes due to phosphate ions donation, decreasing  
1432 synthesis of pro-inflammatory cytokines. However, further experiments are needed to  
1433 confirm this hypothesis and elucidate the mechanism of action of butafosfan in  
1434 regulating inflammatory markers production.

1435

### 1436 **Conclusion**

1437 Butafosfan reduces the concentration of serum IL-6 and the expression of *IL-*  
1438 *1β* and *TNFα* in animals submitted to hypercaloric diet. This inflammatory modulation  
1439 may contribute to increased insulin sensitivity in obese individuals. However, the  
1440 mechanism by which butafosfan acts remains unclear; similarly, their benefits for  
1441 health of individuals with metabolic disorders must be further elucidated.

1442

### 1443 **References**

- 1444 [1] U. N. Das, Is obesity an inflammatory condition?, *Nutrition*. 17 (2001) 953-66.
- 1445 [2] P. Trayhurn, B. Wang, I. S. Wood, Comment on: Hosagai et al. (2007) Adipose  
1446 tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation: *Diabetes*  
1447 56:901-911, *Diabetes*. 56 (2007) e14.
- 1448 [3] G. Fruhbeck, J. Gomez-Ambrosi, Modulation of the leptin-induced white adipose  
1449 tissue lipolysis by nitric oxide, *Cell Signal*. 13 (2001) 827-33.
- 1450 [4] M. Tschop, M. L. Heiman, Rodent obesity models: an overview, *Exp Clin*  
1451 *Endocrinol Diabetes*. 109 (2001) 307-19.
- 1452 [5] J. S. Yudkin, C. D. Stehouwer, J. J. Emeis, S. W. Coppack, C-reactive protein in  
1453 healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial

- 1454 dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?,  
1455 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19 (1999) 972-8.
- 1456 [6] A. W. Ferrante, Jr., Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the  
1457 language of inflammation, *J Intern Med.* 262 (2007) 408-14.
- 1458 [7] A. Kelly, A. Lynch, E. Vereker, Y. Nolan, P. Queenan, E. Whittaker et al., The anti-  
1459 inflammatory cytokine, interleukin (IL)-10, blocks the inhibitory effect of IL-1 beta on  
1460 long term potentiation. A role for JNK, *J Biol Chem.* 276 (2001) 45564-72.
- 1461 [8] M. Coelho, T. Oliveira, R. Fernandes, *Biochemistry of adipose tissue: an*  
1462 *endocrine organ*, *Arch Med Sci.* 9 (2013) 191-200.
- 1463 [9] N. A. Thornberry, H. G. Bull, J. R. Calaycay, K. T. Chapman, A. D. Howard, M. J.  
1464 Kostura et al., A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1  
1465 beta processing in monocytes, *Nature.* 356 (1992) 768-74.
- 1466 [10] C. A. Dinarello, Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1  
1467 family, *Annu Rev Immunol.* 27 (2009) 519-50.
- 1468 [11] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill, B. M. Spiegelman, Adipose expression of tumor  
1469 necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science.* 259  
1470 (1993) 87-91.
- 1471 [12] A. Kennedy, K. Martinez, C. C. Chuang, K. LaPoint, M. McIntosh, Saturated fatty  
1472 acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of  
1473 action and implications, *J Nutr.* 139 (2009) 1-4.
- 1474 [13] V. Baud, M. Karin, Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and  
1475 pitfalls, *Nat Rev Drug Discov.* 8 (2009) 33-40.
- 1476 [14] C. Chiellini, A. Bertacca, S. E. Novelli, C. Z. Gorgun, A. Ciccarone, A. Giordano  
1477 et al., Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue  
1478 via TNFalpha, *J Cell Physiol.* 190 (2002) 251-8.

- 1479 [15] N. Ouchi, S. Kihara, T. Funahashi, T. Nakamura, M. Nishida, M. Kumada et al.,  
1480 Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and  
1481 adipose tissue, *Circulation*. 107 (2003) 671-4.
- 1482 [16] P. A. Kern, S. Ranganathan, C. Li, L. Wood, G. Ranganathan, Adipose tissue  
1483 tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin  
1484 resistance, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 280 (2001) E745-51.
- 1485 [17] M. Bullo, P. Casas-Agustench, P. Amigo-Correig, J. Aranceta, J. Salas-Salvado,  
1486 Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet, *Public Health Nutr*. 10  
1487 (2007) 1164-72.
- 1488 [18] V. Menon, X. Zhi, T. Hossain, A. Bartke, A. Spong, A. Gesing et al., The  
1489 contribution of visceral fat to improved insulin signaling in Ames dwarf mice, *Aging*  
1490 *Cell*. 13 (2014) 497-506.
- 1491 [19] N. Barzilai, L. She, B. Q. Liu, P. Vuguin, P. Cohen, J. Wang et al., Surgical  
1492 removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance, *Diabetes*. 48 (1999) 94-8.
- 1493 [20] I. Gabriely, X. H. Ma, X. M. Yang, G. Atzmon, M. W. Rajala, A. H. Berg et al.,  
1494 Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging:  
1495 an adipokine-mediated process?, *Diabetes*. 51 (2002) 2951-8.
- 1496 [21] Y. W. Kim, J. Y. Kim, S. K. Lee, Surgical removal of visceral fat decreases  
1497 plasma free fatty acid and increases insulin sensitivity on liver and peripheral tissue  
1498 in monosodium glutamate (MSG)-obese rats, *J Korean Med Sci*. 14 (1999) 539-45.
- 1499 [22] T. T. Tran, Y. Yamamoto, S. Gesta, C. R. Kahn, Beneficial effects of  
1500 subcutaneous fat transplantation on metabolism, *Cell Metab*. 7 (2008) 410-20.
- 1501 [23] M. C. Wulster-Radcliffe, K. M. Ajuwon, J. Wang, J. A. Christian, M. E. Spurlock,  
1502 Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages, *Biochem*  
1503 *Biophys Res Commun*. 316 (2004) 924-9.

- 1504 [24] T. Ronti, G. Lupattelli, E. Mannarino, The endocrine function of adipose tissue:  
1505 an update, *Clin Endocrinol (Oxf)*. 64 (2006) 355-65.
- 1506 [25] W. S. Yang, W. J. Lee, T. Funahashi, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, C. L. Chao et  
1507 al., Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-  
1508 inflammatory protein, adiponectin, *J Clin Endocrinol Metab*. 86 (2001) 3815-9.
- 1509 [26] M. Furll, A. Deniz, B. Westphal, C. Illing, P. D. Constable, Effect of multiple  
1510 intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of  
1511 periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*. 93 (2010) 4155-64.
- 1512 [27] R. A. Pereira, P. A. Silveira, P. Montagner, A. Schneider, E. Schmitt, V. R.  
1513 Rabassa et al., Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum  
1514 metabolism and milk production in dairy cows, *Animal*. 7 (2013) 1143-7.
- 1515 [28] E. Rollin, R. D. Berghaus, P. Rapnicki, S. M. Godden, M. W. Overton, The effect  
1516 of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum beta-  
1517 hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle, *J Dairy Sci*.  
1518 93 (2010) 978-87.
- 1519 [29] S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, A. W.  
1520 Ferrante, Jr., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue,  
1521 *J Clin Invest*. 112 (2003) 1796-808.
- 1522 [30] D. S. Wiesenborn, V. Menon, X. Zhi, A. Do, A. Gesing, Z. Wang et al., The effect  
1523 of calorie restriction on insulin signaling in skeletal muscle and adipose tissue of  
1524 Ames dwarf mice, *Aging (Albany NY)*. 6 (2014) 900-12.
- 1525 [31] M. M. Rogero, J. Tirapegui, M. A. Vinolo, M. C. Borges, I. A. de Castro, I. S.  
1526 Pires et al., Dietary glutamine supplementation increases the activity of peritoneal  
1527 macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice inoculated with *Mycobacterium*  
1528 *bovis bacillus Calmette-Guerin*, *J Nutr*. 138 (2008) 1343-8.

- 1529 [32] V. Galli, R. da Silva Messias, S. D. dos Anjos e Silva, C. V. Rombaldi, Selection  
1530 of reliable reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction  
1531 studies in maize grains, *Plant Cell Rep.* 32 (2013) 1869-77.
- 1532 [33] D. R. Johnson, J. C. O'Connor, R. Dantzer, G. G. Freund, Inhibition of vagally  
1533 mediated immune-to-brain signaling by vanadyl sulfate speeds recovery from  
1534 sickness, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (2005) 15184-9.
- 1535 [34] D.S.Wiesenborn, V. Menon, X. Zhi, A. Do, A. Gesing, Z. Wang, A. Bartke, D.A.  
1536 Altomare, M.M. Masternak, The effect of calorie restriction on insulin signaling in  
1537 skeletal muscle and adipose tissue of Ames dwarf mice, *Aging.* 6 (2014) 900–12.  
1538

1539 **Figure legends**

1540

1541 Figure 1. Serum concentration (pg/mL) of Il-1 $\beta$  (a) and Il-6 (b) in groups submitted to  
1542 dietary restriction receiving control or hypercaloric diet with butafosfan or saline.  
1543 Different letters represent statistical difference (P<0.05).

1544 Figure 2. Serum concentration (pg/mL) of Il-1 $\beta$  (a) and Il-6 (b) in groups submitted to  
1545 hypercaloric diet with or without dietary restriction receiving butafosfan or saline  
1546 solution. Different letters represent statistical difference (P<0.05).

1547 Figure 3. Relative mRNA expression levels of *Adiponectin* (a), *Il-1 $\beta$*  (b) and *TNF $\alpha$*  (c)  
1548 in groups submitted to dietary restriction receiving control or hypercaloric diet with  
1549 butafosfan or saline. Different letters represent statistical difference (P<0.05).

1550 Figure 4. Relative mRNA expression levels of *Adiponectin* (a), *Il-1 $\beta$*  (b) and *TNF $\alpha$*  (c)  
1551 in groups submitted to hypercaloric diet with or without dietary restriction receiving  
1552 butafosfan or saline. Different letters represent statistical difference (P<0.05).

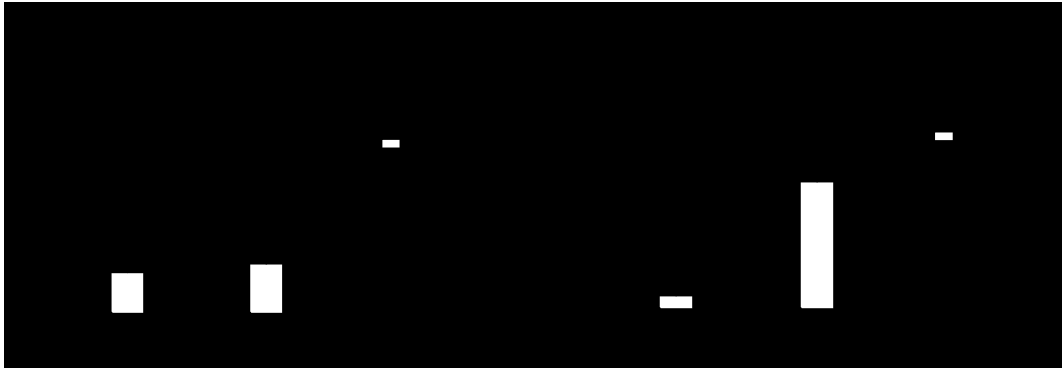
1553

**Table I. Primers used in RT-PCR**

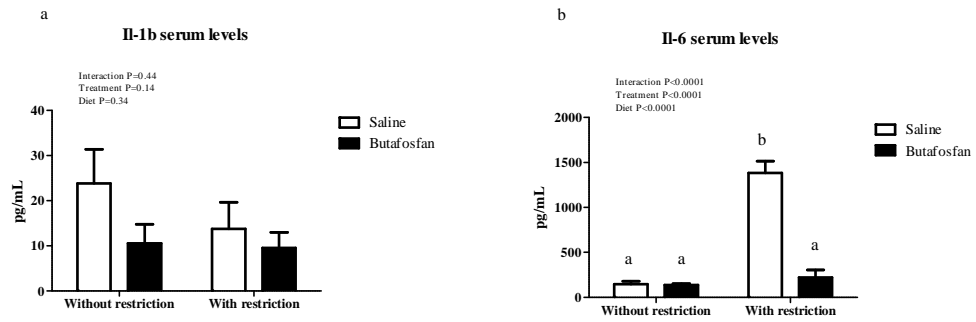
<b>Gene</b>	<b>Primer sequences (5'-3')</b>	<b>Fragment length (pb)</b>	<b>Annealing temperature</b>	<b>Reference</b>
<i>Gapdh</i>	F: AACGACCCCTTCATTGAC	191	60	[32]
	R: TCCACGACATACTCAGCAC			
<i>Tnfa</i>	F: TAGCAAACCACCAAGTGGAG	137	62	[18]
	R: AACCTGGGAGTAGACAAGGT			
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	F: CTGTGTCTTTCCCGTGGACC	200	60	[33]
	R: CAGCTCATATGGGTCCGACA			
<i>Adiponectin</i>	F: CTTCTTGGTCCTAAGGGTGA	119	60	[34]
	R: CGATACACATAAGCGGCTTC			

1556 **Figures**

1557



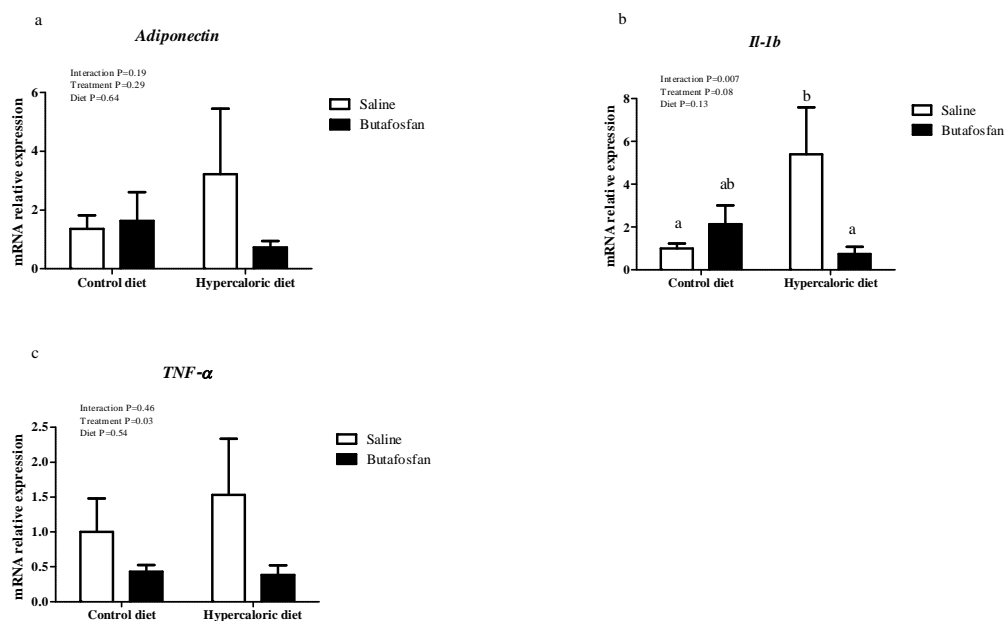
1558 **Figure 1.**



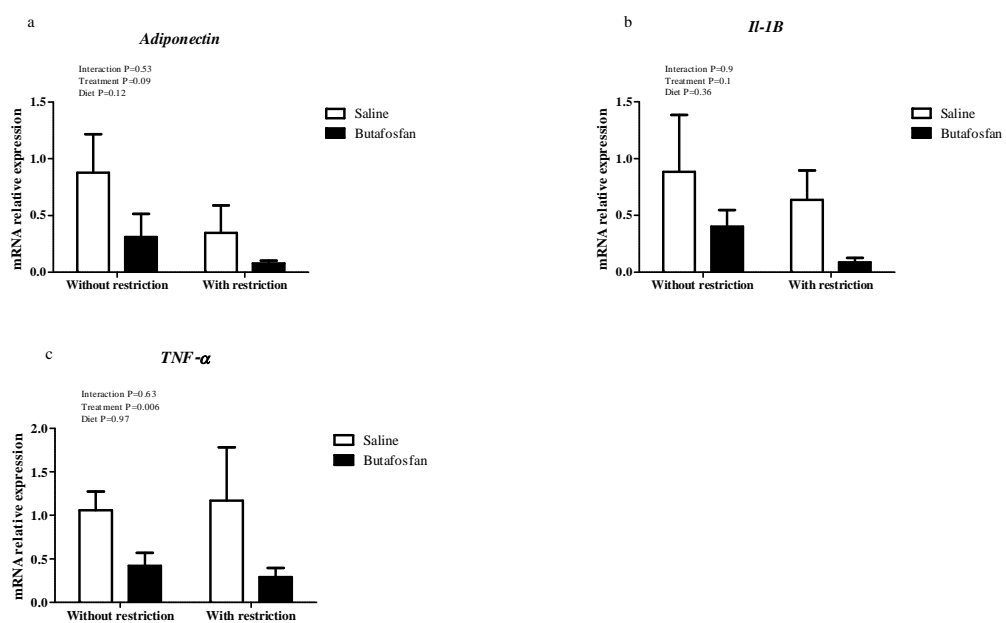
1559

1560 **Figure 2.**





1561  
1562 Figure 3.



1563  
1564 Figure 4.

1565

1566

1567 **5 CONCLUSÃO GERAL**

1568

1569 A conclusão destes estudos é que a adição das doses estudadas de  
1570 butafosfan no meio de MIV em bovinos prejudica o desenvolvimento embrionário.  
1571 Em contrapartida, o tratamento com butafosfan reduz a produção de citocinas pró-  
1572 inflamatórias responsáveis pelos efeitos deletérios da obesidade sobre a  
1573 sensibilidade à insulina em camundongos alimentados com dieta hipercalórica.

1574 Como implicações práticas, esses resultados sugerem o butafosfan como  
1575 alternativa para atenuação das consequências da obesidade, podendo assim  
1576 apresentar melhora na fertilidade de maneira indireta. Dessa forma, é possível que o  
1577 butafosfan possa ser utilizado para o tratamento da obesidade e melhora da  
1578 fertilidade em indivíduos submetidos a programas de reprodução assistida.

1579

1580 **6 REFERÊNCIAS**

1581

- 1582 ABECIA, J. A., FORCADA, F. & ZUNIGA, O., 2002. The effect of melatonin on the  
1583 secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in*  
1584 *vitro*. Vet Res Commun. 26, 151-8.
- 1585 ABSALON-MEDINA, V. A., BEDFORD-GUAUS, S. J., GILBERT, R. O., SIQUEIRA,  
1586 L. C., ESPOSITO, G., SCHNEIDER, A., CHEONG, S. H. & BUTLER, W. R., 2014.  
1587 The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 on  
1588 *in vitro* bovine embryo production and cryopreservation. J Dairy Sci. 97, 6164-76.
- 1589 ADAMIAK, S. J., POWELL, K., ROOKE, J. A., WEBB, R. & SINCLAIR, K. D., 2006.  
1590 Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation  
1591 development of bovine oocytes *in vitro*. Reproduction. 131, 247-58.
- 1592 ALI, A. & SIRARD, M. A., 2002. Effect of the absence or presence of various protein  
1593 supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation.  
1594 Biol Reprod. 66, 901-5.
- 1595 ANCHORDOQUY, J. M., ANCHORDOQUY, J. P., SIRINI, M. A., PICCO, S. J.,  
1596 PERAL-GARCIA, P. & FURNUS, C. C., 2014a. The importance of having zinc during  
1597 *in vitro* maturation of cattle cumulus-oocyte complex: role of cumulus cells. Reprod  
1598 Domest Anim. 49, 865-74.
- 1599 ANCHORDOQUY, J. P., ANCHORDOQUY, J. M., PICCO, S. J., SIRINI, M. A.,  
1600 ERRECALDE, A. L. & FURNUS, C. C., 2014b. Influence of manganese on apoptosis  
1601 and glutathione content of cumulus cells during *in vitro* maturation in bovine oocytes.  
1602 Cell Biol Int. 38, 246-53.
- 1603 ANCHORDOQUY, J. P., ANCHORDOQUY, J. M., SIRINI, M. A., TESTA, J. A.,  
1604 PERAL-GARCIA, P. & FURNUS, C. C., 2016. The importance of manganese in the  
1605 cytoplasmic maturation of cattle oocytes: blastocyst production improvement  
1606 regardless of cumulus cells presence during *in vitro* maturation. Zygote. 24, 139-48.
- 1607 ANCIOTO, K. L. (2004). Maturação nuclear e padrões de proteínas em oócitos  
1608 bovinos maturados na ausência e na presença de células do *cumulus* em meio  
1609 suplementado com diversas fontes de macromoléculas. Dissertação – Programa de  
1610 pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
- 1611 ARMSTRONG, D. G., MCEVOY, T. G., BAXTER, G., ROBINSON, J. J., HOGG, C.  
1612 O., WOAD, K. J., WEBB, R. & SINCLAIR, K. D., 2001. Effect of dietary energy and  
1613 protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations  
1614 with the ovarian insulin-like growth factor system. Biol Reprod. 64, 1624-32.
- 1615 AUSTIN, C. R., 1951. Observations on the penetration of the sperm in the  
1616 mammalian egg. Aust J Sci Res B. 4, 581-96.
- 1617 BARLOW-WALDEN, L. R., REITER, R. J., ABE, M., PABLOS, M., MENENDEZ-  
1618 PELAEZ, A., CHEN, L. D. & POEGGELER, B., 1995. Melatonin stimulates brain  
1619 glutathione peroxidase activity. Neurochem Int. 26, 497-502.
- 1620 BARUSELLI, P. S., FERREIRA, R. M., SA FILHO, M. F., NASSER, L. F.,  
1621 RODRIGUES, C. A. & BO, G. A., 2010. Bovine embryo transfer recipient  
1622 synchronisation and management in tropical environments. Reprod Fertil Dev. 22,  
1623 67-74.

- 1624 BARZILAI, N., SHE, L., LIU, B. Q., VUGUIN, P., COHEN, P., WANG, J. &  
1625 ROSSETTI, L., 1999. Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin  
1626 resistance. *Diabetes*. 48, 94-8.
- 1627 BASTOS, D. H., ROGERO, M. M. & AREAS, J. A., 2009. [Effects of dietary bioactive  
1628 compounds on obesity induced inflammation]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 53, 646-  
1629 56.
- 1630 BAUD, V. & KARIN, M., 2009. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy?  
1631 Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*. 8, 33-40.
- 1632 BEHRMAN, H. R., KODAMAN, P. H., PRESTON, S. L. & GAO, S., 2001. Oxidative  
1633 stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig*. 8, S40-2.
- 1634 BELDI, G., ENJYOJI, K., WU, Y., MILLER, L., BANZ, Y., SUN, X. & ROBSON, S. C.,  
1635 2008. The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of  
1636 extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism.  
1637 *Front Biosci*. 13, 2588-603.
- 1638 BELLOC, E., PIQUE, M. & MENDEZ, R., 2008. Sequential waves of polyadenylation  
1639 and deadenylation define a translation circuit that drives meiotic progression.  
1640 *Biochem Soc Trans*. 36, 665-70.
- 1641 BORUSZEWSKA, D., SINDEREWICZ, E., KOWALCZYK-ZIEBA, I., GRZYCMACHER,  
1642 K. & WOCLAWEK-POTOCKA, I., 2015. The effect of lysophosphatidic acid during *in*  
1643 *vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes: cumulus expansion, glucose  
1644 metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and  
1645 blastocyst competence. *Reprod Biol Endocrinol*. 13, 44.
- 1646 BORUSZEWSKA, D., TORRES, A. C., KOWALCZYK-ZIEBA, I., DINIZ, P., BATISTA,  
1647 M., LOPES-DA-COSTA, L. & WOCLAWEK-POTOCKA, I., 2014. The effect of  
1648 lysophosphatidic acid during *in vitro* maturation of bovine oocytes: embryonic  
1649 development and mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte  
1650 competence. *Mediators Inflamm*. 2014, 670670.
- 1651 BULLO, M., CASAS-AGUSTENCH, P., AMIGO-CORREIG, P., ARANCETA, J. &  
1652 SALAS-SALVADO, J., 2007. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet.  
1653 *Public Health Nutr*. 10, 1164-72.
- 1654 CAMPFIELD, L. A., SMITH, F. J., GUISEZ, Y., DEVOS, R. & BURN, P., 1995.  
1655 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity  
1656 and central neural networks. *Science*. 269, 546-9.
- 1657 CAROLAN, C., LONERGAN, P., VAN LANGENDONCKT, A. & MERMILLOD, P.,  
1658 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid  
1659 following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*. 43, 1115-28.
- 1660 CAVE, M. C., HURT, R. T., FRAZIER, T. H., MATHESON, P. J., GARRISON, R. N.,  
1661 MCCLAIN, C. J. & MCCLAVE, S. A., 2008. Obesity, inflammation, and the potential  
1662 application of pharmaconutrition. *Nutr Clin Pract*. 23, 16-34.
- 1663 CHIELLINI, C., BERTACCA, A., NOVELLI, S. E., GORGUN, C. Z., CICCARONE, A.,  
1664 GIORDANO, A., XU, H., SOUKAS, A., COSTA, M., GANDINI, D., DIMITRI, R.,  
1665 BOTTONE, P., CECCHETTI, P., PARDINI, E., PEREGO, L., NAVALESI, R., FOLLI,  
1666 F., BENZI, L., CINTI, S., FRIEDMAN, J. M., HOTAMISLIGIL, G. S. & MAFFEI, M.,  
1667 2002. Obesity modulates the expression of haptoglobin in the white adipose tissue  
1668 via TNFalpha. *J Cell Physiol*. 190, 251-8.

- 1669 CHINETTI, G., ZAWADSKI, C., FRUCHART, J. C. & STAELS, B., 2004. Expression  
1670 of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the  
1671 nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res*  
1672 *Commun.* 314, 151-8.
- 1673 CHINSRIWONGKUL, A., CHAREANPUTTAKHUN, P., NGAWHIRUNPAT, T.,  
1674 ROJANARATA, T., SILA-ON, W., RUKTANONCHAI, U. & OPANASOPIT, P., 2012.  
1675 Nanostructured lipid carriers (NLC) for parenteral delivery of an anticancer drug.  
1676 *AAPS PharmSciTech.* 13, 150-8.
- 1677 COELHO, M., OLIVEIRA, T. & FERNANDES, R., 2013. Biochemistry of adipose  
1678 tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci.* 9, 191-200.
- 1679 COLGAN, D. F., MURTHY, K. G., PRIVES, C. & MANLEY, J. L., 1996. Cell-cycle  
1680 related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature.* 384, 282-5.
- 1681 CONTI, M., HSIEH, M., ZAMAH, A. M. & OH, J. S., 2012. Novel signaling  
1682 mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell*  
1683 *Endocrinol.* 356, 65-73.
- 1684 CROSIER, A. E., FARIN, P. W., DYKSTRA, M. J., ALEXANDER, J. E. & FARIN, C.  
1685 E., 2000. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or  
1686 *in vitro*. *Biol Reprod.* 62, 1459-65.
- 1687 CUTERI, V., NISOLI, L., ATTILI, A. R., et al. (2007). A Clinical field evaluation of a  
1688 butafosfan + vitamin B12 compound (Phosphorum B12®/Catosal®) in the treatment  
1689 of subclinical ketosis in dairy cows. Department of Veterinary Science, University of  
1690 Camerino, Italy, Bayer Health Care, Animal Health.
- 1691 DA COSTA, N. N., BRITO, K. N., SANTANA, P., CORDEIRO MDA, S., SILVA, T. V.,  
1692 SANTOS, A. X., RAMOS PDO, C., SANTOS SDO, S., KING, W. A., MIRANDA  
1693 MDOS, S. & OHASHI, O. M., 2016. Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and  
1694 embryo development *in vitro*. *Theriogenology.* 85, 323-9.
- 1695 DAMIANI, P., FISSORE, R. A., CIBELLI, J. B., LONG, C. R., BALISE, J. J., ROBL, J.  
1696 M. & DUBY, R. T., 1996. Evaluation of developmental competence, nuclear and  
1697 ooplasmic maturation of calf oocytes. *Mol Reprod Dev.* 45, 521-34.
- 1698 DAS, U. N., 2001. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition.* 17, 953-66.
- 1699 DATSON, N. A., MORSINK, M. C., MEIJER, O. C. & DE KLOET, E. R., 2008. Central  
1700 corticosteroid actions: Search for gene targets. *Eur J Pharmacol.* 583, 272-89.
- 1701 DEKEL, N., 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte  
1702 maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 234, 19-25.
- 1703 DEKEL, N., LAWRENCE, T. S., GILULA, N. B. & BEERS, W. H., 1981. Modulation of  
1704 cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of  
1705 oocyte maturation by LH. *Dev Biol.* 86, 356-62.
- 1706 DEL COLLADO, M., SARAIVA, N. Z., LOPES, F. L., GASPAR, R. C., PADILHA, L.  
1707 C., COSTA, R. R., ROSSI, G. F., VANTINI, R. & GARCIA, J. M., 2015. Influence of  
1708 bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro*  
1709 maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in  
1710 bovine embryos. *Reprod Fertil Dev.*
- 1711 DELL'AQUILA, M. E., CAILLAUD, M., MARITATO, F., MARTORIATI, A., GERARD,  
1712 N., AIUDI, G., MINOIA, P. & GOUDET, G., 2004. Cumulus expansion, nuclear

- 1713 maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression  
1714 in equine cumulus-oocyte complexes cultured *in vitro* in the presence of FSH and  
1715 precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2, 44.
- 1716 DINARELLO, C. A., 2009. Immunological and inflammatory functions of the  
1717 interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 27, 519-50.
- 1718 DODE, M. A., DUFORT, I., MASSICOTTE, L. & SIRARD, M. A., 2006. Quantitative  
1719 expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell  
1720 embryos. *Mol Reprod Dev.* 73, 288-97.
- 1721 DOWNS, S. M. & HUNZICKER-DUNN, M., 1995. Differential regulation of oocyte  
1722 maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by  
1723 site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate. *Dev Biol.* 172, 72-85.
- 1724 DRACKLEY, J. K., BEAULIEU, A. D. & ELLIOTT, J. P., 2001. Responses of milk fat  
1725 composition to dietary fat or nonstructural carbohydrates in Holstein and Jersey  
1726 cows. *J Dairy Sci.* 84, 1231-7.
- 1727 DUMOLLARD, R., DUCHEN, M. & SARDET, C., 2006. Calcium signals and  
1728 mitochondria at fertilisation. *Semin Cell Dev Biol.* 17, 314-23.
- 1729 EISENBERG, S. W., RAVESLOOT, L., KOETS, A. P. & GRUNBERG, W., 2014.  
1730 Influence of feeding a low-phosphorus diet on leucocyte function in dairy cows. *J*  
1731 *Dairy Sci.* 97, 5176-84.
- 1732 FAIR, T., 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental  
1733 competence. *Anim Reprod Sci.* 78, 203-16.
- 1734 FARIN, C. E., RODRIGUEZ, K. F., ALEXANDER, J. E., HOCKNEY, J. E., HERRICK,  
1735 J. R. & KENNEDY-STOSKOPF, S., 2007. The role of transcription in EGF- and FSH-  
1736 mediated oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 98, 97-112.
- 1737 FERRANTE, A. W., JR., 2007. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in  
1738 the language of inflammation. *J Intern Med.* 262, 408-14.
- 1739 FERRE, N., TOUS, M., PAUL, A., ZAMORA, A., VENDRELL, J. J., BARDAJI, A.,  
1740 CAMPS, J., RICHART, C. & JOVEN, J., 2002. Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-  
1741 Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of  
1742 coronary heart disease. *Clin Biochem.* 35, 197-203.
- 1743 FLOOD, L. P. & SHIRLEY, B., 1991. Reduction of embryotoxicity by protein in  
1744 embryo culture media. *Mol Reprod Dev.* 30, 226-31.
- 1745 FONSECA-ALANIZ, M. H., TAKADA, J., ALONSO-VALE, M. I. & LIMA, F. B., 2006.  
1746 The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol*  
1747 *Metabol.* 50, 216-29.
- 1748 FORREST, H. N. (1993). Ultratrace Minerals. In Shils, M.E., Olson, J.A. & Shike, M.  
1749 (eds), *Modern Nutrition in Health and Disease*, 8th ed., pp. 269–86. Philadelphia: Lea  
1750 & Febiger.
- 1751 FRANCIS, S. H. & CORBIN, J. D., 1994. Progress in understanding the mechanism  
1752 and function of cyclic GMP-dependent protein kinase. *Adv Pharmacol.* 26, 115-70.
- 1753 FRUHBECK, G. & GOMEZ-AMBROSI, J., 2001. Modulation of the leptin-induced  
1754 white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. *Cell Signal.* 13, 827-33.

- 1755 FUHRMAN, B., GANTMAN, A. & AVIRAM, M., 2010. Paraoxonase 1 (PON1)  
1756 deficiency in mice is associated with reduced expression of macrophage SR-BI and  
1757 consequently the loss of HDL cytoprotection against apoptosis. *Atherosclerosis*.  
1758 211(1), 61-8.
- 1759 FUKUI, Y. & ONO, H., 1988. *In vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured  
1760 and fertilised bovine oocytes. *Vet Rec.* 122, 282.
- 1761 FUKUI, Y., MCGOWAN, L. T., JAMES, R. W., PUGH, P. A. & TERVIT, H. R., 1991.  
1762 Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured  
1763 and fertilized *in vitro*. *J Reprod Fertil.* 92, 125-31.
- 1764 FURLL, M., DENIZ, A., WESTPHAL, B., ILLING, C. & CONSTABLE, P. D., 2010.  
1765 Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the  
1766 metabolism of periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 93, 4155-64.
- 1767 GAAL, T., RIBICZEYNE-SZABO, P., STADLER, K., JAKUS, J., REICZIGEL, J.,  
1768 KOVER, P., MEZES, M. & SUMEGHY, L., 2006. Free radicals, lipid peroxidation and  
1769 the antioxidant system in the blood of cows and newborn calves around calving.  
1770 *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 143, 391-6.
- 1771 GABRIELY, I., MA, X. H., YANG, X. M., ATZMON, G., RAJALA, M. W., BERG, A. H.,  
1772 SCHERER, P., ROSSETTI, L. & BARZILAI, N., 2002. Removal of visceral fat  
1773 prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated  
1774 process? *Diabetes.* 51, 2951-8.
- 1775 GALLI, C., DUCHI, R., COLLEONI, S., LAGUTINA, I. & LAZZARI, G., 2014. Ovum  
1776 pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle,  
1777 buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology*.  
1778 81, 138-51.
- 1779 GATIBONI, L. C., KAMINSKI, J., RHEINHEIMER, D. S., SAGGIN, A., 2002.  
1780 Quantificação do fósforo disponível por extrações sucessivas com diferentes  
1781 extratores em latossolo vermelho Distroférico. *Revista Brasileira de Ciência e Solo*.  
1782 26, 1023-1029.
- 1783 GAUTIER, J., NORBURY, C., LOHKA, M., NURSE, P. & MALLER, J., 1988. Purified  
1784 maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission  
1785 yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell.* 54, 433-9.
- 1786 GAVIN, A. C. & SCHORDERET-SLATKINE, S., 1997. Ribosomal S6 kinase p90rsk  
1787 and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase  
1788 activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 46, 383-91.
- 1789 GILCHRIST, R. B. & THOMPSON, J. G., 2007. Oocyte maturation: emerging  
1790 concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*.  
1791 *Theriogenology.* 67, 6-15.
- 1792 GOETZL, E. J., DOLEZALOVA, H., KONG, Y. & ZENG, L., 1999. Dual mechanisms  
1793 for lysophospholipid induction of proliferation of human breast carcinoma cells.  
1794 *Cancer Res.* 59, 4732-7.
- 1795 GONCALVES, F. S., BARRETTO, L. S., ARRUDA, R. P., PERRI, S. H. & MINGOTI,  
1796 G. Z., 2010. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on  
1797 spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim.* 45, 129-35.

- 1798 GOTO, Y., NODA, Y., MORI, T. & NAKANO, M., 1993. Increased generation of  
1799 reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radic Biol Med.* 15, 69-75.
- 1800 GREENWAY, F. L. & SMITH, S. R., 2000. The future of obesity research. *Nutrition.*  
1801 16, 976-82.
- 1802 GUERIN, P., EL MOUATASSIM, S. & MENEZO, Y., 2001. Oxidative stress and  
1803 protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its  
1804 surroundings. *Hum Reprod Update.* 7, 175-89.
- 1805 GUIXUE, Z., LUCIANO, A. M., COENEN, K., GANDOLFI, F. & SIRARD, M. A., 2001.  
1806 The influence of cAMP before or during bovine oocyte maturation on embryonic  
1807 developmental competence. *Theriogenology.* 55, 1733-43.
- 1808 HAMMOND, J., JR., 1949. Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature.* 163,  
1809 28.
- 1810 HARDIE, D. G., ROSS, F. A. & HAWLEY, S. A., 2012. AMPK: a nutrient and energy  
1811 sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13, 251-62.
- 1812 HARLOW, C. R., JENKINS, J. M. & WINSTON, R. M., 1997. Increased follicular fluid  
1813 total and free cortisol levels during the luteinizing hormone surge. *Fertil Steril.* 68, 48-  
1814 53.
- 1815 HARMA, V., KNUUTTILA, M., VIRTANEN, J., MIRTTI, T., KOHONEN, P.,  
1816 KOVANEN, P., HAPPONEN, A., KAEWPHAN, S., AHONEN, I., KALLIONIEMI, O.,  
1817 GRAFSTROM, R., LOTJONEN, J. & NEES, M., 2012. Lysophosphatidic acid and  
1818 sphingosine-1-phosphate promote morphogenesis and block invasion of prostate  
1819 cancer cells in three-dimensional organotypic models. *Oncogene.* 31, 2075-89.
- 1820 HARVEY, M. B., ARCELLANA-PANLILIO, M. Y., ZHANG, X., SCHULTZ, G. A. &  
1821 WATSON, A. J., 1995. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in  
1822 preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures  
1823 employed for embryo coculture. *Biol Reprod.* 53, 532-40.
- 1824 HAYASHI, I., LARNER, J. & SATO, G., 1978. Hormonal growth control of cells in  
1825 culture. *In Vitro.* 14, 23-30.
- 1826 HENDRIKSEN, P. J., VOS, P. L., STEENWEG, W. N., BEVERS, M. M. &  
1827 DIELEMAN, S. J., 2000. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro*  
1828 competence of oocytes. *Theriogenology.* 53, 11-20.
- 1829 HERRLER, A., KRUSCHE, C. A. & BEIER, H. M., 1998. Insulin and insulin-like  
1830 growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol*  
1831 *Reprod.* 59, 1302-10.
- 1832 HILL, S. R., KNOWLTON, K. F., KEBREAB, E., FRANCE, J. & HANIGAN, M. D.,  
1833 2008. A model of phosphorus digestion and metabolism in the lactating dairy cow. *J*  
1834 *Dairy Sci.* 91, 2021-32.
- 1835 HOLLEY, A. K., BAKTHAVATCHALU, V., VELEZ-ROMAN, J. M. & ST CLAIR, D. K.,  
1836 2011. Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. *Int J Mol Sci.*  
1837 12, 7114-62.
- 1838 HOTAMISLIGIL, G. S., SHARGILL, N. S. & SPIEGELMAN, B. M., 1993. Adipose  
1839 expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin  
1840 resistance. *Science.* 259, 87-91.



- 1841 HSIEH, M., ZAMAH, A. M. & CONTI, M., 2009. Epidermal growth factor-like growth  
1842 factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Semin*  
1843 *Reprod Med.* 27, 52-61.
- 1844 HSU, S. Y. & HSUEH, A. J., 1997. Hormonal regulation of apoptosis an ovarian  
1845 perspective. *Trends Endocrinol Metab.* 8, 207-13.
- 1846 HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T., 1997. Oocyte growth,  
1847 capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47, 23-32.
- 1848 IETS, 2014. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.  
1849 Collated by George Perry, Chairperson – IETS Data Retrieval Committee
- 1850 ISHIZUKA, B., KURIBAYASHI, Y., MURAI, K., AMEMIYA, A. & ITOH, M. T., 2000.  
1851 The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. *J*  
1852 *Pineal Res.* 28, 48-51.
- 1853 JEWGENOW, K., HEERDEGEN, B. & MULLER, K., 1999. *In vitro* development of  
1854 individually matured bovine oocytes in relation to follicular wall atresia.  
1855 *Theriogenology.* 51, 745-56.
- 1856 JOHNSON, M. H. & NASR-ESFAHANI, M. H., 1994. Radical solutions and cultural  
1857 problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of  
1858 preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays.* 16, 31-8.
- 1859 JOSEFSBERG, L. B., GALIANI, D., LAZAR, S., KAUFMAN, O., SEGER, R. &  
1860 DEKEL, N., 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein  
1861 kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biol*  
1862 *Reprod.* 68, 1282-90.
- 1863 JOU, M. J., PENG, T. I., HSU, L. F., JOU, S. B., REITER, R. J., YANG, C. M.,  
1864 CHIAO, C. C., LIN, Y. F. & CHEN, C. C., 2010. Visualization of melatonin's multiple  
1865 mitochondrial levels of protection against mitochondrial Ca(2+)-mediated permeability  
1866 transition and beyond in rat brain astrocytes. *J Pineal Res.* 48, 20-38.
- 1867 KANE, M. T. & FOOTE, R. H., 1970. Culture of two- and four-cell rabbit embryos to  
1868 the blastocyst stage in serum and serum extracts. *Biol Reprod.* 2, 245-50.
- 1869 KANG, J. T., KOO, O. J., KWON, D. K., PARK, H. J., JANG, G., KANG, S. K. & LEE,  
1870 B. C., 2009. Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and  
1871 expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *J Pineal Res.*  
1872 46, 22-8.
- 1873 KAWAMURA, K., KUMAGAI, J., SUDO, S., CHUN, S. Y., PISARSKA, M., MORITA,  
1874 H., TOPPARI, J., FU, P., WADE, J. D., BATHGATE, R. A. & HSUEH, A. J., 2004.  
1875 Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival.  
1876 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 7323-8.
- 1877 KEAY, S. D., HARLOW, C. R., WOOD, P. J., JENKINS, J. M. & CAHILL, D. J., 2002.  
1878 Higher cortisol:cortisone ratios in the preovulatory follicle of completely unstimulated  
1879 IVF cycles indicate oocytes with increased pregnancy potential. *Hum Reprod.* 17,  
1880 2410-4.
- 1881 KENNEDY, A., MARTINEZ, K., CHUANG, C. C., LAPOINT, K. & MCINTOSH, M.,  
1882 2009. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose  
1883 tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr.* 139, 1-4.

- 1884 KERN, P. A., RANGANATHAN, S., LI, C., WOOD, L. & RANGANATHAN, G., 2001.  
1885 Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity  
1886 and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280, E745-51.
- 1887 KESKINTEPE, L., BURNLEY, C. A. & BRACKETT, B. G., 1995. Production of viable  
1888 bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biol Reprod.* 52, 1410-7.
- 1889 KHARROUBI, I., RASSCHAERT, J., EIZIRIK, D. L. & CNOP, M., 2003. Expression of  
1890 adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 312,  
1891 1118-22.
- 1892 KIM, Y. W., KIM, J. Y. & LEE, S. K., 1999. Surgical removal of visceral fat decreases  
1893 plasma free fatty acid and increases insulin sensitivity on liver and peripheral tissue  
1894 in monosodium glutamate (MSG)-obese rats. *J Korean Med Sci.* 14, 539-45.
- 1895 KOMIYAMA, J., NISHIMURA, R., LEE, H. Y., SAKUMOTO, R., TETSUKA, M.,  
1896 ACOSTA, T. J., SKARZYNSKI, D. J. & OKUDA, K., 2008. Cortisol is a suppressor of  
1897 apoptosis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 78, 888-95.
- 1898 KUERSCHNER, L., MOESSINGER, C. & THIELE, C., 2008. Imaging of lipid  
1899 biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic.* 9, 338-52.
- 1900 LASKOWSKI, D., SJUNNESSON, Y., HUMBLLOT, P., SIRARD, M. A., ANDERSSON,  
1901 G., GUSTAFSSON, H. & BAGE, R., 2016. Insulin exposure during *in vitro* bovine  
1902 oocyte maturation changes blastocyst gene expression and developmental potential.  
1903 *Reprod Fertil Dev.*
- 1904 LENZ, R. W., BALL, G. D., LEIBFRIED, M. L., AX, R. L. & FIRST, N. L., 1983. *In vitro*  
1905 maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes.  
1906 *Biol Reprod.* 29, 173-9.
- 1907 LEWIS, A. M., KAYE, P. L., LISING, R. & CAMERON, R. D., 1992. Stimulation of  
1908 protein synthesis and expansion of pig blastocysts by insulin *in vitro*. *Reprod Fertil*  
1909 *Dev.* 4, 119-23.
- 1910 LIMA, M. (2014). Efeito do butafosfan e cianocobalamina sobre a produção de  
1911 oócitos e embriões *in vitro* de vacas Jersey. Dissertação - Programa de pós-  
1912 graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- 1913 LOFFREDA, S., YANG, S. Q., LIN, H. Z., KARP, C. L., BRENGMAN, M. L., WANG,  
1914 D. J., KLEIN, A. S., BULKLEY, G. B., BAO, C., NOBLE, P. W., LANE, M. D. &  
1915 DIEHL, A. M., 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.*  
1916 12, 57-65.
- 1917 LORD, G. M., MATARESE, G., HOWARD, J. K., BAKER, R. J., BLOOM, S. R. &  
1918 LECHLER, R. I., 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses  
1919 starvation-induced immunosuppression. *Nature.* 394, 897-901.
- 1920 LUCAS, C. G., REMIAO, M. H., KOMNINO, E. R., DOMINGUES, W. B., HAAS, C.,  
1921 LEON, P. M., CAMPOS, V. F., OURIQUE, A., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A.  
1922 R., BASSO, A. C., SEIXAS, F. K., BECK, R. C. & COLLARES, T., 2015. Tretinoin-  
1923 loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve  
1924 bovine embryonic development during *in vitro* oocyte maturation. *Reprod Toxicol.* 58,  
1925 131-9.
- 1926 LUCIANO, A. M., FRANCIOSI, F., MODINA, S. C. & LODDE, V., 2011. Gap junction-  
1927 mediated communications regulate chromatin remodeling during bovine oocyte

- 1928 growth and differentiation through cAMP-dependent mechanism(s). *Biol Reprod.* 85,  
1929 1252-9.
- 1930 MATSUI, M., TAKAHASHI, Y., HISHINUMA, M. & KANAGAWA, H., 1997.  
1931 Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth  
1932 factor-I (IGF-I) is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology.* 48, 605-16.
- 1933 MCDONALD, P., EDWARDS, R. A., GREENHALGH, J. F. D., et al. (2002). *Animal*  
1934 *nutrition.* 6th ed., Pearson Education Limited, United Kingdom.
- 1935 McDOWELL, L. R (1995). Detection of mineral status of grazing ruminants. In:  
1936 CUNHA, T.J. (Ed.) *Nutrition of grazing ruminants in warm climates*, Orlando:  
1937 Academic Press.
- 1938 MCGARRY, J. D., 2002. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism  
1939 in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* 51, 7-18.
- 1940 MCGAUGHEY, R. W. (1983). Regulation of oocyte maturation. In: Finn, C.A. (Ed.),  
1941 *Oxf. Rev. Reprod. Biol.*, vol. 5. Oxford University Press, Oxford.
- 1942 MEHTA, T. S. & KIESSLING, A. A., 1990. Development potential of mouse embryos  
1943 conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without  
1944 amino acids or serum. *Biol Reprod.* 43, 600-6.
- 1945 MENON, V., ZHI, X., HOSSAIN, T., BARTKE, A., SPONG, A., GESING, A. &  
1946 MASTERNAK, M. M., 2014. The contribution of visceral fat to improved insulin  
1947 signaling in Ames dwarf mice. *Aging Cell.* 13, 497-506.
- 1948 MINGOTI, G. Z., GARCIA, J. M. & ROSA-E-SILVA, A. A., 1995. The effect of serum  
1949 on *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-  
1950 cultured with granulosa cells. *Braz J Med Biol Res.* 28, 213-7.
- 1951 MINGOTI, G. Z., GARCIA, J. M. & ROSA-E-SILVA, A. A., 2002. Steroidogenesis in  
1952 cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and  
1953 different concentrations of steroids. *Anim Reprod Sci.* 69, 175-86.
- 1954 MONGET, P. & BONDY, C., 2000. Importance of the IGF system in early  
1955 folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 163, 89-93.
- 1956 MORROW, D. A. (1986). *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, treatment*  
1957 *and prevention of reproductive diseases in small and large animal.* 2ed., Philadelphia  
1958 Saunders.
- 1959 NASIRI, E., MAHMOUDI, R., BAHADORI, M. H. & AMIRI, I., 2011. The Effect of  
1960 Retinoic Acid on *in vitro* Maturation and Fertilization Rate of Mouse Germinal Vesicle  
1961 Stage Oocytes. *Cell J.* 13, 19-24.
- 1962 NEUMEIER, M., WEIGERT, J., SCHAFFLER, A., WEHRWEIN, G., MULLER-  
1963 LADNER, U., SCHOLMERICH, J., WREDE, C. & BUECHLER, C., 2006. Different  
1964 effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 79, 803-8.
- 1965 NOGUEIRA, M.F.G., FERNANDES, P., ERENO, R. L., SIMÕES, R. A. L., BURATINI  
1966 J. R. J., BARROS, C. M., 2010. Luteinizing Hormone Receptor (LHR): basic concepts  
1967 in cattle and other mammals. A review. *Anim. Reprod.* 7, 51-64.
- 1968 NOLAN, R., O'CALLAGHAN, D., DUBY, R. T., LONERGAN, P. & BOLAND, M. P.,  
1969 1998. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo  
1970 production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology.* 50, 1263-74.

- 1971 OLIVEIRA, A. C., MATTOS, M. C., BASTOS, M. R., TRINCA, L. A., RAZZA, E. M.,  
1972 SATRAPA, R. A., SARTORI, R. & BARROS, C. M., 2014. Efficiency of  
1973 superstimulatory protocol P-36 associated with the administration of eCG and LH in  
1974 Nelore cows. *Theriogenology*. 82, 715-9.
- 1975 OSEIKRIA, M., ELIS, S., MAILLARD, V., CORBIN, E. & UZBEKOVA, S., 2016. N-3  
1976 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affected oocyte developmental  
1977 competence in cattle. *Theriogenology*. 85, 1625-1634 e2.
- 1978 OUCHI, N., KIHARA, S., FUNAHASHI, T., NAKAMURA, T., NISHIDA, M., KUMADA,  
1979 M., OKAMOTO, Y., OHASHI, K., NAGARETANI, H., KISHIDA, K., NISHIZAWA, H.,  
1980 MAEDA, N., KOBAYASHI, H., HIRAOKA, H. & MATSUZAWA, Y., 2003. Reciprocal  
1981 association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue.  
1982 *Circulation*. 107, 671-4.
- 1983 PAPIS, K., POLESZCZUK, O., WENTA-MUCHALSKA, E. & MODLINSKI, J. A.,  
1984 2007. Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen  
1985 concentration. *J Pineal Res*. 43, 321-6.
- 1986 PAPKOFF, H., 1974. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant  
1987 mare serum gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun*. 58, 397-404.
- 1988 PARADIES, G., PETROSILLO, G., PARADIES, V., REITER, R. J. & RUGGIERO, F.  
1989 M., 2010. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and  
1990 disease. *J Pineal Res*. 48, 297-310.
- 1991 PEREIRA, R. A., SILVEIRA, P. A., MONTAGNER, P., SCHNEIDER, A., SCHMITT,  
1992 E., RABASSA, V. R., PFEIFER, L. F., DEL PINO, F. A., PULGA, M. E. & CORREA,  
1993 M. N., 2013. Effect of butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum metabolism  
1994 and milk production in dairy cows. *Animal*. 7, 1143-7.
- 1995 PEREIRA, R. M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J., BAPTISTA, M. C., VASQUES, M.  
1996 I., HORTA, A. E., SANTOS, I. C., MARQUES, M. R., REIS, A., PEREIRA, M. S. &  
1997 MARQUES, C. C., 2008. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved  
1998 by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during *in vitro* embryo  
1999 culture. *Anim Reprod Sci*. 106, 322-32.
- 2000 PINCUS, G. & ENZMANN, E. V., 1935. The Comparative Behavior of Mammalian  
2001 Eggs in Vivo and *in Vitro* : I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med*. 62, 665-75.
- 2002 PINYOPUMMINTR, T. & BAVISTER, B. D., 1994. Development of bovine embryos in  
2003 a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat  
2004 inactivation. *Theriogenology*. 41, 1241-9.
- 2005 PLAYFAIR, J. H. L., LYDYARD, P. M. (1999) *Imunologia Medica*. Ed. Revinter, Rio  
2006 de Janeiro.
- 2007 POWELL, S. R., 2000. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr*. 130, 1447S-54S.
- 2008 PRATES, E. G., NUNES, J. T. & PEREIRA, R. M., 2014. A role of lipid metabolism  
2009 during cumulus-oocyte complex maturation: impact of lipid modulators to improve  
2010 embryo production. *Mediators Inflamm*. 2014, 692067.
- 2011 RAO, L. V., WIKARCZUK, M. L. & HEYNER, S., 1990. Functional roles of insulin and  
2012 insulinlike growth factors in preimplantation mouse embryo development. *In Vitro Cell*  
2013 *Dev Biol*. 26, 1043-8.

- 2014 REICHARDT, S. D., FOLLER, M., REXHEPAJ, R., PATHARE, G., MINNICH, K.,  
2015 TUCKERMANN, J. P., LANG, F. & REICHARDT, H. M., 2012. Glucocorticoids  
2016 enhance intestinal glucose uptake via the dimerized glucocorticoid receptor in  
2017 enterocytes. *Endocrinology*. 153, 1783-94.
- 2018 REITER, R. J., TAN, D. X. & FUENTES-BROTO, L., 2010. Melatonin: a multitasking  
2019 molecule. *Prog Brain Res*. 181, 127-51.
- 2020 RICHARDS, J. S., 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of  
2021 pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev*. 60, 51-  
2022 89.
- 2023 RIET-CORREA, F., TIMM, C. D. (2007). Deficiência de Fósforo. In: Riet-Correa, F.,  
2024 Schild, A. L., Lemos, R. A. A., Borges, J. R. J. *Doenças de Ruminantes e Equídeos*,  
2025 3ª ed., Pallotti.
- 2026 RINCON, J., MADEIRA, E. M., CAMPOS, F. T., MION, B., SILVA, J. F., ABSALON-  
2027 MEDINA, V. A., BUTLER, W. R., CORREA, M. N., PEGORARO, L. & SCHNEIDER,  
2028 A., 2016. Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine  
2029 embryo development *in vitro*. *Reprod Domest Anim*. 51, 827-30.
- 2030 RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., PEREZ-GARNELO, S., DE LA FUENTE, J.,  
2031 BOLAND, M. P. & LONERGAN, P., 2003. Bovine embryo culture in the presence or  
2032 absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and  
2033 messenger RNA expression. *Biol Reprod*. 68, 236-43.
- 2034 RIZZO, A., PANTALEO, M., MUTINATI, M., MINOIA, G., TRISOLINI, C., CECI, E. &  
2035 SCIORSCI, R. L., 2013. Blood and milk oxidative status after administration of  
2036 different antioxidants during early postpartum in dairy cows. *Res Vet Sci*. 95, 1171-4.
- 2037 ROCHA-FRIGONI, N. A., LEO, B. C., NOGUEIRA, E., ACCORSI, M. F. &  
2038 MINGOTI, G. Z., 2014. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and  
2039 apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos  
2040 produced *in vitro* in the presence of antioxidants. *Reprod Fertil Dev*. 26, 797-805.
- 2041 ROGERO, M. M., TIRAPEGUI, J., VINOLO, M. A., BORGES, M. C., DE CASTRO, I.  
2042 A., PIRES, I. S. & BORELLI, P., 2008. Dietary glutamine supplementation increases  
2043 the activity of peritoneal macrophages and hemopoiesis in early-weaned mice  
2044 inoculated with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Nutr*. 138, 1343-8.
- 2045 ROLLIN, E., BERGHAUS, R. D., RAPNICKI, P., GODDEN, S. M. & OVERTON, M.  
2046 W., 2010. The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum  
2047 serum beta-hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle.  
2048 *J Dairy Sci*. 93, 978-87.
- 2049 RONTI, T., LUPATTELLI, G. & MANNARINO, E., 2006. The endocrine function of  
2050 adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 64, 355-65.
- 2051 SAEKI, K., HOSHI, M., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. & FIRST, N. L., 1991. *In vitro*  
2052 fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biol*  
2053 *Reprod*. 44, 256-60.
- 2054 SAKAGUCHI, K., ITOH, M. T., TAKAHASHI, N., TARUMI, W. & ISHIZUKA, B., 2013.  
2055 The rat oocyte synthesises melatonin. *Reprod Fertil Dev*. 25, 674-82.

- 2056 SCHRANTZ, N., BLANCHARD, D. A., MITENNE, F., AUFFREDOU, M. T.,  
2057 VAZQUEZ, A. & LECA, G., 1999. Manganese induces apoptosis of human B cells:  
2058 caspase-dependent cell death blocked by bcl-2. *Cell Death Differ.* 6, 445-53.
- 2059 SCHROEDER, A. C. & EPPIG, J. J., 1984. The developmental capacity of mouse  
2060 oocytes that matured spontaneously *in vitro* is normal. *Dev Biol.* 102, 493-7.
- 2061 SELA-ABRAMOVICH, S., EDRY, I., GALIANI, D., NEVO, N. & DEKEL, N., 2006.  
2062 Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte  
2063 maturation. *Endocrinology.* 147, 2280-6.
- 2064 SEO, J., OSORIO, J. S., SCHMITT, E., CORREA, M. N., BERTONI, G., TREVISI, E.  
2065 & LOOR, J. J., 2014. Hepatic purinergic signaling gene network expression and its  
2066 relationship with inflammation and oxidative stress biomarkers in blood from  
2067 periparturient dairy cattle. *J Dairy Sci.* 97, 861-73.
- 2068 SHAH, A., MEHTA, N. & REILLY, M. P., 2008. Adipose inflammation, insulin  
2069 resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 32, 638-44.
- 2070 SHU, Y. M., ZENG, H. T., REN, Z., ZHUANG, G. L., LIANG, X. Y., SHEN, H. W.,  
2071 YAO, S. Z., KE, P. Q. & WANG, N. N., 2008. Effects of cilostamide and forskolin on  
2072 the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes.  
2073 *Hum Reprod.* 23, 504-13.
- 2074 SILVA, I. O. (2008). Inibição e reversão da maturação nuclear, avaliação da  
2075 maturação citoplasmática e produção de esteróides em complexos cumulus  
2076 oophorus bovinos cocultivados com hemiseções foliculares em meio de cultura  
2077 definido. Dissertação - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.
- 2078 SINGH, B., BARBE, G. J. & ARMSTRONG, D. T., 1993. Factors influencing  
2079 resumption of meiotic maturation and cumulus expansion of porcine oocyte-cumulus  
2080 cell complexes *in vitro*. *Mol Reprod Dev.* 36, 113-9.
- 2081 SIRARD, M. A. & COENEN, K., 2006. *In vitro* maturation and embryo production in  
2082 cattle. *Methods Mol Biol.* 348, 35-42.
- 2083 SPOHR, T. C., CHOI, J. W., GARDELL, S. E., HERR, D. R., REHEN, S. K., GOMES,  
2084 F. C. & CHUN, J., 2008. Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary  
2085 effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *J Biol Chem.* 283, 7470-9.
- 2086 STOJKOVIC, D., ZHANG, P. & CRESPI, V. H., 2001. Smallest nanotube: breaking  
2087 the symmetry of sp(3) bonds in tubular geometries. *Phys Rev Lett.* 87, 125502.
- 2088 STURMEY, R. G., REIS, A., LEESE, H. J. & MCEVOY, T. G., 2009. Role of fatty  
2089 acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development.  
2090 *Reprod Domest Anim.* 44 Suppl 3, 50-8.
- 2091 SU, Y. Q., DENEGRE, J. M., WIGGLESWORTH, K., PENDOLA, F. L., O'BRIEN, M.  
2092 J. & EPPIG, J. J., 2003. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein  
2093 kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-  
2094 cumulus cell complex. *Dev Biol.* 263, 126-38.
- 2095 TABELÃO, V. C. (2014). Efeito do butafosfan no metabolismo de vacas leiteiras  
2096 saudáveis ou com mastite clínica. Tese – Programa de pós-graduação em  
2097 Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas.

- 2098 TAHAEI, L. S., EIMANI, H., YAZDI, P. E., EBRAHIMI, B. & FATHI, R., 2011. Effects  
2099 of retinoic acid on maturation of immature mouse oocytes in the presence and  
2100 absence of a granulosa cell co-culture system. *J Assist Reprod Genet.* 28, 553-8.
- 2101 TAKAHASHI, Y. & FIRST, N. L., 1992. *In vitro* development of bovine one-cell  
2102 embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins.  
2103 *Theriogenology.* 37, 963-78.
- 2104 TAKEO, S., ABE, T., SHIRASUNA, K., KUWAYAMA, T. & IWATA, H., 2015. Effect of  
2105 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside on the mitochondrial function and  
2106 developmental ability of bovine oocytes. *Theriogenology.* 84, 490-7.
- 2107 TERNOUTH, J. H., 1990. Phosphorus and beef production in northern Australia. 3.  
2108 Phosphorus in cattle – a review. *Tropical Grassland Society.* 24, 159-169.
- 2109 THACH, R. E., 1992. Cap recap: the involvement of eIF-4F in regulating gene  
2110 expression. *Cell.* 68, 177-180.
- 2111 THORNBERRY, N. A., BULL, H. G., CALAYCAY, J. R., CHAPMAN, K. T.,  
2112 HOWARD, A. D., KOSTURA, M. J., MILLER, D. K., MOLINEAUX, S. M., WEIDNER,  
2113 J. R., AUNINS, J. & ET AL., 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is  
2114 required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* 356, 768-74.
- 2115 TIAN, X. Z., WEN, Q., SHI, J. M., LIANG, W., ZENG, S. M., TIAN, J. H., ZHOU, G.  
2116 B., ZHU, S. E. & LIU, G. S., 2010. Effects of melatonin on *in vitro* development of  
2117 mouse two-cell embryos cultured in HTF medium. *Endocr Res.* 35, 17-23.
- 2118 TRAN, T. T., YAMAMOTO, Y., GESTA, S. & KAHN, C. R., 2008. Beneficial effects of  
2119 subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab.* 7, 410-20.
- 2120 TRAYHURN, P. & WOOD, I. S., 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic  
2121 role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 92, 347-55.
- 2122 TRAYHURN, P., WANG, B. & WOOD, I. S., 2007. Comment on: Hosagai et al.  
2123 (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine  
2124 dysregulation: *Diabetes* 56:901-911. *Diabetes.* 56, e14.
- 2125 TSAFRIRI, A., CHUN, S. Y., ZHANG, R., HSUEH, A. J. & CONTI, M., 1996. Oocyte  
2126 maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in  
2127 follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase  
2128 inhibitors. *Dev Biol.* 178, 393-402.
- 2129 TSCHOP, M. & HEIMAN, M. L., 2001. Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin*  
2130 *Endocrinol Diabetes.* 109, 307-19.
- 2131 UFER, C., WANG, C. C., BORCHERT, A., HEYDECK, D. & KUHN, H., 2010. Redox  
2132 control in mammalian embryo development. *Antioxid Redox Signal.* 13, 833-75.
- 2133 VAN BLERKOM, J., 2011. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo  
2134 and their role in developmental competence. *Mitochondrion.* 11, 797-813.
- 2135 VAN DEN HURK, R. & ZHAO, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their  
2136 growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 63,  
2137 1717-51.
- 2138 VAN ROSSUM, E. F., NICKLAS, B. J., DENNIS, K. E., BERMAN, D. M. &  
2139 GOLDBERG, A. P., 2000. Leptin responses to weight loss in postmenopausal

- 2140 women: relationship to sex-hormone binding globulin and visceral obesity. *Obes Res.*  
2141 8, 29-35.
- 2142 VANHOLDER, T., LMR LEROY, J., VAN SOOM, A., MAES, D., CORYN, M., FIERS,  
2143 T., DE KRUIF, A. & OPSOMER, G., 2006. Effect of non-esterified fatty acids on  
2144 bovine theca cell steroidogenesis and proliferation *in vitro*. *Anim Reprod Sci.* 92, 51-  
2145 63.
- 2146 VIERTEL, P., 1991. Evaluation of clinical efficacy of catosal B12. *Archiv der*  
2147 *Pharmazie.* 10, 868-874.
- 2148 VISO GONZALEZ, M. E., SOLANO, L., SANCHEZ, A., PORTILLO, Z. & LLOVERA,  
2149 D., 2005. Serum leptin in eutrophic and overweight Venezuelan children and  
2150 adolescents. *Arch Latinoam Nutr.* 55, 47-54.
- 2151 WANG, Q. & SUN, Q. Y., 2007. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular  
2152 and molecular predictors. *Reprod Fertil Dev.* 19, 1-12.
- 2153 WEBB, R., GARNSWORTHY, P. C., CAMPBELL, B. K. & HUNTER, M. G., 2007.  
2154 Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm  
2155 animals. *Theriogenology.* 68 Suppl 1, S22-9.
- 2156 WEINER, J. A. & CHUN, J., 1999. Schwann cell survival mediated by the signaling  
2157 phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 5233-8.
- 2158 WEISBERG, S. P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L. &  
2159 FERRANTE, A. W., JR., 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation  
2160 in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112, 1796-808.
- 2161 WHITTEN, W. K., 1957. Culture of tubal ova. *Nature.* 179, 1081-2.
- 2162 WULSTER-RADCLIFFE, M. C., AJUWON, K. M., WANG, J., CHRISTIAN, J. A. &  
2163 SPURLOCK, M. E., 2004. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine  
2164 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 316, 924-9.
- 2165 YAMADA, S., ONISHI, M., FUJINAWA, R., TADOKORO, Y., OKABAYASHI, K.,  
2166 ASASHIMA, M. & SUGAHARA, K., 2009. Structural and functional changes of  
2167 sulfated glycosaminoglycans in *Xenopus laevis* during embryogenesis. *Glycobiology.*  
2168 19, 488-98.
- 2169 YAMAUCHI, T., KAMON, J., ITO, Y., TSUCHIDA, A., YOKOMIZO, T., KITA, S.,  
2170 SUGIYAMA, T., MIYAGISHI, M., HARA, K., TSUNODA, M., MURAKAMI, K.,  
2171 OHTEKI, T., UCHIDA, S., TAKEKAWA, S., WAKI, H., TSUNO, N. H., SHIBATA, Y.,  
2172 TERAUCHI, Y., FROGUEL, P., TOBE, K., KOYASU, S., TAIRA, K., KITAMURA, T.,  
2173 SHIMIZU, T., NAGAI, R. & KADOWAKI, T., 2003. Cloning of adiponectin receptors  
2174 that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 423, 762-9.
- 2175 YANG, W. S., LEE, W. J., FUNAHASHI, T., TANAKA, S., MATSUZAWA, Y., CHAO,  
2176 C. L., CHEN, C. L., TAI, T. Y. & CHUANG, L. M., 2001. Weight reduction increases  
2177 plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin*  
2178 *Endocrinol Metab.* 86, 3815-9.
- 2179 YE, X. & CHUN, J., 2010. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate  
2180 reproduction. *Trends Endocrinol Metab.* 21, 17-24.
- 2181 YE, X., SKINNER, M. K., KENNEDY, G. & CHUN, J., 2008. Age-dependent loss of  
2182 sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. *Biol Reprod.*  
2183 79, 328-36.



- 2184 YUDKIN, J. S., STEHOUWER, C. D., EMEIS, J. J. & COPPACK, S. W., 1999. C-  
2185 reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and  
2186 endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?  
2187 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19, 972-8.
- 2188 ZHANG, X. & ARMSTRONG, D. T., 1990. Presence of amino acids and insulin in a  
2189 chemically defined medium improves development of 8-cell rat embryos *in vitro* and  
2190 subsequent implantation *in vivo*. *Biol Reprod.* 42, 662-8.
- 2191 ZHANG, X., WU, X. Q., LU, S., GUO, Y. L. & MA, X., 2006. Deficit of mitochondria-  
2192 derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res.* 16,  
2193 841-50.
- 2194 ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN,  
2195 J. M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.  
2196 *Nature.* 372, 425-32.
- 2197 ZIDENBERG-CHERR, S., KEEN, C. L., LONNERDAL, B. & HURLEY, L. S., 1983.  
2198 Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the rat: developmental  
2199 correlations affected by manganese deficiency. *J Nutr.* 113, 2498-504.
- 2200 ZUELKE, K. A. & BRACKETT, B. G., 1990. Luteinizing hormone-enhanced *in vitro*  
2201 maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biol Reprod.*  
2202 43, 784-7.
- 2203

2204 **8 ANEXOS**

2205

2206 **Anexo A – Artigo publicado durante o doutorado**



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com



## Association between polymorphisms in somatotrophic axis genes and fertility of Holstein dairy cows



Lucas Teixeira Hax<sup>a</sup>, Augusto Schneider<sup>b</sup>, Carolina Bessalho Jacometo<sup>a</sup>,  
 Patrícia Mattei<sup>a</sup>, Thaís Casarin da Silva<sup>a</sup>, Géssica Farina<sup>a</sup>,  
 Marcio Nunes Corrêa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Center, Education and Extension in Livestock (NUPPEC), College of Veterinary, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

<sup>b</sup> Department of Nutrition, College of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 October 2015

Received in revised form 29 March 2016

Accepted 31 March 2016

#### Keywords:

GHR

IGF-I

STAT5A

SNP

Reproduction

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of growth hormone receptor (GHR) *AluI*, insulin-like growth factor type 1 (IGF-I) *SnaBI*, and signal transducer and activator 5A (STAT5A) *BstEII* polymorphisms in the reproductive performance of Holstein dairy cows and the frequency of this genotypes in cows managed in different systems. This work studied 381 and 506 Holstein cows from semiextensive and intensive systems, respectively. The frequency of genotypes *GHR AluI* (+/-), *IGF-I SnaBI* (-/-) and (+/-), and *STAT5A BstEII* (-/-) was higher in animals from semiextensive system, whereas the frequency of the genotypes *GHR AluI* (+/+) and *IGF-I SnaBI* (+/+) was higher in animals from intensive system ( $P < 0.05$ ). In the intensive system, cows from the *STAT5A BstEII* (-/-) genotype had a longer calving-first heat interval ( $P = 0.03$ ). In conclusion, there was no association between the genotypes of *GHR AluI* and *IGF-I SnaBI* and fertility of Holstein cows raised in semiextensive or intensive regimes, although the genotype frequencies of the evaluated polymorphisms were different between the studied systems. The *STAT5A BstEII* polymorphism was associated with calving-first heat interval in Holstein cows raised in the intensive system, indicating that this gene could be a molecular marker for genetic selection to improve reproductive performance.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The function of the GH/insulin-like growth factor-I (IGF-I) axis was affected by the intensive selection of dairy cattle for milk production [1,2]. As a consequence, with the increased milk production, fertility was dramatically reduced in Holstein dairy cows in the last 60 years [3,4]. In agreement with this, some studies have suggested that single nucleotide polymorphisms (SNPs), single nucleotide mutations in a gene potentially affecting its function [5], in genes of the somatotrophic axis can severely affect

reproductive performance [6], and its use as candidate genes in selection programs was suggested [7].

The somatotrophic axis is composed by the genes encoding the GH, IGF-I, their receptors (growth hormone receptor [GHR] and insulin-like growth factor receptor [IGFR]) and several intracellular signaling proteins, among them, the signal transducer and activator 5A (STAT5A). The somatotrophic axis has a key role in the regulation of the metabolism and physiology of mammals [8]. Polymorphisms in these genes have been linked to some characteristics of economic interest, such as the synthesis and composition of milk [7], carcass traits and meat production [3], and reproductive performance [6,9]. The *GHR/AluI* polymorphism, an A→T point mutation located at position -1182, in the promoter region of *GHR* gene, was

\* Corresponding author. Tel.: +55 53 3275 7136; fax: +55 53 3275 7561.  
 E-mail address: marcionunescorrea@gmail.com (M.N. Corrêa).

identified by Aggrey et al. [10]. The *IGF-I/SnaBI* polymorphism is a T→C transition located at 512 bp in the first exon identified by Ge et al. [11]. Khatib et al. [12] identified the *STAT5A/BstEII* polymorphism to be located in the exon 8 of the *STAT5A* gene. Serum IGF-I is synthesized by the liver in response to GH acting through its receptor GHR [13,14]. The transcription factor *STAT5A* is one of the prime mediators of the actions of GH, especially important in regulating IGF-I mRNA synthesis [15]. In the ovary, IGF-I stimulates the proliferation of granulosa and theca cells of the follicle [16] and inhibits follicular atresia [17]. In addition, IGF-I stimulates the response of follicular cells to the hypothalamic gonadotropins [16]. Dairy cows with delayed return to postpartum ovarian activity have lower serum concentration of IGF-I when compared with cows that ovulate earlier [18]. Serum concentration of IGF-I also increases linearly until the moment of first postpartum ovulation and has a negative correlation with the duration of postpartum anestrus in beef cows [19,20]. Therefore, higher serum IGF-I is essential for an earlier return to postpartum cyclicity and more estrous cycles before the first insemination is associated with a higher pregnancy rate [21].

On the basis of the information previously mentioned, it may be inferred that the SNPs in genes encoding the somatotrophic axis can influence the reproductive performance of cattle. Maj et al. [7] observed an association between the *GHR AluI* and *IGF-I SnaBI* polymorphisms with plasma concentrations of IGF-I in Holstein steers. Schneider et al. [6] reported an association of the *GHR AluI* polymorphism with increased serum IGF-I concentration and a reduced calving conception interval (CCI) in Holstein dairy cows. Khatib et al. [12] reported an association between SNPs in the *STAT5A* gene and fertility of dairy cows. However, most of these studies were conducted with high-producing dairy cows managed in free-stall systems. For these reasons, more information is necessary about the effects of these SNPs in dairy cows raised in semiextensive and free-stall systems in the southern hemisphere, with different climate, feed, and management conditions.

The general hypothesis of this study was that SNPs in the *GHR*, *IGF-I*, and *STAT5A* genes are associated with the reproductive performance of dairy cows. Then, we aim to determine the effect of the *GHR AluI*, *IGF-I SnaBI*, and *STAT5A BstEII* SNPs in the calving-first heat interval (CHI), CCI and number of AI per pregnancy of Holstein dairy cows, and the genotype frequency in semiextensive or intensive systems.

## 2. Material and methods

The procedures adopted in this study were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Pelotas.

### 2.1. Semiextensive management system

This experiment was conducted in a commercial farm in southern Brazil evaluating 381 Holstein cows. The CCI and number of AI per pregnancy were obtained from the farm database (ALPRO Herd Management System, DeLaval), including only cows that became pregnant within 250 days in milk (DIM). The animals were managed in a semiextensive

farming system and the diet was based on cultivated pasture, ryegrass (*Lolium multiflorum*) during fall/winter, and sorghum (*Sorghum bivolor*) during spring/summer. In addition, the cows received mineral, concentrated, and additional forage supplement containing 53% of concentrate, 13.3% of haylage, and 33.7% of ryegrass for adjusting the nutritional requirements according to milk production level and number of lactations [22]. The cows were milked and fed twice daily.

Cows were presynchronized at  $47 \pm 5$  DIM with 25-mg intramuscular (i.m.) of PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse, Pfizer Animal Health, Brazil). At  $60 \pm 3$  DIM, cows underwent gynecological examination and the fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol was started with the injection of 100-μg i.m. of a GnRH analog (Cystorelin, Merial, USA) and the insertion of a progesterone-releasing intravaginal device (controlled internal drug release [CIDR]; Pfizer Animal Health, Brazil). On Day 7 of the protocol, the intravaginal device was removed and 25-mg i.m. of an analog of PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse, Pfizer Animal Health, Brazil) was injected. On Day 8 of the protocol, cows were injected with 1-mg i.m. of estradiol cypionate (Pfizer Animal Health, Brazil). The FTAI was performed 72 hours after CIDR removal by a single technician using semen of different commercial bulls according to the farm selection criteria. Cows observed in heat before and after FTAI were inseminated 12 hours after heat detection. Pregnancy diagnosis was performed with an ultrasound 30 and 60 days after AI, and cows diagnosed as nonpregnant were immediately subjected to the same FTAI protocol again.

### 2.2. Intensive management system

This experiment was conducted in a commercial farm in southeastern Brazil using 506 Holstein cows. The CHI, CCI, and number of AI/pregnancy were obtained from the farm database and only cows with CCI lower or equal than 200 DIM were used in this study. Cows were managed in a free-stall system, receiving total mixed ration, with *ad libitum* access to water and were milked three times a day. Nutritional requirements were adjusted according to milk production level and number of lactations [22]. The diet ingredients were: corn silage (33.3%); haylage (7.3%); core cotton (7.2%); citrus pulp (12.3%); dry corn (17%); soybean meal (15.3%); water (0.2%); protected fat (0.9%); vitamin and mineral mix (6.5%).

After 60 DIM, cows had estrus monitored through commercial pedometers and were inseminated 12 hours after estrous detection. The pregnancy diagnosis was performed by ultrasound 28 and 60 days after AI. Cows not inseminated or not pregnant at the pregnancy diagnosis underwent a fixed-time embryo transfer protocol. For that, cows received 100 μg i.m. of GnRH (Fertagyl; Schering-Plough Co., São Paulo, Brazil) and a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR containing 1.9 g of progesterone, Pfizer Animal Health, São Paulo, Brazil). Seven days after the beginning of the protocol, cows received an injection of 25 μg i.m. of PGF<sub>2α</sub> (Lutalyse; Pfizer Animal Health, São Paulo, Brazil) and the CIDR was removed. On Day 8, cows received 1 mg i.m. of estradiol cypionate (Pfizer Animal Health, São Paulo, Brazil). Fixed-time embryo transfer was performed on Day 15, after



the cows were examined with an ultrasound (Aloka SSD-500, 75-MHz linear array transrectal transducer) for the presence of a CL. All cows with CL received fresh 7 days embryos. Pregnancy diagnosis was performed with an ultrasound at 28 and 60 days after embryo transfer.

### 2.3. Analysis of DNA polymorphisms

Whole blood samples were collected by the puncture of the coccygeal vein and put into tubes containing EDTA. The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction. For genomic DNA extraction, a previously described solution-based salting out protocol for whole blood samples was used [23]. The quality of the extracted DNA was tested by electrophoresis on 1.5% agarose gel impregnated with gel red (Gel Red Nucleic Acid Gel Stain, Biotium Inc., CA, USA) and visualized in UV light. To determine the *GHR* AluI, *IGF-I* SnaBI, and *STAT5A* BstEII alleles, fragments of these genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and submitted to enzymatic digestion according to Table 1.

The PCR reactions were performed in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  (Taq PCR $\times$ DNA Polyme rase, Invitrogen, CA, USA). For the enzymatic digestion, 7  $\mu\text{L}$  of the PCR product and three units of the restriction enzyme were used. The digestions were performed in a thermocycler at  $37^{\circ}\text{C}$  for three hours. After the digestion of the PCR products, DNA fragments were mixed with Gel Red (Gel Red Nucleic Acid Gel Stain, Biotium Inc., CA, USA) and separated in a 1.5%–2.0% agarose gel with a standard molecular weight of 100 bp and exposed to UV light. The gels were photographed for later analysis by a digital photo documentation system. The genotype of each animal was determined by the analysis of the fragments size reported as base pairs. The genotypes identified for the *GHR* were: AluI (+/+) 602 bp, 145 bp, 75 bp; AluI (-/-) 747 bp, 75 bp; AluI (+/-) 747 bp, 602 bp, 145 bp, 75 bp [10]. The fragments identified for *IGF-I* were: SnaBI (+/+) 226 bp; SnaBI (+/-) 249 bp, 226 bp; SnaBI (-/-) 249 bp [24]. And for *STAT5A*, the fragments identified were: BstEII (+/+) 676 bp, 144 bp; BstEII (+/-) 820 bp, 676 bp, 144 bp; BstEII (-/-) 820 bp [12].

### 2.4. Statistical analysis

Results are presented as least square means  $\pm$  standard error of the mean. Statistical analyzes were performed using SAS 9.0 software (SAS, Cary, NC, USA) general linear

model procedure. A polynomial model was used to verify the linear and quadratic effects of the presence of none, one, or two *GHR* AluI (-), *IGF-I* SnaBI (-), or *STAT5A* BstEII (-) alleles in the CHI, CCI, and number of AI/pregnancy. Analysis were performed separately for each gene and included cow and lactation number as covariates. The chi-square test was performed in the software GraphPad Prism 5.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) to analyze the genotype and allele frequency between systems.

## 3. Results

### 3.1. Genotype distribution and Hardy-Weinberg equilibrium

The *GHR* AluI (-/-) genotype had a higher frequency in the semiextensive system than in the extensive system and was 28.6 and 20.1%, respectively ( $P < 0.0001$ ). The frequency of the *IGF-I* SnaBI (-/-) and *STAT5A* BstEII (-/-) was higher for cows in the semiextensive system ( $P < 0.0001$ ). Frequency of genotypes and alleles for of *GHR* AluI, *IGF-I* SnaBI, and *STAT5A* BstEII are presented in Table 2. In addition, Hardy-Weinberg equilibrium was tested for each gene in the semiextensive and intensive system and data are presented (Table 2).

### 3.2. Semiextensive system

Overall average CCI was  $109 \pm 8.2$  days and cows were AI  $2.13 \pm 0.2$  times/pregnancy. Detailed data by genotype are presented in Table 3. There was no difference between genotypes of *GHR* AluI, *IGF-I* SnaBI, and *STAT5A* BstEII regarding the CCI and N<sup>o</sup>AI ( $P > 0.05$ ) in the semiextensive system.

### 3.3. Intensive system

In the intensive system, overall average CHI was  $66.2 \pm 1.6$  days, CCI for cows submitted for AI (CCI AI) was  $127.3 \pm 9.3$  days and  $232.7 \pm 15$  days for cows submitted to embryo transfer. Overall cows received  $2.5 \pm 0.2$  AI/pregnancy. Detailed data by genotype are presented in Table 4. The CHI, CCI, and N<sup>o</sup>AI/pregnancy were not different between *GHR* AluI and *IGF-I* SnaBI genotypes ( $P > 0.05$ ; Table 4). Among the genotypes of *STAT5A* BstEII, there was also no difference in CCI and N<sup>o</sup>AI/pregnancy ( $P > 0.05$ ). However, BstEII (+/-) and BstEII (+/+) cows had

**Table 1**  
Primers, annealing temperature, and enzymes used to genotype *GHR*, *IGF-I*, and *STAT5A* genes.

Gene	Annealing T <sup>a</sup>	Fragment length	Enzyme	Reference
<i>GHR</i> primers FW: TGGTGGCA CAGGCTCAACC RV: AGCAACCCCACTGTTGGGCAT	65 °C	836 bp	AluI <sup>a</sup>	[10]
<i>IGF-I</i> primers FW: TTAAATATATGGGTGGGAACTGC RV: ACCTTACCCGATGAAAGGAATATACGT	58 °C	249 bp	SnaBI <sup>a</sup>	[24]
<i>STAT5A</i> primers FW: GAGAA GTTGCCGAGATTATC RV: CCGTGTGCTCATCACTG	65 °C–57.5 °C	820 bp	BstEII <sup>a</sup>	[12]

Abbreviations: *GHR*, growth hormone receptor; *IGF-I*, insulin-like growth factor type 1; *STAT5A*, signal transducer and activator 5A.

<sup>a</sup> New England Biolabs (UK).

**Table 2**  
Genotype and allele frequency for *GHR* AluI, *IGF-1* SnaBI, and *STAT5A* BstEII polymorphisms for cows at the different evaluated systems and probabilities of different distributions between systems.

Genotype	Semiextensive system	Intensive system	P
<b><i>GHR</i> AluI</b>			
-/-	103 (28.6%)	81 (20.1%)	<0.0001
+/-	204 (56.7%)	135 (33.5%)	
+/+	53 (14.7%)	187 (46.4%)	
-	0.6	0.4	0.007
+	0.4	0.6	
H-W <sup>a</sup>	0.003	<0.0001	
<b><i>IGF-1</i> SnaBI</b>			
-/-	133 (34.9%)	87 (18.2%)	<0.0001
+/-	184 (48.3%)	197 (41.3%)	
+/+	64 (16.8%)	193 (40.5%)	
-	0.6	0.4	0.004
+	0.4	0.6	
H-W <sup>a</sup>	0.98	0.004	
<b><i>STAT5A</i> BstEII</b>			
-/-	100 (30.9%)	53 (11.9%)	<0.0001
+/-	113 (34.9%)	183 (41%)	
+/+	111 (34.2%)	210 (47.1%)	
-	0.5	0.3	0.02
+	0.5	0.7	
H-W <sup>a</sup>	<0.0001	0.18	

Abbreviations: *GRH*, growth hormone receptor; *IGF-1*, insulin-like growth factor type 1; *STAT5A*, signal transducer and activator 5A.

<sup>a</sup> P-value for the test for Hardy-Weinberg equilibrium, in which P < 0.05 indicates that the population being sampled is not in Hardy-Weinberg equilibrium.

lower CHI compared with homozygous *BstEII* (-/-) cows (P = 0.03; Table 4).

#### 4. Discussion

In the present study, the effects of the *GHR* AluI, *IGF-1* SnaBI, and *STAT5A* BstEII polymorphisms on conception and number of AI per pregnancy were not observed in the semiextensive or intensive management systems.

**Table 3**  
Calving conception interval (CCI) and number of AI per pregnancy (N° AI/pregnancy) in different genotypes.

Genotype	CCI (days)	N° AI/pregnancy
<b><i>GHR</i> (n = 360)</b>		
-/-	105.1 ± 8.2	2.0 ± 0.2
+/-	112.4 ± 6.5	2.25 ± 0.2
+/+	110.8 ± 10.1	2.14 ± 0.3
Linear	0.06	0.08
Quadratic	0.52	0.41
<b><i>IGF</i> (n = 381)</b>		
-/-	109.4 ± 7.3	2.25 ± 0.2
+/-	112.2 ± 7	2.13 ± 0.2
+/+	108.85 ± 9.6	2.22 ± 0.2
Linear	0.95	0.88
Quadratic	0.66	0.56
<b><i>STAT5A</i> (n = 324)</b>		
-/-	110.5 ± 7.7	2.24 ± 0.2
+/-	108.2 ± 7.5	2.18 ± 0.2
+/+	113 ± 7.5	2.16 ± 0.2
Linear	0.75	0.69
Quadratic	0.6	0.92

Abbreviations: AI, artificial insemination; *GRH*, growth hormone receptor; *IGF-1*, insulin-like growth factor type 1; *STAT5A*, signal transducer and activator 5A.

**Table 4**  
Calving-first heat interval, calving conception interval (CCI) for cows submitted to AI (CCI AI), CCI for cows submitted to ET (CCI ET), and nr of AI per pregnancy (N° AI/pregnancy) in the different genotypes.

Genotype	CHI (days) <sup>a</sup>	CCI AI (days)	CCI ET (days)	N° AI/pregnancy
<b><i>GHR</i> (n = 403)</b>				
-/-	69.4 ± 2.3	117.5 ± 11.6	230.9 ± 18.3	2.23 ± 0.3
+/-	63.9 ± 1.2	132.6 ± 9.1	235.4 ± 14	2.75 ± 0.2
+/+	65.3 ± 1.5	131.9 ± 7.3	231.7 ± 12.7	2.51 ± 0.2
Linear	0.13	0.29	0.96	0.36
Quadratic	0.13	0.49	0.82	0.14
<b><i>IGF</i> (n = 477)</b>				
-/-	65.7 ± 2.3	150.9 ± 11.8	220.9 ± 19.5	3.3 ± 0.7
+/-	64.8 ± 1.1	130.3 ± 8.0	238.7 ± 12.6	2.5 ± 0.4
+/+	66.9 ± 1.5	130.6 ± 8.5	234.9 ± 12	3.3 ± 0.5
Linear	0.66	0.36	0.54	0.97
Quadratic	0.44	0.33	0.52	0.2
<b><i>STAT5A</i> (n = 446)</b>				
-/-	71.0 ± 2.9	140.8 ± 16.1	237.7 ± 22.1	2.8 ± 0.4
+/-	64.0 ± 1.5	121.9 ± 8.7	228.3 ± 11.9	2.4 ± 0.2
+/+	64.0 ± 1.4	137.5 ± 7.5	239.1 ± 12.1	2.7 ± 0.2
Linear	0.06	0.85	0.95	0.8
Quadratic	0.07	0.17	0.56	0.17

Abbreviations: AI, artificial insemination; CHI, calving-first heat interval; ET, embryo transfer; *GRH*, growth hormone receptor; *IGF-1*, insulin-like growth factor type 1; *STAT5A*, signal transducer and activator 5A.

<sup>a</sup> For cows submitted to both AI and ET.

Nonetheless, in the intensive system, the cows carrying at least one *BstEII* (+) allele had a shorter interval from calving to the first detected heat compared with cows with two *BstEII* (-) alleles. Furthermore, the genotype frequency distribution was different between the two studied systems, with significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium depending on the system.

The allelic frequency of the *GHR* AluI polymorphism observed in the semiextensive system was different from the described by other authors [6,10,25] who evaluated cows managed in an intensive system. In the intensive system, we obtained similar results of allelic frequency for *GHR* AluI as found by Schneider et al. [6]. It is possible that the allele frequency for *GHR* AluI polymorphism observed in this study in intensive system favors the adaptation of animals to this management system. The difference in the genotype frequency between the two studied systems can support this idea; however in both systems, genotype distribution was not in Hardy-Weinberg equilibrium making difficult to argue for any in herd selective process or sire selection bias. The allelic frequency of *IGF-1* SnaBI polymorphism for cows in the intensive system was also different from those observed before [9,25]. However, the allelic frequency observed in the semiextensive system was very similar to that found by Nicolini et al. [9] in a similar environment and grazing management system. The population studied was in Hardy-Weinberg equilibrium in the extensive but not in the intensive system, which can indicate some selective pressure in the latter system as cows need to be maintained in the herd producing facing more environmental challenges, or even indicate farmer preference for a certain set of bulls. The allele frequency of *STAT5A* BstEII polymorphism found in the intensive system was different from that described before [25] in a similar system, however, their results resemble genotypic distribution observed in semiextensive system. The population



managed in the semiextensive system was not in Hardy-Weinberg equilibrium, although the population from the intensive system was, suggesting a *STAT5A* BstEII polymorphism does have an influence on the adaptation to this management system or even can affect sire selection by the farmer. Nevertheless, the physiological impact of these polymorphism and allele frequency could be potentially different expressed according to the rearing systems, and this implication needs to be further discussed in larger studies considering more farms in a larger effort to define better adapted genotypes to each management system and environmental conditions.

There is a reduction of GHR expression in liver tissue in the early postpartum of high-producing dairy cows due to the decreased blood insulin concentration and negative energy balance [26]. Consequently, the reduced GH binding to its receptor in the liver decreases the synthesis of IGF-I. An increase in IGF-I serum concentration is associated with an increased production of estradiol in ovulatory follicle and early postpartum ovulation [27]. Early postpartum ovulation is associated with a shorter CCI [28]. Therefore, our hypothesis was not confirmed in both systems because there was no association between the genotypes for *GHR* AluI, *STAT5A* BstEII and *IGF-1* SnaBI, and the CCI, despite the positive effects previously described and its influence on serum IGF-I concentrations [6,9,25]. It is possible that cows in the semiextensive system, characterized by lower milk production, do not undergo a marked negative energy balance. Consequently, these cows are not likely to have a reduction in liver GHR postpartum [26]. On the other hand, cows in the intensive system, characterized by high-milk production and metabolic challenge, also found no effects of the genotype on the CHI, CCI, and NAI. Therefore, the system of management is not the cause of the difference in results observed between the studies. However, it is possible that the differences are due to the intensity of the reproduction management to which cows were submitted. In the experiments of Schneider et al. [6] and Nicolini et al. [9], the reduced number of animals may have allowed them higher experimental control, identifying cows that were not pregnant, and performing their insemination in a shorter interval. In our study, with a larger population of cows on commercial farms, failures in heat detection and errors in the FTAI and fixed-time embryo transfer protocols may have caused delays in the conception of these animals, which could obscure the positive effects of the genotype observed in smaller controlled trials.

In a previous study, Shirasuna et al. [25] found no difference in genotype and allelic frequency of *IGF-1* SnaBI between ovulatory or anovulatory cows. However, they found an association between the *STAT5A* polymorphism and fertility [25], corroborating our data from the intensive system, in which the presence of an *STAT5A* BstEII (-) allele was associated with a longer CHI. However, despite the fact that an early postpartum cyclicity can be associated with a better reproductive performance [21], we found no association between the *STAT5A* BstEII genotypes and CCI. These results indicate that the polymorphism in the *STAT5A* gene can be of importance for cows managed intensively. Although, mutations in the *GHR* and *IGF-1* genes may not directly affect the reproductive performance of these cows.

However, as the functionality of the GH/IGF-I axis is influenced by the energy balance, it would be necessary to have more trials controlling the food intake and the hormonal profiles of the cows. Therefore, under field conditions and in the absence of a high-control productive management, differences between genotypes did not seem as obvious as previously shown [6,9,25], which suggest that the commercial use of these markers for selection of dairy cattle should be better considered depending on the productive and reproductive management system adopted.

#### 4.1. Conclusions

The polymorphisms AluI from the *GHR* gene and SnaBI from the *IGF-1* gene were not associated with reproductive performance of Holstein cows under semiextensive or intensive management systems. The BstEII (+) allele at the *STAT5A* gene was associated with a shorter the calving to first heat interval and is a molecular marker that may be used in genetic selection to improve reproductive performance. The genotype frequencies of the evaluated polymorphisms were different between the studied systems. Therefore, larger studies are necessary to validate these markers in different systems and more farms before considering their use in commercial animal breeding programs.

#### References

- [1] Lovendahl P, Sejrsen K. Endogenous growth hormone release in calves selected for milk fat yield. *Anim Prod* 1993;56:285–91.
- [2] Soensen P, Grochowska K, Holm L, Henryon M, Lovendahl P. Polymorphism in the bovine growth hormone gene affects endocrine release in dairy calves. *J Dairy Sci* 2002;85:1867–93.
- [3] Darwash AO, Jamming CE, Williams JA. Estimation of genetic variation the interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. *J Dairy Sci* 1997;80:1227–34.
- [4] Taylor VJ, Cheng Z, Puchakumara PG, Beever DR, Welles DC. Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-1 in dairy cows and their fertility and milk yield. *Vet Rec* 2004;155:583–8.
- [5] Cooper DN. Regulatory mutations and human disease. *Ann Med* 1992;24:407–37.
- [6] Schneider A, Comba MN, Butler WR. Association between growth hormone receptor AluI polymorphism and fertility of Holstein cows. *Theriogenology* 2013;80:1061–6.
- [7] Maj A, Snochowski M, Siadkowska E, Rowinska B, Likowski P, Robakowska-Hyzorek D, et al. Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression liver and its level in blood in Polish Holstein–Friesian cattle. *Neuro Endocrinol Lett* 2008;29:981–9.
- [8] Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3–34.
- [9] Nicolini P, Carriquiry M, Melillo A. A polymorphism in the insulin-like growth factor 1 gene is associated with postpartum resumption of ovarian cyclicity in Holstein-Friesian cows under grazing conditions. *Acta Veterinaria Scand* 2013;55: 11.
- [10] Aggrey SE, Yao J, Sahour MP, Lin CY, Zadworny D, Haynes JF, et al. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins. *J Hered* 1999;90:148–51.
- [11] Ge N, Davis ME, Hines HC. Two SSCP alleles identified in the 5'-flanking region of the bovine IGF 1 gene. *Anim Gen* 1997;28: 155–6.
- [12] Khatib H, Monson RL, Schrotkus V, Kohl DM, Rosa GJM, Rutledge JJ. Mutations in the *STAT5A* gene are associated with embryonic survival and milk composition in cattle. *J Dairy Sci* 2008;91:784–93.
- [13] Jiang H, Okamura CS, Lucy MC. Isolation and characterization of a novel promoter for the bovine growth hormone receptor gene. *J Biol Chem* 1999;274:7893–900.

- [14] Jiang H, Lucy MC. Involvement of hepatocyte nuclear factor-4 in the expression of the growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in bovine liver. *Mol Endocrinol* 2001;15:1023–34.
- [15] Argenteir L, Carre-Su C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 1996;76:1089–107.
- [16] Armstrong DG, Webb R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod* 1997;2:139–46.
- [17] el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasaki S, Ling N, LeRoith D, et al. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;72:1488–96.
- [18] Kawashima C, Fukuhara S, Maeda M, Kaneko E, Montoya CA, Matsui M, et al. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 2007;133:155–63.
- [19] Roberts AJ, Klindt J, Jenkins TG. Effects of varying energy intake and sire breed on duration of postpartum anestrus, insulin like growth factor-1, and growth hormone in mature crossbred cows. *J Anim Sci* 2005;83:1705–14.
- [20] Stagg K, Spicer LJ, Sreenan JM, Roche JF, Distin MG. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol Reprod* 1998;59:777–83.
- [21] Thatcher WW, Wilcox CJ. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J Dairy Sci* 1973;56:508–10.
- [22] National Research Council (NRC). Nutrient requirement of dairy cattle. Seven edition. Washington DC: National Academy Press; 2001. p. 381.
- [23] Kanai N, Fuji T, Saito K, Yoneyama T. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood. *J Clin Pathol* 1994;47:1048–4.
- [24] Ge W, Davis ME, Hines HC, Irwin KM, Simmen RCM. Association of genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *J Anim Sci* 2011;79:1757–62.
- [25] Shirasuna K, Kawashima C, Murayama C, Aoi Y, Maeda Y, Kida K, et al. Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. *J Reprod Dev* 2011;57:135–42.
- [26] Rhoads ML, Meyer JP, Lamberson WR, Kistler DH, Lucy MC. Urethra and hepatic gene expression in relation to days postpartum, estrus, and pregnancy in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 2008;91:140–50.
- [27] Butler ST, Pelton SH, Butler WR. Insulin increases 17 $\beta$ -estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction* 2004;127:537–45.
- [28] Kawashima C, Kaneko E, Amaya-Montoya C, Matsui M, Yamagishi N, Matsunaga N, et al. Relationship between the first ovulation within three weeks postpartum and subsequent ovarian cycles and fertility in high producing dairy cows. *J Reprod Dev* 2006;52:479–86.