

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE AGENTES DELIPIDANTES DURANTE O CULTIVO NO  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CONTEÚDO LIPÍDICO DE EMBRIÕES  
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**LUZIA RENATA OLIVEIRA DIAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
JUNHO DE 2016**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE AGENTES DELIPIDANTES DURANTE O CULTIVO NO  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CONTEÚDO LIPÍDICO DE EMBRIÕES  
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**Luzia Renata Oliveira Dias**

**Orientador: Ivo Pivato**

**Dissertação de Mestrado em Ciências Animais**

**PUBLICAÇÃO: 169/2016**

**BRASÍLIA/DF  
JUNHO DE 2016**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DIAS, L. R. O. **Efeito de agentes delipidantes durante o cultivo no desenvolvimento embrionário e conteúdo lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 51 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pela autora à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. A autora e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito da autora ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

|         |  |
|---------|--|
| D D541e | <p>Dias, Luzia Renata Oliveira<br/> Efeito de agentes delipidantes durante o cultivo no desenvolvimento embrionário e conteúdo lipídico de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> / Luzia Renata Oliveira Dias; orientador Ivo Pivato. -- Brasília, 2016.<br/> 51 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência Animal) -- Universidade de Brasília, 2016.</p> <p>1. CLA. 2. embriões bovinos. 3. L-carnitina. 4. produzidos <i>in vitro</i>. 5. criopreservação; . I. Pivato, Ivo, orient. II. Título.</p> |
|---------|--|

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE AGENTES DELIPIDANTES DURANTE O CULTIVO NO  
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CONTEÚDO LIPÍDICO DE EMBRIÕES  
BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**LUZIA RENATA OLIVEIRA DIAS**

**DISSERTAÇÃO DE Mestrado submetida ao  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

  
\_\_\_\_\_  
**IVO PIVATO, Doutor (Universidade de Brasília)**

  
\_\_\_\_\_  
**MARGOT ALVES NUNES DODE, Doutora (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)**

  
\_\_\_\_\_  
**GIANE REGINA PALUDO, Doutora, (Universidade de Brasília)**

**BRASÍLIA/DF, 14 de JUNHO de 2016**

Dedico esse trabalho aos meus pais, Henrique e Dinair, à minha irmã Heloísa, às minhas sobrinhas Geovanna e Maria Clara. Tudo que faço é por vocês e para vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que me concede e principalmente por ser minha força maior para superar todas as dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Henrique e Dinair, pelo apoio incondicional, amor, carinho, confiança e compreensão. Em especial à minha mãe, por ser meu “esteio”, principal motivo para não desistir nos momentos mais difíceis. À minha irmã Heloísa, por acreditar na minha capacidade e por me dar mais dois motivos para sempre melhorar e crescer cada vez mais: Gevonna e Maria Clara (sobrinhas).

Ao Dr. Ivo Pivato, pela oportunidade por ter aceitado me orientar e pela paciência.

À Dra Margot, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, por todo conhecimento transmitido, pelas cobranças, por toda seriedade e conduta profissional, as quais admiro.

À colega e parceira de laboratório Ligi (Ligiane Leme), por toda experiência compartilhada, paciência, por todas as palavras de apoio e por toda ajuda disponibilizada. Sem sua ajuda não teria dado certo!

Ao Regivaldo, por todos os cálculos e ensinamentos para utilização de equipamentos sofisticados.

Ao Dr. Luciano Paulino, pela disponibilidade para realizar as análises de lipidoma e pelas explicações direcionadas à técnica.

Aos amigos Lucas Prado, João Ricardo (amigo-irmão), Dany Helena, Isabella Dambros, Nessinha, Aline Vasques, Noemi e Nathália Arioza, por acreditarem no meu esforço para alcançar minhas metas, pelos desabafos, pela palavra amiga e pelo incentivo.

Aos colegas, alunos e ex-alunos da Embrapa, Mateus Diógenes (meu querido), Sarah (Tepis), Zé, Zézinho, Andrielle, Nayara Kussano, Felipe, Venâncio, Anelise, Oscar (o ‘ninja’ da estatística), Nathi, Malane, Paula, Ana Luiza, Netto, Thiago, Márcia e Naiara.

Aos pesquisadores e funcionários do Laboratório de Reprodução Animal e do Campo Experimental Sucupira, EMBRAPA-Recursos Genéticos e Biotecnologia.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por todo suporte e estrutura para realização desse projeto.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Universidade de Brasília (UnB) pelo curso oferecido.

A todos, muito obrigada!

## ÍNDICE

| Capítulos/Subcapítulos   | Página |
|--|--------|
| RESUMO   | x      |
| ABSTRACT   | xii    |
| LISTA DE FIGURAS   | xiii   |
| LISTA DE TABELAS   | xiv    |
| LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS  | xv     |
| CAPÍTULO 1   | xvii   |
| 1 INTRODUÇÃO   | 1      |
| 1.1 Objetivo Geral   | 2      |
| 1.1.1 Objetivos Específicos  | 2      |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA  | 3      |
| 2.1 Metabolismo energético embrionário   | 3      |
| 2.1.1 Problemas relacionados ao metabolismo  | 5      |
| 2.2 Importância dos lipídios no desenvolvimento embrionário  | 7      |
| 2.3 Estratégias para redução do conteúdo lipídico em embriões bovinos  | 9      |
| 2.3.1 L-carnitina  | 10     |
| 2.3.2 Ácido linoleico conjugado (CLA)  | 12     |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 15     |
| CAPÍTULO 2   | 22     |
| 1 RESUMO   | 23     |
| 2 ABSTRACT   | 25     |
| 3 INTRODUÇÃO   | 26     |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS   | 28     |
| 4.1 Local do experimento   | 28     |
| 4.2 Recuperação de ovócitos e maturação  | 28     |
| 4.3 Fecundação <i>in vitro</i> e Cultivo <i>in vitro</i>   | 29     |
| 4.4 Quantificação de lipídios citoplasmáticos  | 29     |
| 4.5 Distribuição do perfil lipídico por MALDI-TOF  | 31     |
| 4.6 Delineamento experimental  | 31     |
| 4.6.1 Experimento 1: Efeito de substâncias delipidantes, L-carnitina e <i>trans-10 cis-12</i> CLA, durante o cultivo embrionário na produção de embriões <i>in vitro</i> . | 31     |

|  |    |
|--|----|
| 4.6.2 Experimento 2: Efeito de substâncias delipidantes, L-carnitina e <i>trans-10 cis-12</i> CLA, durante o cultivo embrionário na quantificação e distribuição do perfil lipídico em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> . | 33 |
| 4.7 Análise estatística  | 34 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO   | 35 |
| 5.1 Resultados   | 35 |
| 5.1.1 Experimento 1: Efeito de substâncias delipidantes, L-carnitina e <i>trans-10 cis-12</i> CLA, durante o cultivo embrionário na produção de embriões <i>in vitro</i> .   | 35 |
| 5.1.2 Experimento 2: Efeito de substâncias delipidantes, L-carnitina e <i>trans-10 cis-12</i> CLA, durante o cultivo embrionário na quantificação e distribuição lipídica em embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> .           | 40 |
| 5.2 Discussão  | 42 |
| 6 CONCLUSÕES   | 48 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS   | 19 |

## RESUMO

### EFEITO DE AGENTES DELIPIDANTES DURANTE O CULTIVO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CONTEÚDO LIPÍDICO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Luzia Renata Oliveira Dias<sup>1</sup>; Ivo Pivato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília - DF

A criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (PIV) é afetada pelas altas concentrações de gotículas lipídicas que se acumulam no interior dos blastômeros. A remoção parcial de lipídios intracitoplasmáticos, por estímulo da lipólise química no citoplasma celular ou pela diminuição da captação e síntese de ácidos graxos pelas células, pode ser uma alternativa para melhorar a criopreservação desses embriões. Neste sentido, objetivou-se estimar o efeito de alguns agentes delipidantes, L-carnitina e o isômero *trans-10 cis-12* do ácido linoleico conjugado (CLA), durante o cultivo na quantidade, qualidade e conteúdo lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram utilizados 2.448 ovócitos de grau 1 e 2 obtidos de ovários de abatedouro, que foram maturados *in vitro* por 24h a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após a co-incubação dos complexos *cumulus* ovócitos (COC) com os espermatozoides (16-18 horas), os possíveis zigotos foram distribuídos em quatro tratamentos: T1) Controle (n=616): meio fluido de oviduto sintético (SOF), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB); T2) L-carnitina (n=648): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina; T3) CLA (n=627): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 100 µM de *trans-10 cis-12* CLA; e T4) L-carnitina+CLA (n=597): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina e 100 µM de *trans-10 cis-12* CLA. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas no dia 2 e dia 7 de cultivo e, os blastocistos expandidos (Bx) foram armazenados para quantificação de lipídios utilizando o corante Sudan Black B. Os dados de produção de embriões foram analisados pelo teste Chi-quadrado (P<0,05) e os de quantificação de lipídios por análise de variância (ANOVA) (P<0,05). A taxa de clivagem foi semelhante (P>0,05) entre todos os tratamentos (T1=95±4,3; T2=95±3,5; T3=95±3,7 e T4=95±3,1). A taxa de blastocisto foi superior (P<0,05) no grupo controle do que nos demais tratamentos que não diferiram (P>0,05) entre si tanto no D6 (T1=19±2,7; T2=13±2,4; T3=14±2,6 e T4=13±2,6), quanto no D7 (T1=49±3,5; T2=39±3,0; T3=42±3,9 e T4=39±3,9). Não foi observada diferença entre os tratamentos (P>0,05) quanto à velocidade de desenvolvimento, sendo que em todos os grupos a maioria dos embriões de D7 encontravam-se no estágio de blastocisto expandido. Os embriões do T2 apresentaram menor quantidade de lipídios no citoplasma do que os de T1 (P=0,0138) e de T3 (P=0,0261), sendo que os do T4 foram semelhantes (P>0,05) aos demais tratamentos. Os resultados obtidos indicaram que a suplementação com agentes delipidantes não afeta a qualidade, mas afeta negativamente a produção de embriões. Entretanto, a presença de L-carnitina durante o

cultivo *in vitro* (CIV) diminuiu a quantidade de lipídios sugerindo que sua utilização pode resultar em embriões com maior resistência a criopreservação.

Palavras-chave: CLA; criopreservação; embriões bovinos; L-carnitina; produzidos *in vitro*

## ABSTRACT

### EFFECT OF DELIPIDANT AGENTS DURING CULTIVE ON EMBRYONIC DEVELOPMENT AND LIPID CONTENT OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO

Luzia Renata Oliveira Dias<sup>1</sup>; Ivo Pivato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine, Universidade de Brasilia - DF

Cryopreservation of *in vitro* produced (IVP) embryos affected by the high concentrations of lipid droplets that accumulate inside the blastomeres. Therefore, the partial removal of intracytoplasmic lipids by chemical lipolysis stimulation or by decreasing uptake or synthesis of fatty acids by cells can be an alternative to improve cryopreservation of IVP embryos. For that, this study aimed to evaluate the effect of some delipidant agents, L-carnitine and the *trans-10 cis-12* isomer conjugated linoleic acid (CLA), during culture on the quantity, quality and lipid content of bovine embryos produced *in vitro*. A total of 2,448 oocytes graded 1 and 2, obtained from slaughterhouse ovaries were matured *in vitro* for 24 hours at 38.5 ° C, 5% CO<sub>2</sub>. After co-incubation (16-18 hours) of sperm and *cumulus* oocyte complex (COC), the presumptive zygotes were distributed into four treatments: T1) Control (n=616): synthetic oviduct fluid (SOF) medium supplemented with 5% bovine calf serum (FCS); T2) L-carnitine (n=648): SOF medium supplemented with 5% FCS plus 0.6 mg ml<sup>-1</sup> of L-carnitine; T3) CLA (n=627): SOF medium supplemented with 5% FCS plus 100 µM *trans-10 cis 12* CLA; and T4) L-carnitine + CLA (n=597): SOF medium supplemented with 5% FCS plus 0.6 mg ml<sup>-1</sup> of L-carnitine and 100 µM of *trans-10 cis-12* CLA. The cleavage and blastocyst rates were evaluated on day 2 and day 7 of culture, and expanded blastocysts (Bx) were stored for lipid quantification by Sudan Black B stain. Embryo production data were analyzed by Chi-square test (P<0.05) and lipids quantification by analysis of variance (ANOVA) (P<0.05). Cleavage rate was similar (P>0.05) among all treatments (T1=95±4.3; T2=95±3.5; T3=95±3.7 e T4=95±3.1). Blastocyst rate was higher (P<0.05) on the control group than the other treatments, which were similar (P>0.05) among on D6 (T1=19 ± 2.7; T2=13±2.4; T3=14±2.6 and T4=13±2.6) and on D7 (T1=49±3.5; T2=39±3.0; T3=42±3.9 and T4=39±3.9). There was no difference between treatments (P>0.05) on the development speed, and for all treatments the majority of D7 embryos were already on expanded blastocyst stage. Embryos from T2 showed lower cytoplasmic lipids than those from T1 (P=0.0138) and T3 (P=0.0261), being T4 similar to all treatments. The results suggested that supplementation with delipidant agents had not affected quality but had negatively affected embryo production. However, the presence of L-carnitine during *in vitro* culture (CIV) decreased the amount of lipids, suggesting that its use can result in bovine IVP embryos more resistant to cryopreservation.

Keywords: bovine embryo; CLA; cryopreservation; L-carnitina; produced *in vitro*

## LISTA DE FIGURAS

| <b>Figura</b>  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Figura 1 - Mecanismo de ação da L-carnitina sobre o metabolismo lipídico. Na translocação, a carnitina-acil-transferase I faz a passagem do ácido graxo para o espaço intermembrana da mitocôndria, e depois a carnitina-acil-transferase II transporta o mesmo para a matriz mitocondrial, para então sofrer a $\beta$ -oxidação, resultar em Acetil-CoA e depois ser utilizado no ciclo de Krebs para a formação de ATP. | 11            |
| Figura 2 - Mecanismo de ação do isômero <i>trans 10, cis 12</i> CLA no metabolismo lipídico através da redução da expressão de RNAm da enzima lipase proteica (LDL), responsável por hidrolisar os TAG extracelulares e liberar AG, possibilitando que esses sejam captados pelas células.   | 13            |
| Figura 3 - Blastocistos expandidos (Bx) em D7 corados com corante Sudan Black B. A) Bx do grupo controle; B) Bx do tratamento L-carnitina; C) Bx do tratamento CLA; D) Bx do tratamento L-carnitina+CLA.   | 30            |
| Figura 4 - Efeito da L-carnitina e do isômero <i>trans-10 cis-12</i> do ácido linoleico conjugado (CLA) no acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos em embriões bovinos. Valores expressos em intensidade de cinza por área obtidos através da coloração Sudan Black B em blastocistos expandidos no D7. $P < 0,05$ .  | 40            |
| Figura 5 - Dendrograma de blastocistos expandidos (Bx) em D7 submetidos a quatro tratamentos distintos durante o cultivo <i>in vitro</i> . Análise realizada através do MALDI-TOF. Dados adquiridos no intervalo de massa entre 500-1000 m/z.  | 41            |

**LISTA DE TABELAS**

| <b>Tabela</b>   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| Tabela 1 - Taxa de clivagem no dia (D) 2 de desenvolvimento e taxa de blastocisto em D6 e D7, de embriões bovinos cultivados na presença de substâncias delipidantes, L-carnitina e <i>trans-10 cis-12 CLA</i> , em dois sistemas de cultivos diferentes (com e sem óleo) | 37            |
| Tabela 2 - Taxa de clivagem no dia (D) 2 de desenvolvimento e taxa de blastocisto em D6 e D7, de embriões bovinos cultivados na presença de substâncias delipidantes, L-carnitina e <i>trans-10 cis-12 CLA</i> .  | 39            |

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES**

µg- microgramas

µM- micro molar

µm<sup>2</sup>- micrometros quadrados

AG- ácido graxo

AGMI- ácido graxo monoinsaturado

ATP- adenosina trifosfato

BSA- bovine serum albumine, do inglês (Albumina sérica bovina)

Be- blastocisto eclodido

Bi- blastocisto inicial

Bl- blastocisto

Bn- blastocisto em eclosão

Bx- blastocisto expandido

cAMP- adenosina monofosfato cíclico

CLA- ácido linoleico conjugado

CO<sub>2</sub>- dióxido de carbono

CoA- coenzima A

COC- complexo cumulus ovócito

COOH- ácidos carboxílicos

DNA- ácido desoxirribonucleico

EUA- Estados Unidos

FAZ- ácido graxo sintase

FIV- fecundação *in vitro*

FSH- hormônio folículo estimulante

H<sub>2</sub>O- água

ICM- massa celular interna

K<sup>+</sup>- potássio

LH- hormônio luteinizante

LDL- lipase lipoproteica

MALDI-TOF- Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight, do inglês

mg mL<sup>-1</sup>- miligramas por mililitros

MIV- maturação *in vitro*

mm- milímetro  
mM- milimolar  
mmol/L- milimol por litro  
NaCl- cloreto de sódio  
NADPH- nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida  
Na<sup>+</sup>- sódio  
PBS- phosphate-buffered saline  
PES- fenazina etossulfato  
PIV- produzidos *in vitro*  
PIVE- produção *in vitro* de embriões  
PVA- álcool polivinílico  
RNAm- ácido ribonucléico mensageiro  
ROS- espécies reativas ao oxigênio  
SCD- esteroil-CoA dessaturase  
SFB- soro fetal bovino  
SLC2A4- solute carrier family 2  
SOD2- superóxido desmutase 2  
SOF- fluido de oviduto sintético  
TAG- triglicerídeos  
TCM- tissue culture medium  
TE- trofectoderma  
UI- unidade internacional

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia que visa aumentar a produtividade através da multiplicação rápida e o aumento do número de descendentes de animais melhoradores. A participação do Brasil na produção mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) é altamente relevante, uma vez que, de acordo com o relatório mais recente, o país produziu 366.517 embriões *in vitro* dos 517.587 embriões produzidos *in vitro* no mundo. Isso representa 71% da produção mundial de embriões bovinos *in vitro*, mantendo o país na posição de líder mundial na PIVE (IETS, 2014).

Apesar dos avanços relacionados à PIVE, essa biotecnologia ainda apresenta alguns pontos que precisam ser melhorados. Um dos problemas ligados ao aumento da expansão da técnica está relacionado ao número de receptoras disponíveis nos programas de transferência de embriões. Sendo assim, o uso de outras biotecnologias, como a criopreservação é de fundamental importância para a otimização do processo e maior flexibilidade da utilização da técnica, visto que na ausência de receptoras os embriões podem ser criopreservados e transferidos futuramente.

Sabe-se que os embriões possuem alta sensibilidade ao processo de congelamento. Embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis ao congelamento do que aqueles produzidos *in vivo*, uma vez que os produzidos *in vitro* acumulam altas concentrações de gotículas lipídicas no interior dos blastômeros, principalmente aqueles cultivados em meios contendo soro fetal bovino (SFB) (Barcelo-Fimbres & Seidel Jr, 2007; Sudano et al., 2012). Esse acúmulo pode ser devido à captação de lipídeos do meio ou ao metabolismo ineficiente das mitocôndrias embrionárias (revisado por Dode et al., 2013).

Com intuito de melhorar o aproveitamento de embriões criopreservados, pesquisas vêm sendo realizadas visando o desenvolvimento de técnicas que diminuam o

acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos. Uma das maneiras para que isso ocorra é a remoção parcial dos mesmos por estímulo da lipólise química no citoplasma celular ou pela diminuição da captação e síntese de ácidos graxos pelas células. Neste sentido, estudos demonstraram que a utilização de L-carnitina e o isômero *trans-10, cis-12* do ácido linoleico conjugado (CLA), diminuíram a quantidade de lipídios intracelulares em embriões bovinos, além de aumentar a taxa de blastocistos em D7 e a taxa de sobrevivência embrionária pós-criopreservação (Takahashi et al., 2013; Batista et al., 2014).

Sendo assim, realizou-se esse estudo objetivando avaliar a interação entre essas duas substâncias delipidantes na taxa de desenvolvimento embrionário e quantidade de lipídios presentes em blastocistos expandidos (Bx) no dia 7 (D7) de desenvolvimento. Desta forma, acredita-se que este estudo possa contribuir de forma significativa para melhorar a resistência de embriões bovinos PIV ao processo de criopreservação.

## **1.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito de agentes delipidantes, L-carnitina e o isômero *trans-10, cis-12* do CLA, durante o cultivo na quantidade, qualidade e conteúdo de lipídios de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

### **1.1.1 Objetivos específicos**

1. Avaliar o efeito de agentes delipidantes, L-carnitina e o isômero *trans-10, cis-12* do CLA, durante o cultivo embrionário na produção de embriões *in vitro*.
2. Avaliar o efeito de agentes delipidantes, L-carnitina e o isômero *trans-10, cis-12* do CLA, durante o cultivo embrionário na quantificação e distribuição do perfil lipídico embriões bovinos produzidos *in vitro*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Metabolismo energético embrionário

O metabolismo energético sofre alterações durante as fases de desenvolvimento embrionário. Na fase inicial, o metabolismo é baixo e os embriões dependem da fosforilação oxidativa para gerar adenosina trifosfato (ATP). Nessa fase é extremamente importante a capacidade do embrião de metabolizar suas reservas e substratos energéticos externos, uma vez que a ativação do genoma embrionário em bovinos ocorre justamente na fase de 8 células, adquirindo assim sua capacidade de transcrição (Thompson, 2000; Nelson & Cox, 2011).

Conforme o embrião vai se desenvolvendo, a necessidade por energia aumenta. Assim, nos estágios de compactação e formação da blastocele, o metabolismo se encontra alto, e a utilização da glicólise também aumenta. Isso ocorre em conjunto com o aumento da síntese proteica e a atividade dos sistemas de transporte de íons, principalmente pela bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , processos envolvidos na formação da blastocele (revisado por Lima & Souza, 2009).

A formação de ATP no embrião ocorre através da glicólise e da fosforilação oxidativa, assim como em todas as células eucarióticas. Na fosforilação ocorre a “quebra” de substratos como a glicose, piruvato, aminoácidos e ácidos graxos livres, necessária para a formação da Acetilcoenzima A (CoA). Portanto, se a demanda por ATP aumentar, consequentemente o consumo de substratos também aumentará (Nelson & Cox, 2011).

A glicólise ocorre no citoplasma, não necessita de oxigênio para as reações metabólicas enzimáticas, gera lactato e para cada glicose oxidada gera quatro moléculas de ATP. Já a via oxidativa ocorre na mitocôndria, necessita de oxigênio e oxida completamente o

piruvato, produzindo  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e 32 moléculas de ATP via ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, mostrando ser a via mais importante na formação de ATP, visto que durante a fase de pré-compactação cerca de 93 a 96% de ATP é produzido por essa via (revisado por Joseph Mckeegan, 2015).

Apesar do seu papel importante na produção de ATP, o oxigênio como substrato energético pode resultar em espécies reativas ao oxigênio (ROS). Por sua vez, as ROS são ativas como receptores de elétrons e podem tirar elétrons de outras moléculas, as quais podem resultar em radicais livres (Harvey et al., 2002).

Entre as fases de zigoto e 8 células, apesar do baixo consumo, o metabolismo depende da glicose, do oxigênio e do piruvato, sendo esse último substrato essencial para a primeira clivagem embrionária. Até o estágio de 16 células, o consumo de glicose e piruvato permanece baixo, mas atingindo as fases de compactação da mórula e blastocisto, o consumo desses substratos juntamente com o de oxigênio aumenta (revisado por Souza et al., 2015).

Um estudo realizado em embriões ovinos no estágio de 8 células, demonstrou que a oxidação e produção de  $\text{CO}_2$  e lactato foi maior nos embriões produzidos *in vitro* do que nos produzidos *in vivo*. Com relação à produção de glicose, apesar de não ter sido observado diferença entre as concentrações encontradas, a produção de  $\text{CO}_2$  e lactato foi maior na presença de 0,56 mmol/L de glicose (Azizi-Moghadam, 2012). Isso mostra que a concentração de um substrato energético *in vitro* é dependente da concentração do outro.

No estágio de blastocisto, o embrião é caracterizado pela diferenciação de células do trofotoderma (TE) e formação da massa celular interna (ICM). Alguns estudos demonstraram que o perfil metabólico é diferente nesses dois tipos de células, sendo que o trofotoderma consome níveis elevados de piruvato e produzem lactato, já a ICM consome mais glicose (Gopichandran & Leese, 2003). Em blastocistos humanos, foi demonstrado que o consumo de oxigênio na ICM e TE foi idêntico (Yamanaka et al., 2011). Entretanto, em ratos o TE consumiu mais oxigênio, produziu mais ATP e apresentou maior número de mitocôndrias do que a ICM. Além disso, a quantidade de aminoácidos também foi significativamente maior no TE (Houghton, 2006).

Além dos substratos já citados, os aminoácidos também são relevantes no desenvolvimento embrionário, principalmente nos estágios de 8 células e mórula compacta, quando ocorre o maior consumo dos mesmos. Em embriões PIV, a presença da albumina sérica bovina (BSA) nos meios de cultivo reflete diferenças nas taxas de clivagem, evidenciadas quando a BSA foi substituído por álcool polivinílico. Além disso, a concentração de aminoácidos é alterada na presença de BSA, visto que a BSA pode causar

endocitose nas células do TE gerando lisina, leucina e glutamato, os quais estão diretamente relacionados com o desenvolvimento embrionário adequado (revisado por Souza et al., 2015)

O metabolismo energético sofre modificações dependendo da forma com que o embrião é produzido. Por exemplo, foi citado que nos estágios pré e pós-compactação o metabolismo da glicose é anormal em embriões PIV, por apresentar excesso na metabolização desse substrato via glicólise, inibindo a fosforilação oxidativa nesses embriões. Isso ocorre devido à falta de um regulador natural da glicólise, presente em embriões produzidos *in vivo*. Logo, o metabolismo da glicose nesses embriões não é alterado (Bavister, 1995; Gardner et al., 2000). Além disso, nos embriões cultivados *in vitro* a metabolização da glicose aumenta na presença da elevada tensão de O<sub>2</sub>, a chamada glicólise aeróbica (Khurana & Niemann, 2000).

Outra modificação metabólica significativa nos embriões PIV está relacionada com maior produção de lactato e aumento das taxas oxidativas do que nos *in vivo*, sugerindo maiores taxas metabólicas *in vitro*. Assim, as condições de cultivo podem induzir essas taxas, uma vez que embriões *in vivo*, quando expostos a ambientes extrauterinos, apresentaram aumento na glicólise e produção de CO<sub>2</sub> (Leese, 2012).

A quantidade de substratos presentes nessas duas formas de produção de embriões também difere. Os aminoácidos, por exemplo, em embriões bovinos produzidos *in vivo* estão em menor quantidade do que nos PIV (Sturmey et al., 2010).

Contudo, o metabolismo energético interfere diretamente no desenvolvimento embrionário. As taxas metabólicas podem prever a viabilidade embrionária *in vitro*, como demonstrado pelo consumo de piruvato no metabolismo intermediário, o qual foi relacionado com a progressão morfológica dos embriões (Guerif et al., 2013).

Todas essas alterações no metabolismo são atribuídas às diferentes condições de cultivo *in vitro* durante a maturação dos ovócitos e desenvolvimento embrionário.

### **2.1.1 Problemas relacionados ao metabolismo**

Vale ressaltar que embriões que metabolizam grande quantidade de glicose comprometem sua capacidade de desenvolvimento, pelo fato da pequena quantidade de glicose que é direcionada para a via pentose-fostato, fornecendo a ribose-5-fosfato, utilizada na síntese de ácidos nucleicos, e a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADPH),

que atua na síntese das membranas celulares, além de atuar como antioxidante (Beitz, 1996; Nelson & Cox, 2011).

Nos embriões PIV, o excesso de estimulação da glicólise pode levar ao aumento dos precursores da síntese proteica e de lipídios, favorecendo a formação de lipídios intracitoplasmáticos juntamente com o desequilíbrio do estado de redução-oxidação desses embriões, acarretando no distúrbio da função mitocondrial, o que resulta nesse acúmulo lipídico (De La Torre-Sanchez et al., 2006; Barcelo-Fimbres & Seidel Jr, 2007).

A disfunção mitocondrial foi definida como qualquer alteração da capacidade das mitocôndrias produzirem ATP suficiente para atender as exigências das células. As mitocôndrias também geram ROS como subproduto tóxico em resposta à fosforilação oxidativa. Os ROS incluem superóxido, hidróxido e peróxido, os quais são altamente reativos e podem causar danos às organelas, lipídios, proteínas e DNA, danos definidos como estresse oxidativo. Entretanto, os ROS possuem funções celulares como vias de sinalização, regulação de cálcio, apoptose, translocação de mitocôndrias e metabolismo. A falha em qualquer uma dessas funções acarreta em algum tipo de disfunção (Brand & Nicholls, 2011).

Outro aspecto importante a ser considerado, relaciona o estresse que pode ser causado no ambiente onde o embrião se desenvolve, o qual pode afetar diretamente o metabolismo embrionário e causar mudanças do fenótipo desses embriões, resultando no crescimento anormal do feto (Lane & Gardner, 2004).

A resposta do embrião ao estresse foi descrita como “teoria do embrião tranquilo”, ou seja, o estado metabólico normal durante o desenvolvimento embrionário inicial. Uma taxa metabólica baixa é um preditivo de viabilidade de embriões PIV e está relacionada com o desenvolvimento do blastocisto, semelhante ao observado em embriões *in vivo*, que naturalmente são “tranquilos” (Leese, 2012).

Estudos realizados em embriões bovinos pré-implantação, relacionaram os danos causados ao DNA com o perfil de aminoácidos. Os resultados demonstraram que quanto mais silencioso o metabolismo embrionário, os embriões se tornam menos susceptíveis aos danos causados ao genoma, transcriptoma e proteoma. Ao contrário, quando o metabolismo foi mais acentuado, maior o nível de danos e maior utilização de aminoácidos e energia, visando à reparação dos mesmos (Baumann et al., 2007).

## 2.2 Importância dos lipídios no desenvolvimento embrionário

Os lipídios constituem um grupo de compostos formados por ácidos graxos, os quais são constituídos por ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas, tendo seu comprimento variando de 4 a 36 carbonos (Marzzoco & Torres, 2007).

Essas biomoléculas estão envolvidas na transdução de sinal como mediadores lipídicos, incluindo fosfatidilinositois, esfingolipídios e eicosanoides. Além disso, desempenham funções biológicas como a proliferação celular, migração, diferenciação, pinocitose, sobrevivência e alterações metabólicas (Di Paolo, 2006). Sobretudo, os lipídios servem como moléculas sinalizadoras que contribuem para eventos fundamentais durante o desenvolvimento embrionário, implantação e crescimento pós-implantação (Burnum et al., 2009).

A influência das reservas intracelulares de energia gerada pelos ácidos graxos é uma área ampla a ser investigada, visto que a maioria dos estudos sobre metabolismo energético em embriões tem focado na utilização de outros nutrientes fornecidos no meio de cultivo, como piruvato, glicose e aminoácidos, citados anteriormente (Sturmey et al., 2009).

A principal classe de lipídios encontrados no citoplasma de células dos mamíferos são os triglicerídeos (TAG). Estes são armazenados na forma de gotículas lipídicas e desempenham papel importante no desenvolvimento embrionário inicial, atuando como fonte de energia para ovócitos e embriões. Já a membrana celular é composta principalmente pelos fosfolipídios, sendo as fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolamina e esfingomielinas, unidades estruturais funcionais da membrana. A composição desses fosfolipídios determina as propriedades físico-químicas da membrana, incluindo fluidez, permeabilidade e comportamento térmico. Assim, pode-se notar a importância dessas substâncias para o desenvolvimento embrionário (Ferguson & Lee, 2006; Sturmey et al., 2009; Aardema et al., 2011).

A literatura cita que existe uma variação na quantidade e tipo de ácidos graxos que integram os lipídios de ovócitos e embriões das diferentes espécies. Além disso, ressalta-se que o tempo entre a ovulação e a implantação embrionária determina a quantidade de lipídios que possivelmente estariam armazenados nos embriões, visto que, quanto maior esse período, maior a necessidade por energia, e conseqüentemente maior acumulação de lipídios. Entretanto, sabe-se que ovócitos e embriões bovinos acumulam grande quantidade de lipídios no citoplasma (Sturmey et al., 2009), principalmente embriões PIV, onde as concentrações de

gotículas lipídicas no interior dos blastômeros é alta. Isso é atribuído pelo cultivo *in vitro* realizado com SBF (revisado por Dode et al., 2013).

Durante a fecundação até a fase de 8 células, a quantidade de lipídios se mantém estável. Até o estágio de blastocisto, os níveis de TAG também se mantêm, sendo que a maioria das gotículas lipídicas são localizadas na ICM. Além disso, a proporção de TAG pode aumentar a partir do estágio de 8 células até o estágio de blastocisto eclodido (Sudano et al., 2012).

Apesar de serem extremamente importantes no desenvolvimento embrionário, os lipídios têm sido os grandes vilões quando o assunto é a criopreservação de embriões bovinos.

Existem evidências de que pelo menos quatro classes de lipídios afetam a sobrevivência embrionária pós-criopreservação, sendo os TAG, ácidos graxos livres, colesterol e os fosfolipídios (Sudano et al., 2013). Sobretudo, o grande acúmulo de gotículas citoplasmáticas em embriões bovinos PIV tem sido relacionado com a utilização de SFB no meio de cultivo, uma vez que essa substância aumenta o teor lipídico no embrião, seja pela absorção de suas lipoproteínas pelas células embrionárias, ou pela possível alteração na função da  $\beta$ -oxidação na mitocôndria causada pelo desequilíbrio no processo redução-oxidação (Pereira et al., 2007; Barcelo-Fimbres & Seidel Jr, 2007).

As gotículas lipídicas são os locais onde os lipídios são armazenados, e no caso de embriões bovinos, os triglicerídeos constituem a maior parte dos lipídios presente no citoplasma. Conforme a necessidade do organismo, esses lipídios armazenados são utilizados para produzir energia, componentes de membrana e sinalização de lipídios. Uma vez que, a via mais importante para produção de ATP ocorre nas mitocôndrias através do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, qualquer dano causado a essa organela pode resultar em alterações no metabolismo lipídico global. Existem evidências de que essas gotículas possuem uma função protetora para células. Isso foi elucidado pelo fato de que moléculas anfipáticas, abundantes em ácidos graxos, podem comprometer a integridade da membrana e uma vez os AG transformados em triglicerídeos, esses são incorporados nas gotículas, se tornando inertes e “inofensivos”. Esse fato explicaria o grande acúmulo de gotículas lipídicas em embriões bovinos PIV, em consequência da utilização do SFB nos meios de cultivo *in vitro*, devido ao fornecimento anormal de lipídios contidos no soro. Desse modo, as gotículas lipídicas atuam como moduladores da disponibilidade de proteínas e sinalização de lipídios no núcleo, atuando como centros de transporte de AG (revisado por Souza et al., 2015).

Contudo, os problemas que relacionam os lipídios à criopreservação não ficam só à nível de citoplasma. Estudos têm ressaltado que a composição de fosfolipídios presentes na membrana celular determina as propriedades físico-químicas da mesma. Assim, tem sido atribuída a importância do perfil lipídico que as membranas celulares apresentam, visto que o aumento na insaturação de AG resulta no aumento da fluidez da membrana, e conseqüentemente diminui a sensibilidade dos embriões PIV à criopreservação (Leão et al., 2015; Sprícigo et al., 2015; Sudano et al., 2016).

Sendo assim, vários estudos estão sendo realizados com o intuito de melhorar a resistência dos embriões PIV ao processo de criopreservação, como a modificação do meio de cultivo *in vitro*, redução mecânica ou química de lipídios e uso de agentes delipidantes que diminuam a captação e síntese de AG pelas células (Ogawa et al., 2010; Takahashi et al., 2013; Bastista et al., 2014).

### **2.3 Estratégias para redução do conteúdo lipídico em embriões bovinos**

A modificação do meio de cultivo, através da utilização de meios definidos ou semidefinidos livres de soro não afetaram o rendimento de blastocistos e aumentaram a sobrevivência dos mesmos pós-criopreservação (Mucci et al., 2006; Block et al., 2010; Momozawa & Fukuda, 2011). Além disso, apenas a redução da concentração de SFB no meio de cultivo pode diminuir o conteúdo lipídico e aumentar a sobrevivência embrionária pós-criopreservação (Sudano et al., 2011).

Alguns estudos demonstraram que a utilização de fenazina etossulfato (PES) no período pós-compactação reduziu o acúmulo de lipídios e aumentou a crio sobrevivência em embriões. Essa substância promove o equilíbrio do metabolismo energético, além de favorecer reações enzimáticas da via pentose fostato (De La Torre-Sanchez al., 2006; Barcelo-Fimbres & Seidel, 2007; Sudano et al., 2011)

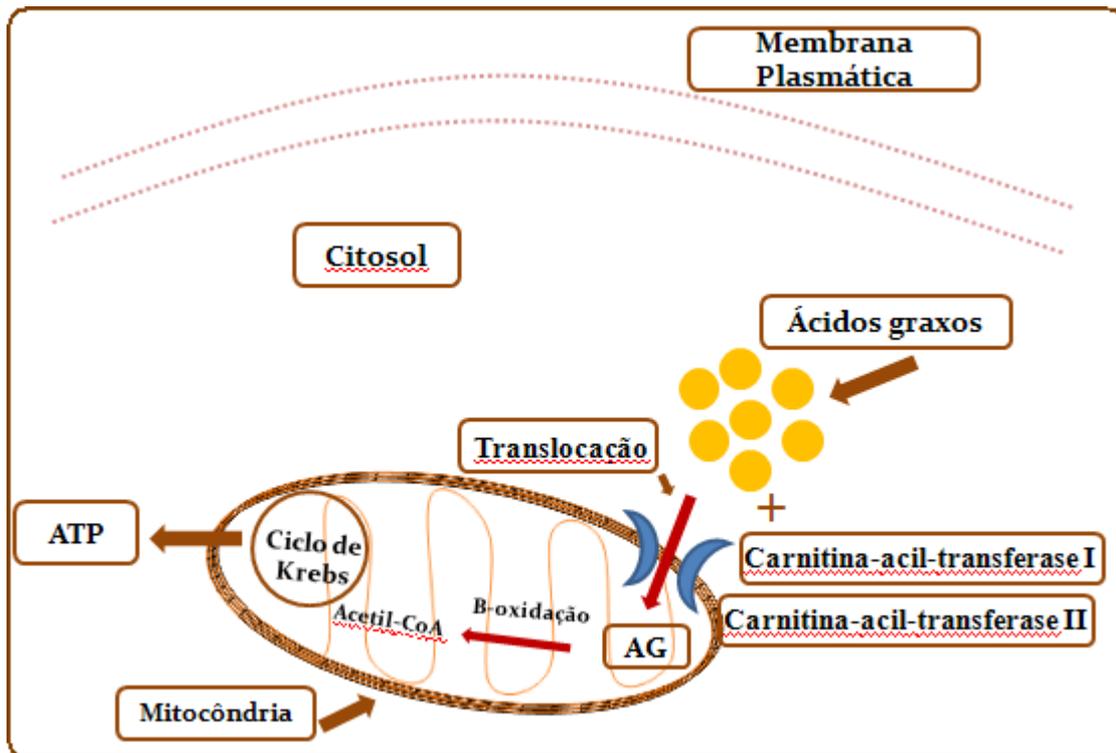
A utilização de substâncias delipidantes nos meios de maturação e cultivo *in vitro* vem sendo amplamente abordada, visando a diminuição do conteúdo lipídico em ovócitos e embriões. Substâncias como o forskolin, L-carnitina e isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA), são as mais utilizadas nas pesquisas direcionadas para melhoria da qualidade embrionária e conseqüentemente maior resistência ao processo de criopreservação

(Pereira et al., 2007; Takahashi et al., 2013; Absalón-Medina al., 2014; Batista et al., 2014; Leão et al., 2015).

O uso do forskolin tem sido associado a sua ação como ativador da adenilato ciclase, estimulando a atividade da lipase através da via cAMP (adenosina monofosfato cíclico) e proteína quinase (Men et al., 2006; Cuello et al., 2013). Assim, a suplementação com essa substância no meio de cultivo *in vitro* tem apresentado resultados positivos com relação a redução de lipídios intracitoplasmáticos, resultando em embriões bovinos de melhor qualidade para superarem os danos causados pela criopreservação (Sanches et al., 2013; Paschoal et al., 2014).

### **2.3.1 L-carnitina**

A L-Carnitina (L-3-Hidróxi-4-trimetilamonio-butanoato) é uma molécula solúvel e desempenha sua função como cofator da  $\beta$ -oxidação no metabolismo lipídico. Essas moléculas são responsáveis pela translocação de AG para o interior da mitocôndria, para então serem metabolizados na forma de CoA através da  $\beta$ -oxidação, e em seguida pelo ciclo de Krebs e fosforilização oxidativa, resultando em ATP (Sutton-Mcdowall et al., 2012). Na translocação, primeiramente a carnitina-acil-transferase I faz a passagem do ácido graxo para o espaço intermembrana da mitocôndria, e depois a carnitina-acil-transferase II transporta o mesmo para a matriz mitocondrial, para então sofrer a  $\beta$ -oxidação, como observado na Figura 1 (Dunning et al., 2012).



**Figura 1.** Mecanismo de ação da L-carnitina sobre o metabolismo lipídico. Na translocação, a carnitina-acil-transferase I faz a passagem do ácido graxo para o espaço intermembrana da mitocôndria, e depois a carnitina-acil-transferase II transporta o mesmo para a matriz mitocondrial, para então sofrer a  $\beta$ -oxidação, resultar em Acetil-CoA e depois ser utilizado no ciclo de Krebs para a formação de ATP.

Portanto, a utilização dessa substância tem sido cada vez maior nos meios de cultivo *in vitro* de embriões bovinos, visando a redução das gotículas lipídicas presentes no citoplasma dos mesmos e melhorando a qualidade embrionária pós-criopreservação (Takahashi et al., 2013).

Além de atuar como agente delipidante, a L-carnitina apresenta atividade antioxidante, protegendo as células dos danos causados durante a criopreservação, como danos ao DNA (Abdelrazik et al., 2009; Mingorance et al., 2011). Essa atividade está relacionada à diminuição de ROS e redução da apoptose (Pillich et al., 2005; Ye et al., 2010).

Contudo, a eficiência na utilização da L-carnitina depende de alguns fatores, como a etapa da produção *in vitro* e a dose utilizada. Assim, a maioria dos trabalhos demonstrou que o acréscimo de  $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$  ao meio de maturação de ovócitos suínos e bovinos, ou no meio de cultivo de embriões bovinos foi capaz de reduzir o acúmulo de

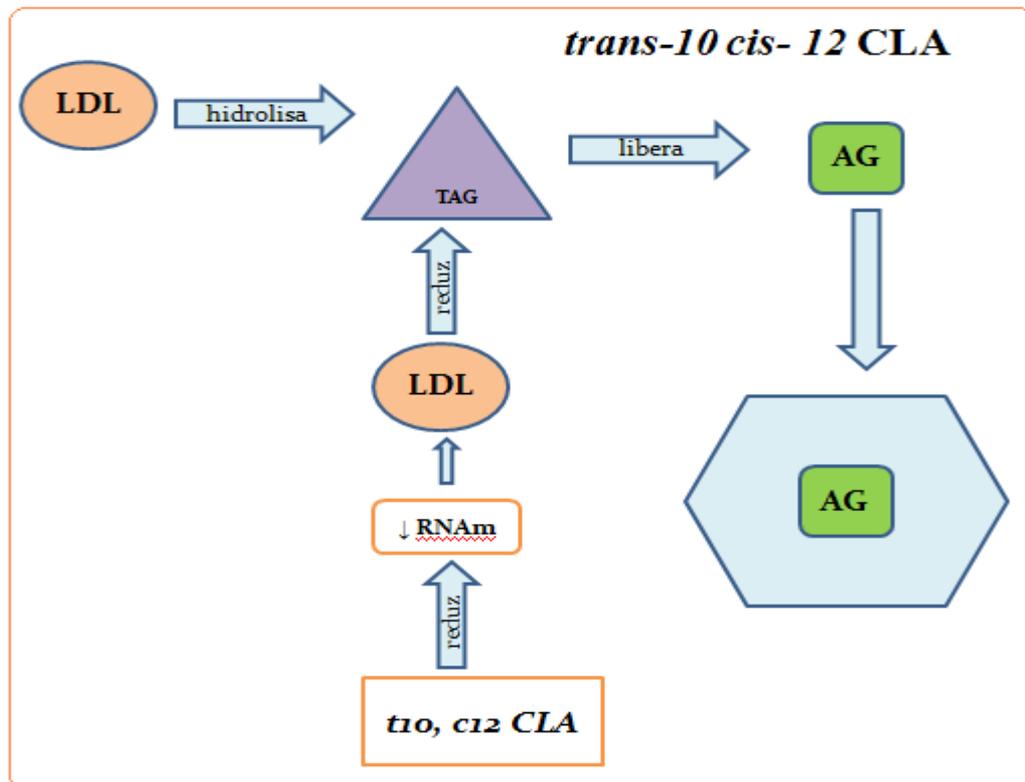
lipídios e distribuição das gotículas lipídicas (Somfai et al., 2011; Sutton-Mcdowall et al., 2012; Chankitisakul et al., 2013; Takahashi et al., 2013).

### 2.3.2 Ácido linoleico conjugado (CLA)

O termo CLA refere-se aos isômeros do ácido linoleico, composto por 18 carbonos e duas insaturações (C18:2). O que varia é a posição geométrica de cada um, podendo ser formados até 28 isômeros do CLA (Andrade et al., 2012).

O isômero *trans-10, cis-12* CLA tem sido citado pelo seu efeito inibitório na captação e na produção de lipídios pelas células através de suas propriedades antiadipogênicas, diminuindo a gordura corporal e aumentando a massa magra em diversas espécies animais. Esse isômero reduz a expressão de RNAm da enzima lípase proteica (LDL), a qual está localizada na parede dos capilares e é responsável por hidrolisar os TAG extracelulares e liberar AG, possibilitando que esses sejam captados pelas células (Figura 2). Estudos demonstraram que a redução da expressão de RNAm dessa enzima em diferentes espécies e tecidos foi de até 66% e a quantidade de TAG em até 55% (Park et al., 1997; Park et al., 1999; Azain et al., 2000; Baumgard et al., 2002; Brown et al., 2003).

Outra enzima importante envolvida na síntese de AG monoinsaturados (AGMI) é a esteroil-CoA dessaturase (SCD), sendo responsável pela inclusão de uma ligação dupla em AG saturados, tornando-os AGMI para que ocorra a síntese de TAG. Estudos mostraram que o *trans-10, cis-12* CLA diminuiu a expressão da SCD em até 75%, além de inibir a atividade da mesma (Lee et al., 1998; Bretillon et al., 1999; Choi et al., 2000; Park et al., 2000; Baumgard et al., 2002). Entretanto, outros autores demonstraram aumento na expressão de RNAm da mesma enzima em adipócitos humanos cultivados na presença desse isômero (Herrmann et al., 2009).



**Figura 2.** Mecanismo de ação do isômero *trans 10, cis 12 CLA* no metabolismo lipídico através da redução da expressão de RNAm da enzima lipase proteica (LDL), responsável por hidrolisar os TAG extracelulares e liberar AG, possibilitando que esses sejam captados pelas células.

Apesar do mecanismo exato pelo qual esse isômero do CLA atua na diminuição de gordura não seja totalmente elucidado, tem sido sugerido que seja pelo aumento do consumo de energia, inibição da síntese *de novo*, aumento da oxidação de AG, assim como a atuação específica nos adipócitos, diminuindo o tamanho, inibindo a diferenciação e induzindo a apoptose dessas células (Brodie et al., 1999; Baumgard et al., 2000; Azain et al., 2000; West et al., 2000; Ohnuki et al., 2001; Evans et al., 2002; Terpstra et al., 2002).

Contudo, os isômeros *cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12*, têm sido amplamente estudados nos meios de cultivo *in vitro* e estão relacionados com a diminuição de gotículas lipídicas e com mudanças no perfil lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Esses efeitos são refletidos diretamente na resistência desses embriões quando submetidos ao processo de criopreservação (Batista et al., 2014; Leão et al., 2015). Vale ressaltar que os

efeitos do CLA no metabolismo lipídico dependem do tipo de isômero, dose e duração da suplementação (Park et al., 1997).

O *trans-10, cis-12*, afeta o metabolismo lipídico de adipócitos, reduzindo a absorção de ácidos graxos livres, sem aumentar a lipólise. Estudos têm demonstrado que a suplementação com esse isômero não melhora a taxa de embriões em D7. No entanto, as taxas de re-expansão pós-criopreservação foram maiores em embriões bovinos que receberam suplementação com 100  $\mu$ M de CLA durante a maturação *in vitro* ou cultivo *in vitro*. Além disso, a mistura dos isômeros *cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12* também melhorou a sobrevivência embrionária pós-criopreservação (Batista et al., 2014; Leão et al., 2015).

Essa melhora na crioresistência dos embriões PIV na presença do CLA tem sido atribuída à diminuição das gotículas lipídicas, as quais prejudicam de forma extrema a criotolerância, além da mudança no perfil lipídico da membrana desses embriões. Isso ocorre devido a incorporação do CLA na bicamada lipídica da membrana celular embrionária, o que aumenta a fluidez da membrana e conseqüentemente sua resistência à criopreservação (Pereira et al., 2007; Leão et al., 2015).

Apesar da utilização CLA apresentar resultados positivos relacionados à sobrevivência embrionária após o processo de criopreservação, alguns estudos demonstraram que a suplementação com 100  $\mu$ M *trans-10 cis-12* durante o cultivo, diminuiu a taxa de desenvolvimento em blastocistos, além de reduzir a taxa de criosobrevivência (Marques et al., 2007; Stinshoff et al., 2014).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARDEMA, H.; VOS, P. L. A. M.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A. J.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 62–69, 2011.

ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R.; MAHFOUZ, R.; AGARWAL, A. L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 2, p. 589-596, 2009.

ABSALÓN-MEDINA, V.A.; BEDFORD-GUAUS, S.J.; GILBERT, R.O.; SIQUEIRA, L.C.; ESPOSITO, G.; SCHNEIDER, A.; CHEONG, S.H.; BUTLER, W.R. The effects of conjugated linoleic acid isomers *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 on in vitro bovine embryo production and cryopreservation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p.6164–6176, 2014.

ANDRADE, J. C.; ASCENÇÃO, K.; GULLÓN, P.; HENRIQUES, S.M.S.; PINTO, J.M.S.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; FREITAS, A.C.; GOMES, A.M. Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 4, p. 467-481, 2012.

AZAIN, M.; HAUSMAN, D.; SISK, M.; FLATT, W.; JEWELL, D. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 3, p. 1548–1554, 2000.

AZIZI-MOGHADAM, A. Metabolism of energy substrates of in vitro and in vivo derived embryos from ewes synchronized and super ovulated with norgestomet and porcine follicle stimulating hormone. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 3-37, 2012.

BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL JR, G. E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, n. 11, p.1406-18, 2007.

BATISTA, R.I.T.P.; RAPOSO, N.R.B.; CAMPOS-JUNIOR, P.H.A.; PEREIRA, M.M.; CAMARGO, L.S.A.; CARVALHO, B.C.; GAMA, M.A.S.; VIANA, J.H.M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of in vitro-produced crossbred bovine embryos. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. v. 5, n. 33, p. 1-8, 2014.

BAUMANN, C.G.; MORRIS, D.G.; SREENAN, J.M.; LEESE, H.J. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 10, p. 1345–1353, 2007.

BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBØ, A.; BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 1, p. 179-184, 2000.

BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.9, p. 2155–2163, 2002.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. **Human Reproduction Update**, v. 1, n. 2, p. 91–148, 1995.

BEITZ, D.C. Metabolismo dos Carboidratos; Metabolismo dos Lipídios. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1996. p. 398-429.

BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P.J. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. **Journal Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5234-5242, 2010.

BRAND, M.D.; NICHOLLS, D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **The Biochemical journal**, v. 435, n. 2, p. 297–312, 2011.

BRETILLON L.; CHARDIGNY, J.M.; GRÉGOIRE, S.; BERDEAUX, O.; SÉBÉDIO, J.L. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities *in vitro*. **Lipids**, v. 34, n. 9, p. 965–969, 1999.

BRODIE, A.E.; MANNING, V.A.; FERGUSON, K.R.; JEWELL, D.E.; HU, C.Y. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and postconfluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 3, p. 602-606, 1999.

BROWN, J.M.; BOYSEN, M.S.; JENSEN, S.S.; MORRISON, R.F.; STORKSON, J.; LEA-CURRIE, R.; PARIZA, M.; MANDRUP, S.; McINTOSH, M.K. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR $\gamma$  signaling by CLA in human preadipocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 7, p. 1287-1300, 2003.

BURNUM, K.E.; CORNETT, D.S.; PUOLITAIVAL, S.M.; MILNE, S.B.; MYERS, D.S.; TRANGUCH, S.; BROWN, H.A.; DEY, S.K.; CAPRIOLI, R.M. Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 11, p. 2290-8, 2009.

CHANKITISAKUL, V.; SOMFAI, T., INABA, Y.; TECHAKUMPHU, M.; NAGAI, T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 590–598, 2013.

CHOI, Y.; KIM, Y.C.; HAN, Y.B.; PARK, Y.; PARIZA, M.W.; NTAMBI, J.M. The *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 1920–1924, 2000.

CUELLO, C.G.J.; SANCHEZ-OSORIO, J.; GIL, M.A.; PARRILLA, I.; ANGEL, M.A.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Forskolin improves the cryosurvival of in vivo-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. **Cryobiology**, v. 66, n. 2, p. 144-150, 2013.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; GARDNER, D.K.; PRIEIS, K.; GIBBONS, J.; SEIDEL Jr, G.E. Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during postcompaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 5, p. 597-607, 2006.

DI PAOLO, G.; DE CAMILLI, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. **Nature**, v. 443, n. 7112, p. 651–657, 2006.

DODE, M.A.N.; LEME, L.O.; SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.145-150, 2013.

DUNNING, K.R.; ROBKER, L.R. Promoting lipid utilization with L-carnitine to improve oocyte quality. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1-2, p. 69–75, 2012.

EVANS, M.; LIN, X.; ODLE, J.; McINTOSH. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 3, p. 450-455, 2002.

FERGUSON, E.M.E.; LEESE, H.J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 9, p. 1195–1201, 2006.

GARDNER, D.K.; POOL, T.B.; LANE, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation and viability. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 18, n. 2, p. 205–218, 2000.

GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H.J. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophectoderm and blastocoel fluid. **Reproduction**, v. 126, n. 3, p. 299-308, 2003.

GUERIF, F.; MCKEEGAN, P.; LEESE, H.J.; STURMEY, R.G. A simple approach for Consumption and Release (CORE) analysis of metabolic activity in single mammalian embryos. **PLoS One**, v. 8, n. 8, 2013.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. REDOX regulation of early embryo development. **Reproduction**, v. 123, n. 4, p. 479–486, 2002.

HERRMANN, J.; RUBIN, D.; HÄSLER, R.; HELWIG, U.; PFEUFFER, M.; AUINGER, A.; LAUE, C.; WINKLER, P.; SCHREIBER, S.; BELL, D.; SCHREZENMEIR, J. Isomerspecific effects of CLA on gene expression in human adipose tissue depending on PPAR $\gamma$ 2 P12A polymorphism: a double blind, randomized, controlled cross-over study. **Lipids in Health and Disease**, v. 8, n. 35, p. 35-47, 2009.

HOUGHTON, F.D. Energy metabolism of the inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. **Differentiation**, v. 74, n. 1p. 11-18, 2006.

IETS. 2014. International Embryo Transfer Society's. **Statistics and Data Retrieval Committee Report**. Disponível em: [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2014.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf)

JOSEPH MCKEEGAN, Paul. **Metabolic regulation during early embryo development**. Hull and York: The University of Hull and the University of York. 2015, 278p. Tese (PhD) - Hull York Medical School, 2015.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 62, n.4, p. 847–856, 2000.

LEÃO, B.C.S.; ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; CABRAL, E.C.; COELHO, M.B.; FERREIRA, C.R.; EBERLIN, M.N.; ACCORSI, M.F.; NOGUEIRA, É.; MINGOTI, G.Z. Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. **Theriogenology**, v. 84, n. 1, p.127–136, 2015.

LEE, K.N.; PARIZA, M.W.; NTAMBI, J.M. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, n. 3, p. 817-821, 1998.

LEESE, H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. **Reproduction**, v. 143, n. 4, p. 417-427, 2012.

LIMA, I.M.T.; SOUZA, A.L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.194-202, 2009.

MARQUES, C.; BAPTISTA, M.; VASQUES, M.; HORTA, A.; PEREIRA, R. Effect of polyunsaturated fatty acids (PUFA) on bovine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryo development and freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 108–109, 2007.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 3a Ed. Rio de Janeiro:Ed. Guanabara Koogan, 2007.

MEN, H.; AGCA, Y.; RILEY, L.K.; CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 2008-2016, 2006.

MINGORANCE, C.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R.; JUSTO, M.L.; HERRERA, M.D.; DE SOTOMAYOR, M.A. Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L-carnitine, **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 5, p. 279–290, 2011.

MOMOZAWA, K.; FUKUDA, Y. Establishment of an advanced chemically defined medium for early embryos derived from in vitro matured and fertilized bovine oocytes. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 6, p. 681-689, 2011.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G., HOZBOR, F.; CABODEVILA, J., ALBERIO, R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551–1562, 2006.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5ed. Porto Alegre: Arned, 2011.

OGAWA, B.S.; NAKAYAMA, N.; MATSUNARI, H.; NAKANO, K.; FUJIWARA, T.; IKEZAWA, Y.; NAGASHIMA, H. Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, n. 3, p. 356-361, 2010.

OHNUKI, K.; HARAMIZU, S.; OKI, K.; ISHIHARA, K.; FUSHIKI, T. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. **Lipids**, v. 36, n. 6, p. 583-587, 2001.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; COOK, M.E.; PARIZA, M.W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, v. 32, n. 8, p. 853–858, 1997.

PARK, Y.; STORKSON, J.M.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W.; PARIZA, M.W. Evidence that the *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, v. 34, n. 3, p. 235–241, 1999.

PARK Y.; STORKSON, J.M.; NTAMBI, J.M.; COOK, M. E.; SIH, C.J.; PARIZA, M.W. Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486, n. 2-3, p. 285-292, 2000.

PASCHOAL, D.M.; SUDANO, M.J.; GUASTALI, M.D.; MAZIERO, R.R.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHAES, L.C.O.; RASCADO, T.S.; MARTINS, A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v. 22, n. 2, p.146-157, 2014.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid (10*t*, 12*c* CLA). **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 293-301, 2007.

PILLICH, R.T.; SCARSELLA, G.; RISULEO, G. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. **Experimental cell research**, v. 306, n. 1, p. 1-8, 2005.

SANCHES, B.V.; MARINHO, L.S.R.; FILHO, B.D.O.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; MEIRINHOS, M.L.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; FERREIRA, C.R.; SENEDA, M.M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, n.4, p. 372–377, 2013.

SOMFAI, T.; KANEDA, M.; AKAGI, S.; WATANABE, S.; HARAGUCHI, S.; MIZUTANI, E.; DANG-NGUYEN, T.Q., GESHI, M.; KIKUCHI, K.; NAGAI, T. Enhancement of lipid metabolism with l-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v. 23, n. 7, p.912–920, 2011.

SOUZA, D.K.; SALLES, L.P.; ROSA E SILVA, A.A.M. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 3, p. 191-197, 2015.

SPRÍCIGO, J.F.W.; DIÓGENES, M.N.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.; MUTERLLE, C.V.; SILVA, B.D.M.; SOLÀ-ORIO, D.; PIVATO, I.; SILVA, L.P.; DODE, M.A.N. Effects of Different Maturation Systems on Bovine Oocyte Quality, Plasma Membrane Phospholipid Composition and Resistance to Vitrification and Warming. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-11, 2015.

STURMEY, R.G.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; LEESE, H.J.; LONERGAN, P. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 3, p. 285-296, 2010.

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

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; MAZIERO, R.R.D.; RASCADO, T.S.; GUASTALI, M.D.; CROCOMO, L.F.; MAGALHÃES, L.C.O.; MONTEIRO, B.A.; MARTINS JR, A.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.160-167, 2013.

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

SUDANO, M.J.; RASCADO, T.S.D.; TATA, A.; BELAZ, K.R.A.; SANTOS, V.G.; VALENTE, R.S.; MESQUITA, F.S.; FERREIRA, C.R.; ARAÚJO, J.P.; EBERLIN, M.N.; LANDIM-ALVARENGA, F.D.C. Lipidome signatures in early bovine embryo development. **Theriogenology**, v. 16, 2016.

SUDANO, M.J.; SANTOS, V.G.; TATA, A.; FERREIRA, C.R.; PASCHOAL, D.M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M.N.; LANDIM-ALVARENGA, F.D. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 130, 2012.

SUTTON-MCDOWALL, M.L.; FEIL, D.; ROBKER, R.L.; THOMPSON, J.G.; DUNNING, K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1632–1641, 2012.

TAKAHASHI, T.; INABA, Y.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; GESHI, M.; NAGAI, T.; MANABE, N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, v. 25, n. 4, p. 589-599, 2013.

TERPSTRA, A.H.; BEYNEN, A.C.; EVERTS, H.; KOCSIS, S.; KATAN, M.B.; ZOCK, P.L. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 5, p. 940-945, 2002.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 263-275, 2000.

YAMANAKA, M.; HASHIMOTO, S.; AMO, A.; ITO-SASAKI, T.; ABE, H.; MORIMOTO, Y. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. **Human Reproduction**, v. 26, n. 12, p. 1–6, 2011.

YE, J.; LI, J.; YU, Y.; WEI, Q.; DENG, W.; YU, L. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS–mitochondria pathway. **Regulatory Peptides**, v. 161, n. 1-3, p. 58–66, 2010.

WEST, D.B.; BLOHM, F.Y.; TRUETT, A.A.; DELANY, J.P. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2471-2477, 2000.

## **CAPÍTULO 2**

## 1 RESUMO

### EFEITO DE AGENTES DELIPIDANTES DURANTE O CULTIVO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CONTEÚDO LIPÍDICO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Luzia Renata Oliveira Dias<sup>1</sup>; Ivo Pivato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília - DF

A criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (PIV) é afetada pelas altas concentrações de gotículas lipídicas que se acumulam no interior dos blastômeros. A remoção parcial de lipídios intracitoplasmáticos, por estímulo da lipólise química no citoplasma celular ou pela diminuição da captação e síntese de ácidos graxos pelas células, pode ser uma alternativa para melhorar a criopreservação desses embriões. Neste sentido, objetivou-se estimar o efeito de alguns agentes delipidantes, L-carnitina e o isômero *trans-10 cis-12* do ácido linoleico conjugado (CLA), durante o cultivo na quantidade, qualidade e conteúdo lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram utilizados 2.448 ovócitos de grau 1 e 2 obtidos de ovários de abatedouro, que foram maturados *in vitro* por 24h a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após a co-incubação dos complexos *cumulus* ovócitos (COC) com os espermatozoides (16-18 horas), os possíveis zigotos foram distribuídos em quatro tratamentos: T1) Controle (n=616): meio fluido de oviduto sintético (SOF), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB); T2) L-carnitina (n=648): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina; T3) CLA (n=627): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 100 µM de *trans-10 cis-12* CLA; e T4) L-carnitina+CLA (n=597): meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina e 100 µM de *trans-10 cis-12* CLA. As taxas de clivagem e blastocisto foram avaliadas no dia 2 e dia 7 de cultivo e, os blastocistos expandidos (Bx) foram armazenados para quantificação de lipídios utilizando o corante Sudan Black B. Os dados de produção de embriões foram analisados pelo teste Chi-quadrado (P<0,05) e os de quantificação de lipídios por análise de variância (ANOVA) (P<0,05). A taxa de clivagem foi semelhante (P>0,05) entre todos os tratamentos (T1=95±4,3; T2=95±3,5; T3=95±3,7 e T4=95±3,1). A taxa de blastocisto foi superior (P<0,05) no grupo controle do que nos demais tratamentos que não diferiram (P>0,05) entre si tanto no D6 (T1=19±2,7; T2=13±2,4; T3=14±2,6 e T4=13±2,6), quanto no D7 (T1=49±3,5; T2=39±3,0; T3=42±3,9 e T4=39±3,9). Não foi observada diferença entre os tratamentos (P>0,05) quanto à velocidade de desenvolvimento, sendo que em todos os grupos a maioria dos embriões de D7 encontravam-se no estágio de blastocisto expandido. Os embriões do T2 apresentaram menor quantidade de lipídios no citoplasma do que os de T1 (P=0,0138) e de T3 (P=0,0261), sendo que os do T4 foram semelhantes (P>0,05) aos demais tratamentos. Os resultados obtidos indicaram que a suplementação com agentes delipidantes não afeta a qualidade, mas afeta negativamente a produção de embriões. Entretanto, a presença de L-carnitina durante o

cultivo *in vitro* (CIV) diminuiu a quantidade de lipídios sugerindo que sua utilização pode resultar em embriões com maior resistência a criopreservação.

Palavras-chave: CLA; criopreservação; embriões bovinos; L-carnitina; produzidos *in vitro*

## 2 ABSTRACT

### EFFECT OF DELIPIDANT AGENTS DURING CULTIVE ON EMBRYONIC DEVELOPMENT AND LIPID CONTENT OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO

Luzia Renata Oliveira Dias<sup>1</sup>; Ivo Pivato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine, Universidade de Brasilia - DF

Cryopreservation of *in vitro* produced (IVP) embryos affected by the high concentrations of lipid droplets that accumulate inside the blastomeres. Therefore, the partial removal of intracytoplasmic lipids by chemical lipolysis stimulation or by decreasing uptake or synthesis of fatty acids by cells can be an alternative to improve cryopreservation of IVP embryos. For that, this study aimed to evaluate the effect of some delipidant agents, L-carnitine and the *trans-10 cis-12* isomer conjugated linoleic acid (CLA), during culture on the quantity, quality and lipid content of bovine embryos produced *in vitro*. A total of 2,448 oocytes graded 1 and 2, obtained from slaughterhouse ovaries were matured *in vitro* for 24 hours at 38.5 ° C, 5% CO<sub>2</sub>. After co-incubation (16-18 hours) of sperm and *cumulus* oocyte complex (COC), the presumptive zygotes were distributed into four treatments: T1) Control (n=616): synthetic oviduct fluid (SOF) medium supplemented with 5% bovine calf serum (FCS); T2) L-carnitine (n=648): SOF medium supplemented with 5% FCS plus 0.6 mg ml<sup>-1</sup> of L-carnitine; T3) CLA (n=627): SOF medium supplemented with 5% FCS plus 100 µM *trans-10 cis 12* CLA; and T4) L-carnitine + CLA (n=597): SOF medium supplemented with 5% FCS plus 0.6 mg ml<sup>-1</sup> of L-carnitine and 100 µM of *trans-10 cis-12* CLA. The cleavage and blastocyst rates were evaluated on day 2 and day 7 of culture, and expanded blastocysts (Bx) were stored for lipid quantification by Sudan Black B stain. Embryo production data were analyzed by Chi-square test (P<0.05) and lipids quantification by analysis of variance (ANOVA) (P<0.05). Cleavage rate was similar (P>0.05) among all treatments (T1=95±4.3; T2=95±3.5; T3=95±3.7 e T4=95±3.1). Blastocyst rate was higher (P<0.05) on the control group than the other treatments, which were similar (P>0.05) among on D6 (T1=19 ± 2.7; T2=13±2.4; T3=14±2.6 and T4=13±2.6) and on D7 (T1=49±3.5; T2=39±3.0; T3=42±3.9 and T4=39±3.9). There was no difference between treatments (P>0.05) on the development speed, and for all treatments the majority of D7 embryos were already on expanded blastocyst stage. Embryos from T2 showed lower cytoplasmic lipids than those from T1 (P=0.0138) and T3 (P=0.0261), being T4 similar to all treatments. The results suggested that supplementation with delipidant agents had not affected quality but had negatively affected embryo production. However, the presence of L-carnitine during *in vitro* culture (CIV) decreased the amount of lipids, suggesting that its use can result in bovine IVP embryos more resistant to cryopreservation.

Keywords: bovine embryo; CLA; cryopreservation; L-carnitina; produced *in vitro*

### 3 INTRODUÇÃO

A criopreservação é essencial para o armazenamento de gametas para a formação de bancos de germoplasma, principalmente para a conservação de raças e espécies ameaçadas de extinção. Além disso, a exportação de material genético de alto valor agregado, principalmente do Brasil, pode melhorar a qualidade dos rebanhos em países, além de favorecer o comércio exterior (Mariante et al., 2011).

Contudo embriões bovinos produzidos *in vitro* são altamente sensíveis ao processo de congelamento, pelo fato de possuírem grandes concentrações de gotículas lipídicas no interior dos blastômeros. Sendo assim, estudos vêm sendo realizados com intuito de diminuir esse conteúdo lipídico, além de tentarem alterar o perfil lipídico da membrana celular, aumentando a fluidez da mesma e tornando os embriões mais resistentes ao processo de criopreservação (Pereira et al., 2007; Takahashi et al., 2013; Absalón-Medina et al., 2014; Batista et al., 2014; Leão et al., 2015).

Várias substâncias delipidantes vêm sendo utilizadas com o objetivo final de melhorar a sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro* pós-criopreservação. A literatura cita a utilização do Forskolin, fenazina etossulfato (PES), L-carnitina e isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA). As três primeiras atuam como redutores químicos de lipídios, já o CLA atua diminuindo a captação e síntese de AG pelas células (Ogawa et al., 2010; Sudano et al., 2011; Takahashi et al., 2013; Batista et al., 2014).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da L-carnitina e o isômero *trans-10, cis-12* do CLA, durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Esse efeito foi estimado com relação à quantidade, qualidade e conteúdo lipídico desses embriões. A opção por essas substâncias levou em consideração a forma de atuação das mesmas sobre o metabolismo lipídico, uma vez que as duas atuam de forma diferente, e a associação das

mesmas poderia melhorar a taxa de produção de embriões em D7, além de diminuir a quantidade de lipídios e alterar o perfil lipídico dos mesmos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF.

### 4.2 Recuperação de ovócitos e maturação

Os ovários de vacas mestiças foram coletados no abatedouro local e transportados para o laboratório em solução salina (0,9% NaCl), suplementada de penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (50µg/mL) à temperatura de 36°C. Os folículos ovarianos com diâmetro de 3,0 - 8,0 mm foram aspirados com auxílio de agulha hipodérmica (40 x 1,2 mm) acoplada à seringa de 10 mL. O líquido folicular aspirado foi colocado em tubos Falcon de 15 mL. Depois de 10 minutos em repouso, tempo mínimo para formação do pellet contendo os ovócitos, somente o sobrenadante foi removido e centrifugado em outro tubo Falcon de 15 mL por 5 minutos a 700G. Esse líquido foi utilizado para o rastreamento dos complexos *cumulus*-ovócitos (CCOs) em placas de 100 mm. Os ovócitos rastreados foram classificados de acordo com Caixeta & Dode (2010). Somente os classificados em grau I e II foram lavados e maturados em meio de maturação (TCM 199 sais de Earl's (Gibco, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Gibco, Waltham, MA, EUA), 12 UI/mL de hormônio luteinizante (LH Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 0,01 UI/mL de hormônio

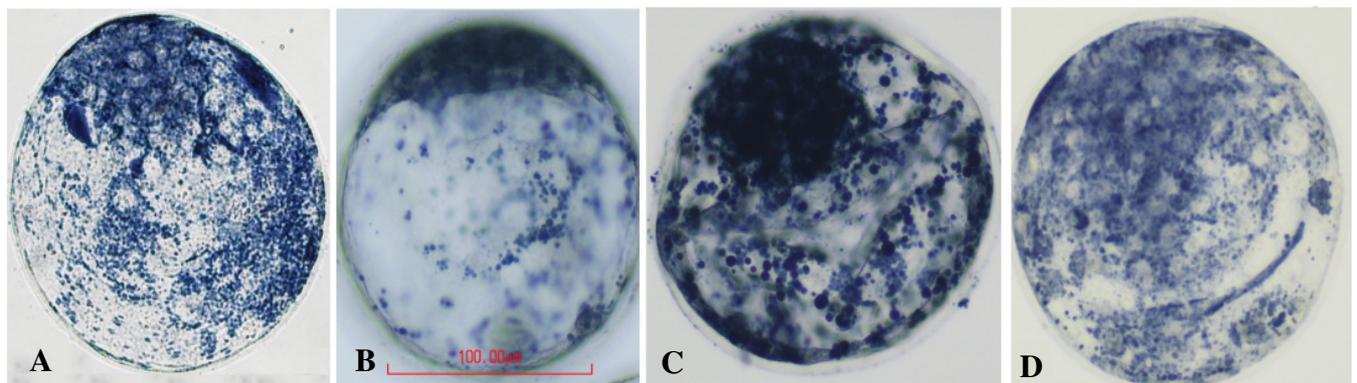
folículo estimulante (FSH – Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 0,1 mg/mL de L-glutamina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 1µM de Piruvato (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 1µM de Cisteamina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 0,075 mg/mL de sulfato de amicacina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), em gotas de 150 µL cobertas por óleo de silicone e incubados por 22 – 24 horas em estufa de cultivo a 38,5 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada.

### **4.3 Fecundação *in vitro* e Cultivo *in vitro***

Para a fecundação *in vitro* utilizaram-se doses de sêmen de um touro com fertilidade conhecida. O sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos em banho-maria e as células espermáticas foram selecionadas por centrifugação em gradiente descontínuo de *Percoll* (400 µL de *Percoll* 90% e 400 µL de *Percoll* 45% (GE, Healthcare, Piscataway, NJ, USA), centrifugado a 5000g/5min) (Machado et al., 2009). Após a centrifugação, o pellet foi retirado e centrifugado por 5 minutos em meio TALP (Parrish et al., 1995) suplementado com 2 mM de penicilamina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 1 mM de hipotaurina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 250 mM de epinefrina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) e 10 µg/mL de heparina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), a 700G. O pellet resultante foi ressuspenso com meio de fecundação (FEC), e adicionado na gota de fecundação na concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Após a incubação dos espermatozoides com os ovócitos maturados (16-18 horas), os prováveis zigotos foram desnudados por pipetagens sucessivas e foram lavados em gotas de 150µL de meio de fluido de oviduto sintético (SOF) e cultivados utilizando meio SOF suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de *sodium tri citrato*, 2,77 mM de myo-inositol e 5% SFB (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) (Holm et al, 1999) em estufa à 38,5 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os embriões foram avaliados no Dia (D) 2 para determinação da taxa de clivagem, e no D6 e D7 para taxa de blastocisto, sendo classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade de acordo com o Manual da IETS (International Embryo Technology Society) (Robertson & Nelson, 1998).

### **4.4 Quantificação de lipídios citoplasmáticos**

A quantificação de lipídios foi realizada através do corante Sudan Black B, conforme descrito por Sudano et al. (2012), com pequenas modificações. Primeiramente os embriões no estágio de blastocisto expandido (Bx) foram lavados em solução de PBS, transferidos para microtubos contendo 100µL de solução de fixação (10 % de formaldeído em PBS, com pH 7,4) e transferidos para geladeira à temperatura de 7°C até o dia da coloração. No dia da coloração, os embriões foram lavados duas vezes em água destilada acrescida de 0,05 % de PVA (álcool polivinílico). Após as lavagens, os mesmos foram transferidos para gotas de etanol 50% durante 2 minutos. Em seguida os embriões foram corados em gotas de 20 µl de Sudan Black (1% v/v) em etanol 70%, onde permaneceram de 1- 2 minutos. Para a remoção do excesso do corante, os embriões foram lavados 3 vezes (5 min cada banho) em etanol 50%, seguido por uma lavagem de 5 minutos em água destilada com 0,05% de PVA. Após os banhos os embriões foram montados em gotas de 10 µl de água destilada com 0,05% de PVA, entre lâmina e lamínula e avaliados em microscópio óptico no aumento de 20X. A imagem de cada embrião foi armazenada e avaliada utilizando o software Image J 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Para isso, as imagens coloridas foram convertidas para uma escala de cinza. Depois, os embriões foram delimitados para obter área ( $\mu\text{m}^2$ ) e média de pixel da intensidade de cinza (unidade arbitrária). Então a intensidade de cinza por área foi calculada (unidades arbitrárias/ $\mu\text{m}^2$ ). A comparação do teor de lipídios do embrião foi realizada em termos de intensidade de cinza por área (inverso da média/área) (Sudano et al., 2012).



**Figura 3.** Blastocistos expandidos em D7 corados com corante Sudan Black B. A) Bx do grupo controle; B) Bx do tratamento L-carnitina; C) Bx do tratamento CLA; D) Bx do tratamento L-carnitina+CLA.

#### 4.5 Distribuição do perfil lipídico por MALDI-TOF

Para essa avaliação utilizou-se 97 embriões D7 no estágio de blastocisto expandido. Os mesmos foram lavados 3 vezes em PBS e em seguida armazenados em micro tubos contendo 50 $\mu$ L de metanol 50% (1:1 de metanol e água destilada). Logo após, os embriões foram armazenados à -80°C. Após a descongelação, os embriões foram alocados em poços individuais na placa de MALDI de 96 poços, onde permaneceram em temperatura ambiente até a secagem. Depois se adicionou 0,6 $\mu$ L de ácido 2,5 di-hidróxibenzoico (0,125 M, DHB) diluído em metanol puro em cada poço contendo os embriões com intuito de cobri-los, permitindo a cristalização. Novamente a placa permaneceu em temperatura ambiente até a secagem dos poços.

Os espectros obtidos com a espectrometria de massa MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) foram adquiridos no modo positivo por espectrometria de massa refletida pelo Auto Flex Speed MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Os dados foram adquiridos no intervalo de massa de 500-1000 m/z com disparos de laser em diferentes regiões dos embriões até o consumo total da amostra. A distribuição dos diferentes grupos foi realizada através da análise de dendrograma.

#### 4.6 Delineamento experimental

Para avaliar o efeito da adição de substâncias delipidantes, L-carnitina e o isômero *trans-10, cis-12* do CLA, durante o cultivo na quantidade, qualidade e conteúdo de lipídios de embriões bovinos produzidos *in vitro* foram realizados três experimentos.

##### 4.6.1 Experimento 1: Efeito de substâncias delipidantes, L-carnitina e *trans-10 cis-12* CLA, durante o cultivo embrionário na produção de embriões *in vitro*.

Inicialmente foi realizado um pré-experimento comparando os diferentes tratamentos em dois sistemas de cultivo *in vitro* com e sem óleo. O objetivo desse pré-

experimento foi avaliar se o cultivo com óleo afetaria a resposta aos tratamentos quando o CLA fosse utilizado, isso porque sendo um ácido graxo tenderia a migrar para o óleo e ter sua atividade alterada. Essa migração poderia levar a uma avaliação errônea do efeito desses tratamentos na produção de embriões PIV. Nos tratamentos em que foi utilizado óleo siliconado o cultivo foi realizado em placas de 35 mm contendo gotas de 150  $\mu\text{L}$  de SOF (cobertas com óleo siliconado), acrescido ou não de substâncias delipidantes. Para os tratamentos sem óleo, utilizou-se placas NUNC de 4 poços (marca) contendo 500  $\mu\text{L}$  de meio SOF, acrescido ou não de substâncias delipidantes.

Para isso foram utilizados 910 ovócitos e após a fecundação dos mesmos, os possíveis zigotos foram distribuídos em oito tratamentos durante o cultivo *in vitro*, totalizando três réplicas:

Tratamento 1- Grupo Controle com óleo: meio SOF, suplementado com 5% de SFB;

Tratamento 2- Grupo L-carnitina com óleo: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina;

Tratamento 3- Grupo CLA com óleo: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de *trans-10 cis-12* CLA;

Tratamento 4- Grupo L-carnitina+CLA com óleo: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina e 100  $\mu\text{M}$  de *trans-10 cis-12* CLA.

Tratamento 5- Grupo Controle sem óleo: meio SOF, suplementado com 5% de SFB;

Tratamento 6- Grupo L-carnitina sem óleo: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina;

Tratamento 7- Grupo CLA sem óleo: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 100  $\mu\text{M}$  de *trans-10 cis-12* CLA;

Tratamento 8- Grupo L-carnitina+CLA sem óleo: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina e 100  $\mu\text{M}$  de *trans-10 cis-12* CLA.

Ao final do período de cultivo (D7) avaliou-se a taxa de produção de embriões nos diferentes tratamentos.

Após a análise dos resultados, utilizou-se o sistema de cultivo com óleo por apresentar maior taxa de blastocisto em D7, uma vez que não houve interação entre os tratamentos e o sistema de cultivo. Então, realizou-se o experimento 1, onde o efeito de diferentes agentes delipidantes durante o cultivo embrionário na produção e cinética de desenvolvimento foi avaliado utilizando-se o total de 13 réplicas. Após a fecundação dos ovócitos, os possíveis zigotos foram distribuídos em 4 tratamentos:

Tratamento 1- Grupo Controle: meio SOF, suplementado com 5% de SFB;

Tratamento 2- Grupo L-carnitina: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina;

Tratamento 3- Grupo CLA: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 100 µM de *trans-10 cis-12* CLA;

Tratamento 4- Grupo L-carnitina+CLA: meio SOF suplementado com 5% de SFB, acrescido de 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-carnitina e 100 µM de *trans-10 cis-12* CLA.

Os embriões foram avaliados no D2 para a clivagem e D7 para a taxa de blastocisto.

#### **4.6.2 Experimento 2: Efeito de substâncias delipidantes, L-carnitina e *trans-10 cis-12* CLA, durante o cultivo embrionário na quantificação e distribuição do perfil lipídico em embriões bovinos produzidos *in vitro*.**

Foi avaliada a quantidade de lipídios presentes no citoplasma e a distribuição do perfil lipídico em embriões D7 (Bx) utilizando os mesmos tratamentos do experimento 1 durante o cultivo *in vitro*:

Ao final do período de cultivo (D7) os embriões (Bx) foram submetidos à análise de quantificação de lipídios (Grupo controle: n=39; Grupo L-carnitina: n=33; Grupo CLA: n=31; Grupo L-carnitina+CLA: n=32) e lipidoma (Grupo controle: n=25; Grupo L-carnitina: n=24; Grupo CLA: n=25; Grupo L-carnitina+CLA: n=23). Para isso, foram realizadas 7 réplicas.

Para a quantificação de lipídios utilizou-se o corante Sudan Black B, conforme o método descrito por Sudano et al. (2012), onde a comparação do teor de lipídios do embrião foi realizada em termos de intensidade de cinza por área.

Para o lipidoma, utilizou-se a análise através do MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*). Os dados foram adquiridos no intervalo de massa de 500-1000 m/z com disparos de laser em diferentes regiões dos embriões até o consumo total da amostra. A distribuição dos diferentes grupos foi realizada através da análise de dendrograma.

#### 4.7 Análise estatística

Para comparar a interação entre tratamentos e os sistemas com e sem óleo, realizou-se análise de distribuição pelo SAS (*Statistical Analysis System*) University Edition, para ver a normalidade entre os dados. Verificando serem paramétricos, aplicou-se a análise de variância two-way seguida pela comparação entre as médias pelo teste Tukey, considerando o nível de significância de  $P < 0,05$ .

A comparação entre os grupos, envolvendo as variáveis binomiais (taxa de clivagem e blastocisto), foi realizada pelo teste do Qui-quadrado, considerando o nível de significância de 5%. Os dados para quantificação de lipídios foram comparados entre os tratamentos utilizando one-way análise de variância (ANOVA). A comparação entre os grupos foi executada pelo teste Newman-Keuls, programa Prophet versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1997), considerando nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados

#### 5.1.1 Experimento 1: Efeito de substâncias delipidantes, L-carnitina e *trans-10 cis-12* CLA, durante o cultivo embrionário na produção de embriões *in vitro*.

Nesse experimento foi avaliado o efeito de substâncias delipidantes na produção de embriões *in vitro*. Considerando que uma das substâncias utilizadas (CLA) era um ácido graxo e que poderia migrar para o óleo foi realizado um pré-experimento para avaliar se a presença de óleo durante cultivo poderia afetar a concentração do CLA alterando a resposta à essa substância.

Na Tabela 1 são apresentados os dados referentes às taxas de clivagem e produção de embriões em D6 e D7, de embriões produzidos na presença de agentes delipidantes em dois sistemas de cultivo diferentes (placas com óleo siliconado e placa de 4 poços sem óleo).

Pode-se observar que não houve interação entre os sistemas de cultivo e os tratamentos. Portanto, os dados foram agrupados e então foi feita a comparação entre as médias. Os sistemas de cultivo e os tratamentos não tiveram efeito sobre a taxa de clivagem, uma vez que não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

Com relação à taxa de blastocistos em D6 e D7, pode-se observar que o sistema de cultivo com óleo teve efeito sobre a produção de embriões, visto que esse sistema

apresentou maior porcentagem de blastocistos quando comparado ao sistema de cultivo sem óleo ( $P < 0,05$ ).

No que diz respeito aos tratamentos, o tratamento L-carnitina diferiu significativamente do tratamento CLA, apresentando maior porcentagem de blastocistos em D6 ( $P < 0,05$ ). Já os demais tratamentos não diferiram entre si. Entretanto, o tratamento CLA apresentou menor porcentagem de embriões em D7 com relação ao grupo controle e ao tratamento L-carnitina ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 1. Taxa de clivagem no dia (D) 2 de desenvolvimento e taxa de blastocisto em D6 e D7, de embriões bovinos cultivados na presença de substâncias delipidantes, L-carnitina e *trans-10 cis-12* CLA, em dois sistemas de cultivos diferentes (com e sem óleo)**

| Tratamento      | Porcentagem de embriões (%) |          |                     |                     |                     |                      |                     |                     |          |          |                      |                      |
|-----------------|-----------------------------|----------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------|----------|----------------------|----------------------|
|                 | Nº de ovócitos              |          | Clivagem            |                     | Total D6            |                      | Total D7            |                     | Total    |          |                      |                      |
|                 | Óleo                        | Sem óleo | Óleo                | Sem óleo            | Óleo                | Sem óleo             | Óleo                | Sem óleo            | Ovócitos | Clivagem | T6                   | T7                   |
| Controle        | 103                         | 125      | 97±3,5              | 95±4,1              | 19±2,9              | 11±0,9               | 51±4,6              | 30±3,8              | 228      | 96±3,5   | 15±4,9 <sup>AB</sup> | 40±11,9 <sup>A</sup> |
| L-carnitina     | 109                         | 127      | 93±3,1              | 95±1,5              | 27±12,9             | 14±5,5               | 42±6,7              | 35±8,0              | 236      | 94±2,4   | 20±11,2 <sup>A</sup> | 39±7,7 <sup>A</sup>  |
| CLA             | 101                         | 115      | 88±8,2              | 93±2,8              | 16±6,0              | 2,3±2,3              | 32±1,5              | 20±1,7              | 216      | 91±6,2   | 9±8,5 <sup>B</sup>   | 26±6,7 <sup>B</sup>  |
| L-carnitina+CLA | 110                         | 120      | 91±5,6              | 96±5,2              | 17±6,2              | 5,4±6,2              | 48±11,5             | 26±9,4              | 230      | 93±5,5   | 11±8,5 <sup>AB</sup> | 37±1,5 <sup>AB</sup> |
| Total           | 423                         | 487      | 92±5,7 <sup>a</sup> | 95±3,3 <sup>a</sup> | 20±8,0 <sup>a</sup> | 8,3±6,1 <sup>b</sup> | 43±9,7 <sup>a</sup> | 28±8,1 <sup>b</sup> | 910      |          |                      |                      |

<sup>a,b</sup> Valores com letras minúsculas diferentes entre as colunas óleo e sem óleo em cada variável diferem significativamente pela comparação entre as médias feita pelo teste Tukey (P<0,05).

<sup>A,B</sup> Valores com letras maiúsculas diferentes entre linhas diferem significativamente entre os tratamentos pela comparação entre as médias feita pelo teste Tukey (P<0,05). Bi= blastocisto inicial; Bl= blastocisto; Bx= blastocisto expandido; Bn= blastocisto em eclosão; Be= blastocisto eclodido. CLA= isômero *trans-10 cis-12* do ácido linoleico conjugado.

Para os demais experimentos foram utilizados o sistema com óleo. Foi então avaliada a taxa de produção e a cinética de desenvolvimento embrionário nos 4 tratamentos. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Os dados relacionados à taxa de clivagem mostraram-se semelhantes entre os tratamentos, assim como a velocidade de desenvolvimento embrionário no D7 ( $P > 0,05$ ). Já a quantidade de embriões produzidos no D6 e D7 foi maior no grupo Controle do que nos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ), demonstrando que a suplementação com agentes delipidantes não afeta a qualidade, mas afeta negativamente a produção de embriões.

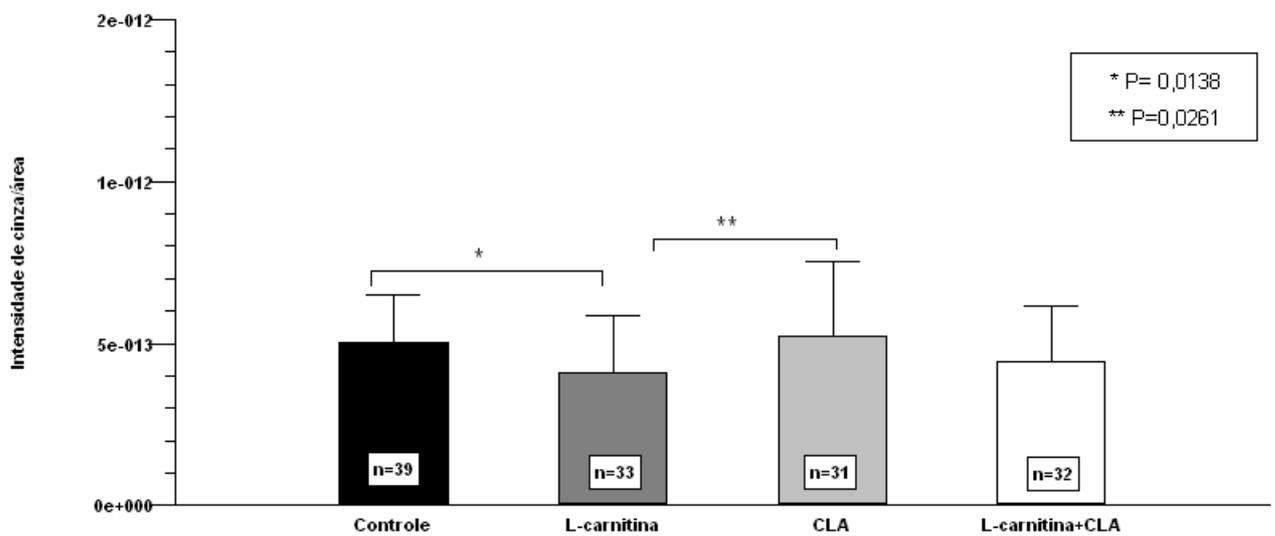
**Tabela 2. Taxa de clivagem no dia (D) 2 de desenvolvimento e taxa de blastocisto em D6 e D7, de embriões bovinos cultivados na presença de substâncias delipidantes, L-carnitina e *trans-10 cis-12* CLA.**

| Tratamentos     | Nº de ovócitos | Nº de embriões (%) |           |                         |                         |                          |           |            |             |        |        |                          |
|-----------------|----------------|--------------------|-----------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------|------------|-------------|--------|--------|--------------------------|
|                 |                | D2                 |           | D6                      |                         |                          | D7        |            |             |        |        |                          |
|                 |                | Clivagem           | Bi        | Bl                      | Bx                      | Total                    | Bi        | Bl         | Bx          | Bn     | Be     | Total                    |
| Controle        | 616            | 583(95±4,3)        | 52(8±1,6) | 46(7±1,1) <sup>a</sup>  | 18(3±0,8) <sup>a</sup>  | 116(19±2,7) <sup>a</sup> | 40(6±1,6) | 83(13±1,7) | 175(28±3,0) | 1(0±0) | 2(0±0) | 301(49±3,5) <sup>a</sup> |
| L-carnitina     | 648            | 618(95±3,5)        | 39(6±1,4) | 38(6±1,2) <sup>ab</sup> | 7(1±1,0) <sup>ab</sup>  | 84(13±2,4) <sup>b</sup>  | 34(5±1,1) | 60(9±1,5)  | 159(25±2,6) | 0      | 0      | 253(39±3,0) <sup>b</sup> |
| CLA             | 627            | 598(95±3,7)        | 31(5±1,3) | 45(7±1,5) <sup>ab</sup> | 12(2±0,9) <sup>ab</sup> | 88(14±2,6) <sup>b</sup>  | 27(4±1,1) | 82(13±2,1) | 154(25±2,7) | 0      | 0      | 263(42±3,9) <sup>b</sup> |
| L-carnitina+CLA | 597            | 556(95±3,1)        | 29(5±0,8) | 4(7±2,2) <sup>b</sup>   | 4(1±0,6) <sup>b</sup>   | 75(13±2,6) <sup>b</sup>  | 31(5±1,1) | 72(12±1,6) | 127(21±2,9) | 0      | 0      | 230(39±3,9) <sup>b</sup> |

<sup>a,b</sup> Valores com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste chi-quadrado (P<0,05). Bi= blastocisto inicial; Bl= blastocisto; Bx= blastocisto expandido; Bn= blastocisto em eclosão; Be= blastocisto eclodido. CLA= isômero *trans-10 cis-12* do ácido linoleico conjugado.

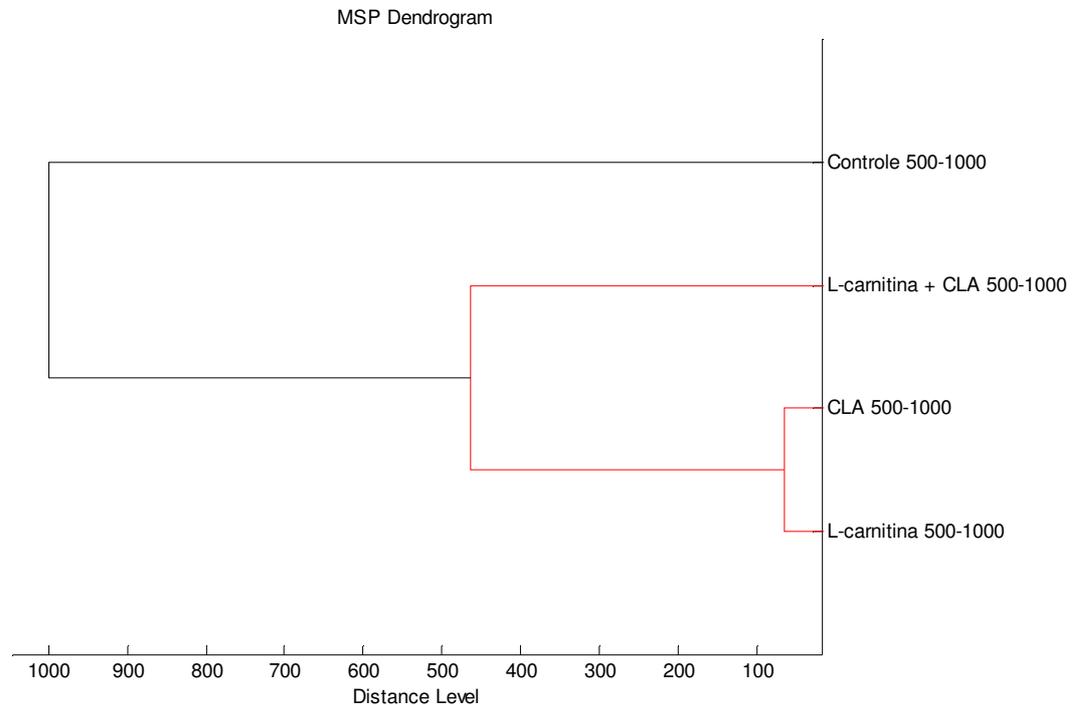
### 5.1.2 Experimento 2: Efeito de substâncias delipidantes, L-carnitina e *trans-10 cis-12* CLA, durante o cultivo embrionário na quantificação e distribuição lipídica em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Nesse experimento avaliou-se a quantidade de lipídios presentes no citoplasma dos embriões D7 (Bx), além da distribuição dos grupos lipídicos dos mesmos. Os resultados são demonstrados na Figura 4.



**Figura 4.** Efeito da L-carnitina e do isômero *trans-10 cis-12* do CLA no acúmulo de lipídios intracitoplasmáticos em embriões bovinos. Valores expressos em intensidade de cinza por área obtidos através da coloração Sudan Black B em blastocistos expandidos no D7.  $P < 0,05$ .

Como apresentado na Figura 2, os embriões cultivados no meio acrescido de L-carnitina apresentaram menor quantidade de lipídios no citoplasma do que aqueles cultivados sem a presença de agentes delipidantes ( $P = 0,0138$ ) ou na presença do isômero *trans-10 cis-12* do CLA ( $P = 0,0261$ ). Entretanto, no grupo onde o meio foi suplementado com L-carnitina+CLA não houve diferença na quantificação dos lipídios com relação aos demais tratamentos.



**Figura 5.** Dendrograma de embriões bovinos (Bx) em D7 submetidos a quatro tratamentos distintos durante o cultivo *in vitro*. Análise realizada através do MALDI-TOF. Dados adquiridos no intervalo de massa entre 500-1000 m/z. CLA= isômero *trans-10 cis-12* do ácido linoleico conjugado.

A Figura 5 mostra a distribuição da composição de lipídios entre os diferentes tratamentos. Pode-se observar que o grupo Controle apresentou-se distante dos demais tratamentos. Os tratamentos CLA e L-carnitina apresentaram-se mais agrupados entre si do que os outros tratamentos, mostrando uma similaridade entre os lipídios existentes nos embriões cultivados nesses tratamentos. Além disso, o grupo L-carnitina+CLA, apesar de menos agrupado com relação aos tratamentos em que se utilizaram agentes delipidantes, apresentou-se mais próximo desses tratamentos do que ao grupo Controle.

## 5.2 Discussão

Com relação aos resultados obtidos no experimento 1, inicialmente realizou-se um pré-experimento para avaliar se o isômero *trans-10, cis-12* do CLA tenderia a migrar para o óleo, por ser um ácido graxo, levando a uma avaliação errônea do efeito dos tratamentos onde foi utilizado essa substância. Os resultados demonstraram que não houve interação entre os sistemas de cultivo e os tratamentos. Portanto, se os tratamentos utilizados apresentaram taxa de produção de embriões alta ou baixa no sistema de cultivo com óleo, essa taxa foi proporcional no sistema de cultivo sem óleo. No entanto, observou-se o efeito do sistema de cultivo com relação à taxa de produção de embriões em D6 e D7, uma vez que a porcentagem de embriões produzidos foi maior nesse sistema, quando comparado ao sistema de cultivo sem óleo. Até o momento, na literatura não tinha sido realizada a comparação entre o efeito do CLA na presença ou ausência do óleo no sistema de cultivo. Portanto, sugere-se que esse isômero do CLA pode ser utilizado tanto na presença quanto na ausência do óleo siliconado.

No experimento 1, avaliou-se o efeito da L-carnitina e *trans-10 cis-12* CLA, durante o cultivo embrionário na produção de embriões *in vitro*. Os resultados demonstraram que a taxa de clivagem, assim como a velocidade de desenvolvimento embrionário no D7, não foram afetadas na presença dos agentes delipidantes, pois não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Takahashi et al. (2013), Phongnimitr et al. (2013) e Chankitisakul et al. (2013), quando utilizaram a mesma dose de L-carnitina durante a maturação e/ou cultivo *in vitro* de embriões bovinos, assim como os resultados encontrados por Stinshoff et al. (2014) e Batista et al. (2014) ao utilizarem 100  $\mu\text{M}$  de *trans-10 cis-12* CLA durante o CIV, uma vez que esses autores obtiveram taxas de clivagem semelhantes, quando o grupo suplementado com essas substâncias foi comparado ao grupo controle.

No entanto, no presente estudo a quantidade de embriões produzidos no D6 e D7 foi maior no grupo Controle do que nos demais tratamentos ( $P < 0,05$ ), demonstrando que a suplementação com agentes delipidantes não afeta a qualidade, mas afeta negativamente a produção de embriões. Esses resultados diferem dos encontrados por Takahashi et al. (2013) quando utilizaram diferentes doses de L-carnitina durante o CIV, uma vez que esses autores obtiveram efeito positivo na taxa de blastocistos no D7 na presença dessa substância nas doses de 0,3  $\text{mg mL}^{-1}$  e 0,6  $\text{mg mL}^{-1}$ , quando comparados ao grupo controle. Entretanto,

quando Phongnimitr et al. (2013) utilizaram L-carnitina na mesma dose durante as três etapas de PIVE não observaram diferença na taxa de blastocistos quando comparados ao grupo controle. Corroborando esses resultados, Chankitisakul et al. (2013) também não observaram diferença significativa entre o grupo suplementado e o grupo controle com relação à taxa de blastocistos em D8, quando utilizaram L-carnitina durante a MIV.

Já com relação ao efeito negativo da suplementação com 100  $\mu$ M de *trans-10 cis-12* CLA durante o CIV, nossos resultados foram semelhantes aos relatados por Stinshoff et al. (2014), quando obtiveram taxas de blastocistos no D8 apresentando menor porcentagem nos embriões que foram cultivados na presença dessa substância, quando comparados ao grupo controle, corroborando esse efeito negativo no desenvolvimento embrionário. Esses autores atribuíram essa diminuição à utilização de 5  $\mu$ L de dimetilsufóxido (DMSO) no meio suplementado com 100  $\mu$ M de *trans-10 cis-12* CLA, citando que o efeito tóxico dessa substância poderia ter afetado o desenvolvimento embrionário. Entretanto, no presente experimento, onde não foi utilizado DMSO, além do CLA ter causado um efeito negativo na taxa de blastocisto em D7, ao contrário do que se esperava, nos embriões que foram expostos a esse tratamento a quantidade de lipídios não diminuiu, assim como observado por Absalón-Medina et al. (2014).

Esses autores também observaram menores taxas de blastocisto quando suplementaram o meio de maturação ou cultivo *in vitro* de embriões bovinos. O efeito desse tratamento pode ter afetado o transportador de glicose. Assim, o *trans-10 cis-12* CLA pode ter redirecionado a glicose para síntese de TAG, comprometendo a glicólise, uma vez que essa via metabólica é fisiologicamente aumentada durante a compactação da mórula (Thompson et al., 2000; Granlund et al., 2005; Absalón-Medina et al., 2014). Portanto, esse redirecionamento da glicose e aumento da lipogênese resultaram no aumento do conteúdo lipídico desses embriões, prejudicando também seu desenvolvimento embrionário (Sutton-McDowall et al., 2012). Além disso, vale ressaltar que níveis elevados de AG podem afetar a atividade mitocondrial e sinalização celular durante a PIVE, tal como refletido pelo desenvolvimento embrionário comprometido (Marei et al., 2009; Al Darwich et al., 2010; Van Hoeck et al., 2013).

No entanto, nossos resultados divergem dos encontrados por Batista et al. (2014), visto que esses autores não observaram diferença entre o grupo controle e o suplementado com CLA, com relação à taxa de blastocisto no D8. Além disso, Leão et al. (2015) também não observaram diferença nas taxas de blastocisto no D7 de desenvolvimento embrionário, quando da suplementação com a mistura de 100  $\mu$ M de *cis-9 trans-10* e *trans-10*

*cis-12* CLA durante a maturação, cultivo *in vitro*, maturação e cultivo *in vitro* em comparação ao grupo controle.

No presente estudo, apesar de não ter sido mensurado o nível de ROS, sugere-se que esse efeito negativo na taxa de blastocisto seja atribuído ao possível aumento dos níveis de ROS nos embriões na presença da L-carnitina, uma vez que as ROS causam danos celulares, como a fragmentação do DNA e apoptose, e conseguinte bloqueio no desenvolvimento embrionário. Assim, a L-carnitina pode não ter eliminado quantidade suficiente de ROS, resultando na diminuição do desenvolvimento embrionário. Sobretudo, Takahashi et al. (2013) demonstraram um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nos estágios de duas para oito células, o que resultou em maior acúmulo de ROS. Os autores consideraram que a partir da fase de oito células, o aumento intracelular de ROS pode ter neutralizado o efeito antioxidante da L-carnitina. Além disso, Rahme (2012) também observou aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos embriões que foram cultivados na presença de *trans-10 cis-12* CLA, mas não observou diferença na taxa de blastocisto. No entanto, no presente experimento, apesar de também não ter sido mensurado, o nível de ROS gerado nos embriões na presença do CLA pode ter afetado seu desenvolvimento embrionário.

Apesar dos resultados positivos encontrados nos trabalhos citados anteriormente, ressalta-se que a melhora na produção desses embriões foi devido ao aumento no metabolismo lipídico mitocondrial e o efeito antioxidante da L-carnitina, uma vez que reduziu o nível de ROS intracelulares que poderiam induzir a fragmentação do DNA dos embriões (Abdelrazik et al., 2009; Dunning et al., 2010). No entanto, quando a L-carnitina atua no metabolismo lipídico através da translocação de AG a partir do citosol para o interior da mitocôndria, para então serem submetidos à  $\beta$ -oxidação na forma de acetil CoA, O NADH gerado a partir acetil CoA é utilizado mais tarde no ciclo do ácido cítrico. Essa utilização do NADH através da fosforilação oxidativa produz ATP, e ROS como subproduto. Sendo assim, o aumento na produção de energia também aumenta o nível de ROS nos embriões (Harvey et al., 2002; Sutton-Mcdowall et al., 2012). Isso justificaria o possível aumento nos níveis de ROS no presente estudo, e consequente efeito negativo na taxa de blastocistos em D7. Já no grupo Controle o nível de ROS produzido não afetou a taxa de blastocistos, pois a quantidade produzida não foi suficiente para causar os danos que esse subproduto causou nos embriões tratados com os agentes delipidantes.

Mesmo assim, ressalta-se que a utilização dessas substâncias delipidantes teve como objetivo principal a diminuição do conteúdo lipídico, com intuito de aumentar a resistência desses embriões ao processo de criopreservação, assim como demonstrado por

Batista et al. (2014) e Leão et al. (2015), uma vez que o CLA reduz a síntese de ácidos graxos e sua absorção pelo fato de inibir a expressão de genes que codificam enzimas de síntese de lipídios e inibe a atividade da lipoproteína lipase, enzima responsável pela hidrólise de triglicerídeos extracelulares e liberação de AG (Gervais et al., 2009).

Vale ressaltar as diferenças existentes no metabolismo embrionário de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*. A grande relação entre as diferenças nas mitocôndrias nesses embriões é questionada principalmente pela capacidade do embrião em metabolizar as reservas energéticas suficientes para seu desenvolvimento. Alguns estudos demonstraram que a diferença na densidade mitocondrial está diretamente relacionada à qualidade embrionária, o que faz com que o embrião PIV apresente menor qualidade com relação ao *in vivo* (Farin et al., 2004). Isso explica o aumento no conteúdo lipídico de embriões bovinos PIV na presença do SFB.

Nossos resultados demonstraram que apesar da suplementação com as duas substâncias delipidantes ter apresentado menor porcentagem de embriões quando comparados ao grupo controle, o tratamento com L-carnitina resultou em embriões com menor conteúdo lipídico com relação ao grupo controle e o tratamento CLA. Isso sugere que se esses embriões fossem criopreservados, possivelmente poderiam apresentar taxas de re-expansão satisfatórias, uma vez que a acumulação de lipídios aumenta a sensibilidade de embriões bovinos PIV quando submetidos ao processo de criopreservação. Contudo, no tratamento L-carnitina+CLA não foi observada diferença na quantificação de lipídios quando comparado aos demais tratamentos. Portanto, a mesma consideração feita anteriormente com relação à criopreservação desses embriões pode ser sugerida para os embriões cultivados na interação dessas duas substâncias delipidantes. Para confirmar esse possível efeito positivo pós-criopreservação, esses embriões devem passar por esse processo, através da vitrificação ou congelamento, para responder todas as questões que ficaram em aberto.

Nesse mesmo sentido, estudos que utilizaram L-carnitina durante a maturação e/ou cultivo *in vitro* de embriões bovinos PIV, independentemente da taxa de produção de blastocisto, quando os embriões foram criopreservados os resultados obtidos pós-aquecimento mostraram-se satisfatórios quando comparados ao grupo controle, onde observaram maiores taxas de re-expansão pós-aquecimento nos embriões que foram expostos à L-carnitina nas doses de 0,3 e 0,6 mg mL<sup>-1</sup> com relação ao grupo controle, 24h, 48h e 72h (P<0,05) (Takahashi et al., 2013). Entretanto, Phongnimit et al. (2013) apesar de terem observado maior porcentagem de embriões no D7 no grupo que foi suplementado com 0,6 mg mL<sup>-1</sup> de L-

carnitina durante a MIV e FIV, não observaram diferença na porcentagem de embriões re-expandidos pós-aquecimento com relação ao grupo controle ( $P > 0,05$ ).

Além disso, Batista et al. (2014) obtiveram maiores taxas de re-expansão 24 horas pós-aquecimento nos embriões que foram cultivados na presença do *trans-10 cis-12* CLA com relação ao grupo controle, além da diminuição do conteúdo lipídico dos mesmos ( $P < 0,01$ ). No entanto, Leão et al. (2015) não realizaram avaliações de quantificação do conteúdo lipídico nos embriões, mas observaram mudanças no perfil lipídico dos embriões cultivados na presença da mistura de *cis-9 trans-10* e *trans-10 cis-12* CLA, visto que o perfil de fosfatidilcolina e esfingomiélna aumentou. Esses lipídios são componentes da membrana de células eucarióticas e contém resíduos de ácido graxo CLA, assim foi explicado o enriquecimento dos mesmos quando expostos aos isômeros do CLA, o que aumentou o nível de insaturação nas membranas dos blastocistos e conseguinte fluidez. Esses autores demonstraram que a taxa de re-expansão 3h e 24h pós-aquecimento foi maior nos embriões maturados e cultivados *in vitro* na presença do CLA, quando comparados ao grupo controle ( $P < 0,05$ ).

Outra avaliação feita nesse estudo foi a da distribuição dos grupos lipídicos nos diferentes tratamentos, demonstrada através do dendrograma obtido pela análise de MALDI-TOF. Observou-se que o grupo controle manteve-se distante dos demais tratamentos. Entre os tratamentos, o CLA e L-carnitina se mostraram mais agrupados. Já o tratamento L-carnitina+CLA, apresentou-se mais próximo dos outros tratamentos do que do grupo controle. O perfil lipídico dos embriões foi alterado de acordo com os tratamentos (Figura 3). Sendo assim, essa distribuição demonstrou a variação nos grupos lipídicos entre os tratamentos. Esses dados corroboram os resultados obtidos por Leão et al. (2015) através de espectrometria de massa, onde demonstraram que o CLA foi capaz de alterar o perfil lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro*, conseqüentemente aumentou a fluidez da membrana e melhorou a taxa de sobrevivência embrionária pós-criopreservação.

A tentativa de utilizar L-carnitina e o CLA associados, durante o cultivo *in vitro* de embriões PIV, foi atribuída às formas distintas de atuação dessas substâncias no metabolismo lipídico, como demonstrado nos trabalhos citados anteriormente. Sendo assim, a hipótese do presente estudo foi que a interação dessas substâncias poderia resultar num efeito sinérgico quanto à redução de lipídios nos embriões. No entanto, o tratamento L-carnitina+CLA não diferiu dos demais. Sendo assim, sugere-se que pode ter ocorrido um equilíbrio na quantidade de lipídios nesse tratamento, e não se sabe se esse equilíbrio afeta ou não a sobrevivência embrionária pós-criopreservação, uma vez que os embriões do presente

estudo não foram criopreservados. Isso pode ter sido devido à concentração das substâncias delipidantes utilizadas. Porém, as doses eleitas para serem utilizadas no presente estudo foram baseadas na literatura de acordo com os melhores resultados obtidos quando foram comparadas as diferentes variáveis estudadas (Takahashi et al., 2013; Batista et al., 2014).

Sobretudo, a grande importância da utilização desses agentes está relacionada à diminuição do conteúdo lipídico, diminuição da sensibilidade embrionária ao processo de criopreservação e consequente melhora nas taxas de re-expansão pós-criopreservação. Sendo assim, o tratamento L-carnitina diminuiu de forma significativa a quantidade de lipídios intracitoplasmáticos em embriões no estágio de Bx, e não afetou a qualidade dos mesmos, sendo sugestivo de aumento na resistência à criotolerância.

## 6 CONCLUSÕES

Independentemente de serem utilizadas em associação ou separadas, essas substâncias tiveram efeito negativo na taxa de blastocistos em D7. Porém, o tratamento com L-carnitina durante o cultivo *in vitro* diminuiu de forma significativa a quantidade de lipídios intracitoplasmáticos nos embriões bovinos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R.; MAHFOUZ, R.; AGARWAL, A. L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 2, p. 589-596, 2009.

ABSALÓN-MEDINA, V.A.; BEDFORD-GUAUS, S.J.; GILBERT, R.O.; SIQUEIRA, L.C.; ESPOSITO, G.; SCHNEIDER, A.; CHEONG, S.H.; BUTLER, W.R. The effects of conjugated linoleic acid isomers *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 on in vitro bovine embryo production and cryopreservation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p.6164–6176, 2014.

AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M.H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPKalpha phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 93, n. 1-2, p.30-36, 2010.

BATISTA, R.I.T.P.; RAPOSO, N.R.B.; CAMPOS-JUNIOR, P.H.A.; PEREIRA, M.M.; CAMARGO, L.S.A.; CARVALHO, B.C.; GAMA, M.A.S.; VIANA, J.H.M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of in vitro-produced crossbred bovine embryos. **Journal of Animal Science and Biotechnology**. v. 5, n. 33, p. 1-8, 2014.

CAIXETA, E.S.; DODE, M.A.N. Avaliações da competência ovocitária em bovinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 1, p. 8-18, 2010.

CHANKITISAKUL, V.; SOMFAI, T., INABA, Y.; TECHAKUMPHU, M.; NAGAI, T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 590–598, 2013.

DUNNING, K.R.; CASHMAN, K.; RUSSELL, D.L.; THOMPSON, J.G.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. **Biology of Reproduction** v. 83, n. 6, p. 909–918, 2010.

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J.A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 53-62, 2004.

GERVAIS, R.; MCFADDEN, J.W.; LENGI, A.J.; CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y. Effects of intravenous infusion of trans-10, cis-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n. 10, p.5167–5177, 2009.

GRANLUND, L.; PEDERSEN, J.I.; NEBB, H.I. Impaired lipid accumulation by trans10, cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1687, n. 1-3, p. 11-22, 2005.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. REDOX regulation of early embryo development. **Reproduction**, v. 123, n. 4, p. 479–486, 2002.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 683-700, 1999.

LEÃO, B.C.S.; ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; CABRAL, E.C.; COELHO, M.B.; FERREIRA, C.R.; EBERLIN, M.N.; ACCORSI, M.F.; NOGUEIRA, É.; MINGOTI, G.Z. Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. **Theriogenology**, v. 84, n. 1, p.127–136, 2015.

MACHADO, G.M; CARVALHO, J.O; FILHO, E. S; CAIXETA, E.S; FRANCO, M.M; RUMPF, R ; DODE, M.A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n.8, p. 1289-1297, 2009.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1064-1072, 2009.

MARIANTE, A.S.Ç ALBUQUERQUE, M.S.MÇ RAMOS, A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.64-68, 2011.

OGAWA, B.S.; NAKAYAMA, N.; MATSUNARI, H.; NAKANO, K.; FUJIWARA, T.; IKEZAWA, Y.; NAGASHIMA, H. Developmental ability of porcine in vitro matured oocytes at the meiosis II stage after vitrification. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, n. 3, p. 356-361, 2010.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t*, *12c* CLA). **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 293-301, 2007.

PHONGNIMITR, T.; LIANG, Y.; SRIRATTANA, K.; PANYAWAI, K.; SRIPUNYA, N.; TREETAMPINICH, C.; PARNPAI, R. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. **Animal science journal**, v. 84, n. 11, p. 719-725, 2013.

RAHME, L.S.T.R. **Efeito Do Ácido Linoléico Conjugado Na Sobrevivência Pós Criopreservação De Embriões Bovinos Produzidos *In Vitro***. 2012, 40 p. (Dissertação de mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, 2012.

ROBERTSON, I.; NELSON, R.E. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow D, Seidel SM (Ed.) **Manual of the International Embryo Transfer Society**. IETS, Savoy, IL, USA. p.103-134, 1998.

STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BOLLWEIN, H., WRENZYCKI, C. Dimethylsulfoxide and conjugated linoleic acids affect bovine embryo development in vitro. **Reproduction Fertility and Development**, v. 26, n. 4, p. 502–510, 2014.

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

SUDANO, M.J.; SANTOS, V.G.; TATA, A.; FERREIRA, C.R.; PASCHOAL, D.M.; MACHADO, R.; BURATINI, J.; EBERLIN, M.N.; LANDIM-ALVARENGA, F.D. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 130, 2012.

SUTTON-MCDOWALL, M.L.; FEIL, D.; ROBKER, R.L.; THOMPSON, J.G.; DUNNING, K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1632–1641, 2012.

TAKAHASHI, T.; INABA, Y.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; GESHI, M.; NAGAI, T.; MANABE, N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**. v. 25, n. 4, p. 589-599, 2013.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 263-275, 2000.

VAN HOECK, V.; LEROY, J.L.M.R.; ARIAS ALVAREZ, M.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; SCHNORBUSCH, K.; BOLS, P.E.J.; LEESE, H.J.; STURMEY, D.R.G. Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: Mechanistic insights. **Reproduction**, v. 145, n. 1, p. 33-44, 2013.