

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**BRUNO PENA CARVALHO**

**USO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA, *trans* 10, *cis* 12) NO CULTIVO  
*IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: EFEITO NA PRODUÇÃO, NA  
CRIORRESISTÊNCIA E NO CONTEÚDO LIPÍDICO**

**Campos dos Goytacazes**

**2014**

**BRUNO PENA CARVALHO**

**USO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA, *trans* 10, *cis* 12) NO CULTIVO  
*IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: EFEITO NA PRODUÇÃO, NA  
CRIORRESISTÊNCIA E NO CONTEÚDO LIPÍDICO**

Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, na área de concentração de Melhoramento Genético Animal e Biotecnologia da Reprodução, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Angelo José Burla Dias

**Campos dos Goytacazes**

**2014**

**BRUNO PENA CARVALHO**

**USO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA, *trans* 10, *cis* 12) NO CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS: EFEITO NA PRODUÇÃO, NA CRIORRESISTÊNCIA E NO CONTEÚDO LIPÍDICO**

Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, na área de concentração de Melhoramento Genético Animal e Biotecnologia da Reprodução, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Aprovada em 27 de março de 2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora, Ciências-Fisiologia Geral) - UENF

---

Pesquisador Luiz Sérgio de Almeida Camargo (Doutor, Ciência Animal) - EMBRAPA

---

Prof. Álvaro Fabrício Lopes Rios (Doutor, Ciências Biológicas) . UENF

---

Prof. Angelo José Burla Dias (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF  
(Orientador)

*A Paola, Kevin e Eduarda*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido incontáveis bênçãos e principalmente por colocar pessoas tão especiais em minha vida, às quais citarei a seguir;

Ao Professor Dr. Angelo José Burla Dias, pela orientação, pela amizade, pela confiança depositada em mim e principalmente pelo exemplo de integridade e profissionalismo. Obrigado por ter me apoiado nos momentos de dificuldades e por me ajudar a superá-los!

À minha amada esposa Paola, por ser fonte de estímulo inesgotável, pelo amor incondicional, por aceitar e compreender os momentos de ausência e minhas variações de humor, por dividir comigo não só os inúmeros momentos felizes, mas também os momentos de angústia e frustrações e por perdoar minhas falhas;

Ao Dr. Willard H. Eyestone por me receber de forma muito acolhedora no período de estágio sanduíche, na Universidade Virgínia Tech, USA, com quem, apesar do curto período de convívio, pude aprender muito;

À professora Dra. Maria Clara Caldas Bussiere e ao Professor Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios pela colaboração no presente trabalho e também na minha formação profissional. Sem dúvida pude aprender muito com suas participações em bancas de projeto e qualificação, além de outras diversas discussões sobre diferentes temas, sempre muito frutíferas.

À minha mãe e às minhas irmãs por serem fonte de apoio incondicional e por morarem sempre em meu coração;

Aos amigos do LRMGA: Fernanda, Bruna, Carla, Felipe, Marcus (Highlander), Kelen, Vidal, Diego, Paula, Roger, Wilder, Hector, Gina, Gester, Natália, Laura, Valter e Margareti pelas conversas, pelos churrascos e pelo ótimo convívio no laboratório. Vocês são minha família em Campos dos Goytacazes!

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, pela oportunidade de realização do curso;

A Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão de recursos financeiros para a execução deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior . CAPES pela concessão de bolsa de estudo para realização de estágio de doutorado (bolsa Saduíche) no exterior;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária . EMBRAPA por possibilitar meu afastamento temporário para conclusão do curso de doutorado;

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigado!

"Uma vida dedicada às coisas materiais é morta, um tronco cortado; uma vida moldada por Deus é uma árvore florescente."

Provérbios, 11:28

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da adição do CLA em diferentes momentos do cultivo, avaliando seus efeitos na produção, conteúdo lipídico e criorresistência de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, foram utilizados complexos *cumulus oophorus* ovócitos aspirados de ovários obtidos em matadouros locais, maturados *in vitro* por 22h e posteriormente realizada a fecundação *in vitro* por 18 h. Os possíveis zigotos foram cultivados utilizando diferentes tempos de suplementação com CLA (100mM) conforme os tratamentos a seguir: nas primeiras 72h (CLA-I), nas últimas 72h (CLA-F), ou durante todo o período de cultivo *in vitro* (CLA-T). Como controle os embriões foram cultivados nas mesmas condições dos demais tratamentos, sem adição de CLA (CLA-C). Os possíveis zigotos foram cultivados por mais 7 dias após a FIV. Os embriões foram criopreservados por vitrificação, para posterior análise pós-descongelamento. Todas as soluções de vitrificação e desvitrificação foram mantidas a 39°C. Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a criorresistência após a desvitrificação os embriões foram cultivados por 48h em meio SOF contendo 5% de SFB. A quantificação de lipídios foi realizada pela técnica de vermelho do Nilo. Os dados foram analisados utilizando o ambiente R (versão 2.11.1). Um total de 974 oócitos foi utilizado na produção de embriões. Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quanto à taxa de clivagem, taxa de blastocistos/oócitos e taxa de blastocisto/clivados. O cultivo dos embriões em meio contendo CLA nas últimas 72 h (CLA-F) reduziu significativamente ( $P = 0,0317$ ) a taxa de sobrevivência, medida 24 h após a desvitrificação em relação aos tratamentos CLA-I e CLA-T, porém não sendo estatisticamente diferente do controle. Entretanto, a suplementação do meio de cultivo com CLA durante todo o período (CLA-T) melhorou a taxa de eclosão dos embriões ( $P = 0,0005$ ). A presença do CLA durante o cultivo *in vitro* alterou o conteúdo lipídico dos embriões bovinos. Embriões expostos ao CLA durante as primeiras 72 h (CLA-I), assim como durante as últimas 72 h (CLA-F) do cultivo *in vitro* aumentaram o conteúdo lipídico, quando comparado ao controle. A redução do conteúdo lipídico, no entanto, só foi observada nos embriões mantidos em meio suplementado com CLA durante todo o período do cultivo (CLA-T). Nos embriões desse grupo o conteúdo lipídico não diferiu significativamente dos oócitos no estágio

de vesícula germinativa [VG ( $P > 0,5$ )]. Assim, conclui-se que o uso de CLA durante todo o cultivo promoveu uma redução do conteúdo lipídico e aumento da criorresistência. Desta maneira, poderia ser utilizado como aditivo nos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos com o intuito de aumentar a criorresistência.

## ABSTRACT

The objective of the present work was to evaluate the effects of the CLA addition at different times in *in vitro* embryo culture, on production, lipid content and cryoresistance of bovine embryos produced *in vitro*. For this purpose, oocyte cumulus oophorus were aspirated from ovaries obtained at local abattoirs, matured *in vitro* for 22h and followed by *in vitro* fertilization for 18 h. The presumptive zygotes were cultured using CLA supplementation (100mM ) according to the following treatments: in the first 72 hours (CLA -I) in the last 72h (CLA- F), or during all the period of *in vitro* culture (CLA -T) . As a control, embryos were cultured under the same conditions as other treatments without addition of CLA (CLA - C). Presumptive zygotes were cultured for seven days after IVF. The embryos were cryopreserved by vitrification for further post-thaw analysis. All solutions vitrification and devitrification solutions were maintained at 39 °C. To evaluate the effect of treatments on cryoresistance after devitrification embryos were cultured for 48 h in SOF medium containing 5 % FCS. Quantification of lipids was performed by Nile red staining. Data were analyzed using the R environment (version 2.11.1). A total of 974 oocytes were used to produce embryos. No significant difference between treatments for the cleavage, blastocyst/oocyte and rate blastocyst/cleaved rates was observed. The culture medium containing the embryos in the last 72 h CLA (CLA -F ) significantly reduced ( $P = 0.0317$  ) the survival rate measured after 24 h compared to devitrification CLA-I and CLA-T treatments, but not statistically different from control. However, supplementation of medium with during all the period of *in vitro* culture (CLA-T) improved hatching rates ( $P = 0.0005$ ). The presence of CLA during *in vitro* culture altered the lipid content of bovine embryos. Embryos exposed to CLA during the first 72 h (CLA - I) as well as during the last 72 h (CLA - F) *in vitro* culture increased lipid content when compared to control. The reduction in lipid content, however, was only observed in embryos maintained in medium supplemented with CLA during all culture period (CLA -T). In embryos of this group lipid content did not differ significantly from GV oocytes ( $P > 0.5$ ). Thus, it is concluded that the use of CLA during the culture period decreases of lipid content and increased cryoresistance. Thus, it could be used as an additive in the media for *in vitro* production of bovine embryos in order to increase the cryoresistance.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa de clivagem e de blastocisto produzidos *in vitro* em meio suplementado com CLA em diferentes momentos do cultivo.....47

Tabela 2: Taxa de sobrevivência (%) e de eclosão (%) determinadas às 24 e 48 h após a desvitrificação de embriões bovinos cultivados em meio suplementado com CLA em diferentes momentos do cultivo.....52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metabolismo do oócito pró-nuclear e embrião nos estádios iniciais de clivagem.....	23
Figura 2: Metabolismo do blastocisto.....	24
Figura 3: Metabolismo e desenvolvimento de embriões pré-implantacionais.....	26
Figura 4: Transporte da Acetil-CoA através da membrana mitocondrial.....	27
Figura 5: Primeira reação para a formação de ácidos graxos.....	28
Figura 6: Síntese de palmitato.....	29
Figura 7: Estrutura dos isômeros do CLA <i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12; <i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 e ácido linoleico ( <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12).....	32
Figura 8: Distribuição dos tratamentos nas placas de CIV. CLA-C: CIV sem a adição de CLA; CLA-I: CIV com CLA nas primeiras 72h; CLA-F: CIV com CLA nas últimas 72h; CLA-T: CIV com CLA durante todo o período.....	43
Figura 9: Conteúdo lipídico de oócitos no estágio de vesícula germinativa (VG) e metáfase II (MII), e de embriões contendo ou não CLA. CLA-C: CIV sem a adição de CLA; CLA-I: CIV com CLA nas primeiras 72h; CLA-F: CIV com CLA nas últimas 72h; CLA-T: CIV com CLA durante todo o período. *Letras diferentes entre grupos indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).....	49
Figura 10: Oócitos em vesícula germinativa (A), oócitos em MII (B), embriões CLA-C (C), CLA-I (D), CLA-F (E), CLA-T (F) corados com vermelho do Nilo. Campo claro e fluorescência (Aumento 200 x).....	50

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
REVISÃO DE LITERATURA .....	16
CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	16
METABOLISMO ENERGÉTICO DE EMBRIÕES BOVINOS.....	19
METABOLISMO DE LIPÍDIOS.....	26
ÁCIDO GRAXO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) .....	32
UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO LINOLEICO NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	34
LIPÍDIOS, MEMBRANAS E O PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO.....	36
SENSIBILIDADE DOS EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i> À CRIOPRESERVAÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	41
CRIOPRESERVAÇÃO.....	43
AVALIAÇÃO DA CRIORRESISTÊNCIA.....	44
QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIO PELA COLORAÇÃO VERMELHA DO NILO.....	44
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária é um dos setores da economia nacional que mais vem crescendo nas últimas décadas. Atualmente o Brasil é possuidor do maior rebanho comercial do mundo, com pouco mais de 210 milhões de cabeças (IBGE, 2012), sendo o maior exportador de carne bovina e o sexto em produção leiteira (EMBRAPA, 2008). Com esse avanço, a busca pelo melhoramento genético do rebanho bovino se tornou uma necessidade, fazendo com que diferentes biotecnologias reprodutivas sejam desenvolvidas. Essas biotecnologias, tais como inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões (PIVE), permitem multiplicar a progênie de animais com alto valor genético, tornando possível a produção de um rebanho altamente qualificado em um curto período de tempo.

Dentre as biotecnologias utilizadas comercialmente a PIVE tem conquistado um grande espaço por ser a técnica que permite uma maior produção de embriões, quando comparado com a técnica de produção de embriões *in vivo* por superovulação, também denominada transferência de embriões convencional (VIANA *et al.*, 2010).

Por ser um processo relativamente complexo e com elevado custo de implantação, estimava-se que a produção de embriões em laboratório fosse utilizada de forma restrita, ocupando apenas nichos específicos de mercado. No entanto, nas últimas décadas esta técnica tem sido aplicada comercialmente com sucesso. Um exemplo disso é o aumento marcante do uso da produção *in vitro* de embriões no Brasil. No ano de 2011 o Brasil produziu mais de 318.000 embriões *in vitro*, totalizando cerca de 86% da produção mundial de embriões oriundos desta técnica (HASLER, 2014).

Todavia, apesar dos avanços, os baixos resultados de prenhez obtidos com embriões produzidos *in vitro* criopreservados continuam sendo um desafio, o que compromete a plena aplicação da produção *in vitro* de embriões bovinos. Diferentemente dos embriões produzidos *in vivo* os embriões produzidos *in vitro* são muito sensíveis ao congelamento, gerando uma baixa taxa de concepção após o descongelamento (SUDANO, 2011).

O maior conteúdo lipídico encontrado nos embriões produzidos *in vitro* tem sido relacionado com a menor resistência ao congelamento (SEIDEL JR, 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2011; RIZOS *et al.*, 2003; BARCELÓ-FIMBRES, 2009).

O motivo pelo qual os embriões PIV acumulam lipídios de forma excessiva ainda não está totalmente elucidado, porém o soro fetal utilizado nos meios de produção *in vitro* de embriões pode conter fatores que aumentam a expressão de enzimas lipogênicas (BARCELO-FIMBRES e SEIDEL Jr, 2007), ou ainda, devido à sua elevada concentração de glicose, pode ocasionar um acúmulo de lipídios por aumentar a atividade da via metabólica responsável pela lipogênese (RIZOS, 2003), ocasionando assim alteração no metabolismo embrionário, fenômeno denominado *crabtree effect* (BAVSTER, 1995).

Na tentativa de se reduzir o conteúdo lipídico e melhorar a congelabilidade dos embriões produzidos *in vitro*, alternativas como a adição de ácidos graxos poli-insaturados aos meios de cultivo têm sido estudadas (PEREIRA *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2008; AI DARWICH *et al.* 2010).

Dentre estes, o ácido linoleico conjugado à BSA (CLA, *trans* 10, *cis* 12) tem tido destaque (STINSHOFF *et al.*, 2013). Entre os efeitos do uso de CLA na PIV destacam-se a alteração na composição dos ácidos graxos durante a maturação *in vitro*, a inibição da expressão de genes que codificam enzimas lipogênicas, a redução no conteúdo lipídico e o aumento na criorresistência, principalmente quando se utiliza meios contendo soro fetal bovino (LEE *et al.*, 1998; BAUMGARD *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2007; AI DARWICH *et al.*, 2010). No entanto, os mecanismos pelos quais o CLA atua na redução do conteúdo lipídico, e consequentemente na melhoria pós-criopreservação ainda não são totalmente estabelecidos, mas possivelmente estariam associados à alteração na expressão de genes ligados ao metabolismo de lipídios. Mas, ainda são escassos estudos específicos nesta linha.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição do CLA em diferentes momentos do cultivo na produção, na criorresistência e no conteúdo lipídico de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do CLA sobre a produção *in vitro* e taxa de clivagem de embriões bovinos;
- Quantificar o conteúdo lipídico pelo método vermelho do Nilo em embriões bovinos cultivados na presença e na ausência do CLA;
- Avaliar o efeito do CLA sobre a congelabilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

O sistema padrão de produção *in vitro* de embriões utilizado pela maioria dos laboratórios que trabalham com reprodução assistida utiliza microgotas de meios sob óleo mineral (FELTRIN, 2010). Este sistema proporciona ambiente que visa simular o ambiente *in vivo*, no qual o embrião seria produzido fisiologicamente.

Neste sistema os meios utilizados para maturação, fertilização e cultivo possuem papel fundamental, pois precisam fornecer os substratos como aminoácidos e vitaminas para que ocorra o desenvolvimento do embrião de forma satisfatória. Porém, nos estudos iniciais para produção *in vitro* de embriões utilizando meios simples, os embriões paravam o desenvolvimento no estágio entre 2 e 16 células, fato este denominado bloqueio do desenvolvimento embrionário (VARAGO *et al.*, 2008). Atualmente cerca de 80% dos oócitos que iniciam o processo de maturação e posteriormente passam pela fertilização chegam pelo menos ao estágio de 2 células e 30 a 40% chegam ao estágio de blastocisto ao final do processo de produção *in vitro* (LONERGAN e FAIR, 2014)

Existem sistemas em que os embriões são produzidos *in vitro* e cultivados *in vivo*, utilizando sistema de cultivo em tuba de ovelhas e tem demonstrado um aumento significativo na qualidade embrionária. Tal fato foi citado em diferentes trabalhos que demonstraram uma melhora na qualidade morfológica e maior sobrevivência pós-criopreservação, chegando a resultados semelhantes aos embriões produzidos completamente *in vivo* (LAZARRI *et al.*, 2010; RIZOS *et al.*, 2002). Tais achados são evidências consideráveis de que o cultivo pós-fertilização é uma etapa crítica na determinação da qualidade embrionária posterior (LONERGAN e FAIR, 2014).

Todavia, por ser um procedimento laborioso o cultivo embrionário em tuba de ovelhas não tem sido muito utilizado atualmente e como alternativa de tentar mimetizar o ambiente *in vivo* têm sido usados aditivos como o soro fetal bovino. O objetivo da adição de SFB é o fornecimento de substrato energético, aminoácidos,

vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados (MUCCI *et al.* 2006).

Os efeitos benéficos do SFB já foram demonstrados por diferentes autores, os quais puderam constatar que o SFB promove uma aceleração no desenvolvimento embrionário e conseqüentemente chegada ao estágio de mórula mais rapidamente (Van WAGTENDONK-DE LEEUW, *et al.* 1997, LAZZARI *et al.*, 2002; LEQUARRE *et al.*, 2003; RIZOS *et al.*, 2003), aumento no número de células por embrião e número de embriões produzidos (HOLM *et al.*, 2002; LAZZARI *et al.*, 2002, GEORGE *et al.* 2008, SUDANO *et al.*, 2011).

Por outro lado, apesar dos benefícios citados, o uso de SFB tem sido associado a alguns problemas como a ocorrência da síndrome do bezerro grande (LAZZARI *et al.*, 2002), o acúmulo excessivo de lipídios (ABE *et al.*, 1999, ABE *et al.*, 2002; MUCCI *et al.*, 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b; SUDANO *et al.*, 2011), a ocorrência prematura da blastocle (HOLM *et al.*, 2002), menor criorresistência (RIZOS *et al.*, 2002; ABE *et al.*, 2002; MUCCI *et al.*, 2006, SUDANO *et al.*, 2011). Adicionalmente existe ainda o problema sanitário, pois o soro aumenta os potenciais riscos sanitários devido à possibilidade de contaminação por vírus, príons ou micoplasma (GEORGE *et al.*, 2008).

O motivo pelo qual ocorre o acúmulo excessivo de lipídios em embriões produzidos *in vitro* na presença de SFB ainda não está totalmente elucidado. No entanto, existem estudos que demonstram os possíveis mecanismos nocivos do SFB. Um deles seria a internalização de lipídios presentes SFB. Sata e colaboradores (1999) avaliaram o conteúdo lipídico do soro fetal e compararam com o conteúdo de embriões produzidos em meio com SFB e livre de SFB. Os autores verificaram que os ácidos graxos que estavam em maior concentração no SFB também apresentaram as maiores concentrações nos embriões cultivados com SFB, o que não ocorreu nos embriões cultivados sem SFB. Entretanto, no referido trabalho não foi possível determinar se esse foi um efeito direto ou um efeito metabólico secundário devido à presença do SFB.

Outra consequência do uso do SFB no cultivo está relacionada à alteração da atividade mitocondrial. Embriões bovinos produzidos *in vitro* apresentam uma menor densidade de volume total de mitocôndrias, que, por consequência, pode gerar o acúmulo lipídico devido à uma redução na -oxidação

dos ácidos graxos, ocorrendo desta maneira um aumento no número de gotas lipídicas no citoplasma (CROSIER *et al.*, 2001, ABE *et al.*, 2002).

Na tentativa de se contornar os possíveis efeitos negativos do SFB e se obter um meio de produção *in vitro* de embriões com a constituição mais controlada e de menor risco de transmissão de patógenos, diversos autores demonstraram ser possível a substituição deste componente pela albumina sérica bovina (BSA) (MINGOTI, 2000). Esta é utilizada como fonte de proteína e também promove efeitos benéficos durante o desenvolvimento embrionário com a sua propriedade de ligação a diferentes componentes do meio, protegendo contra toxinas presentes nos meios de cultura. Também possui a capacidade de quelar metais pesados e equilibrar o pH, e ainda pela sua propriedade surfactante, previne a adesão de células às superfícies plásticas e de vidro (TETZNER, 2008).

Meios que contêm BSA, ainda que livres de ácidos graxos, são considerados semidefinidos, pois podem conter outras proteínas ou lipoproteínas, além de contaminantes (TETZNER, 2008).

Atualmente, diversos trabalhos têm demonstrado ser possível a produção *in vitro* de embriões utilizando meio semidefinido contendo BSA (De La TORRE-SANCHEZ *et al.* 2006a; De La TORRE-SANCHEZ *et al.* 2006b; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL, Jr., 2007a; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL, Jr., 2007b; GEORGE *et al.*, 2008; BARCELÓ-FIMBRES *et al.*, 2009; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL, Jr., 2011; SUDANO *et al.*, 2011). No entanto, nas últimas décadas tem se buscado a utilização de meios quimicamente definidos, em que todos os componentes e as suas respectivas concentrações são conhecidos (FEUGANG *et al.* 2009). Desta maneira, é possível controlar, por exemplo, a concentração de glicose no meio, o que poderia reduzir o conteúdo lipídico, uma vez que a glicose seria o principal precursor de acetil-CoA, molécula usada na síntese de ácidos graxos (NELSON e COX, 2009). Além disso, outro ponto importante deste sistema é a eliminação de possíveis fontes de contaminação viral ou de qualquer outro agente patogênico que poderia ocorrer nos meios em que são adicionados BSA ou SFB (THOMPSON, 2000).

O aditivo preferencial utilizado nos meios quimicamente definidos tem sido o álcool polivinílico (PVA), uma vez que essa molécula oferece atividade

surfactante semelhante à BSA (THOMPSON, 2000). Mas, os resultados de produção de embriões com meios que utilizam PVA têm sido variados.

Milovanov e Herradón (1996) não observaram diferença na produção de embriões bovinos com meios contendo soro, BSA ou PVA. Ao contrário, Jones e Westhusin (1996) comparando meio contendo BSA, PVA e soro fetal bovino concluíram que a produção de embriões foi superior no meio contendo soro, não havendo diferença entre o meio contendo BSA e PVA. Orsi e Leese (2004) observaram uma maior produção de embriões e maior número de células por embrião utilizando meio suplementado com BSA, comparando com meio suplementado com PVA.

Apesar da variação dos resultados quanto à produção de embriões é consenso que embriões produzidos em meios livres de SFB apresentam um menor conteúdo lipídico e maior criorresistência (ABE e HOSHI, 2003; SUDANO et al. 2011, LEESE, 2012).

### 3.2. METABOLISMO ENERGÉTICO DE EMBRIÕES BOVINOS

O metabolismo energético de embriões bovinos vem sendo estudado desde o fim da década de 60 e início dos anos 70. Após as primeiras investigações já foi possível sumarizar alguns pontos fundamentais do metabolismo embrionário, como por exemplo, o uso do piruvato como principal fonte de energia e a baixa atividade da via glicolítica nos primeiros dias de desenvolvimento com posterior aumento de atividade desta via pós-compactação (LEESE, 2012). Quase 40 anos depois estas afirmações permanecem notavelmente precisas.

Infelizmente o conhecimento do metabolismo embrionário não se desenvolveu tão rapidamente quanto se esperava. Tal fato se deu pela dificuldade metodológica de realizar pesquisa com embriões e oócitos, principalmente pelo fato das metodologias enzimáticas, avaliação e quantificação de transdução de sinal e proteômica terem sido desenvolvidas para utilização em tecidos somáticos, que possuem fontes virtualmente ilimitadas de células, diferentemente dos embriões e oócitos (LEESE, 2012). Apesar destas limitações hoje já é possível o uso de

ferramentas que avaliem o metabolismo embrionário para presumir com maior eficácia a viabilidade do embrião antes da transferência, sendo esta técnica usada inclusive em embriões humanos (HEO *et al.*, 2012; GARDNER e WALE, 2013).

O desenvolvimento de embriões *in vivo* ocorre em um microambiente complexo contendo diferentes substratos, como glicose, piruvato, lactato, aminoácidos, macromoléculas e íons. Muitas dessas moléculas são utilizadas para suprir as necessidades energéticas e metabólicas dos embriões (HOUGHTON e LEESE, 2004).

Uma quantidade significativa de energia é necessária para a realização dos processos envolvidos no desenvolvimento embrionário, que compreendem desde a maturação, a fertilização, e o desenvolvimento do zigoto a blastocisto. Em uma semana o embrião precisa ativar seu próprio genoma, realizar uma intensa proliferação de blastômeros, aumentar a síntese proteica, a compactação e a formação da blastocele para seu crescimento. A fim de atender esta demanda, a geração de energia e a formação de moléculas de ribose para biossíntese têm que ser eficientes (STEEVES e GARDNER, 1999, STEEVES *et al.*, 1999).

A produção de um meio de cultivo *in vitro* de embriões que ofereça condições semelhantes do ambiente *in vivo* tem sido tema de inúmeros estudos, uma vez que as condições atuais ainda não permitem uma produção embrionária eficiente, devido em parte às alterações do metabolismo energético dos embriões produzidos nesse sistema. Por esse motivo, estes embriões apresentam diferenças morfológicas, metabólicas, na expressão gênica e capacidade de desenvolvimento pós-transferência, quando comparados aos embriões produzidos *in vivo* (HASLER, 2000, KHURANA e NIEMANN, 2000, LAZZARI *et al.*, 2002).

De acordo com Khurana e Niemann (2000), as condições dos meios de produção de embriões apresentam condições subótimas, o que poderia ser uma possível causa dessas diferenças entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. De acordo com Gardner e Wale (2013), isso ocorre devido a um maior fornecimento de substrato energético para manutenção da homeostase e das funções celulares, como piruvato, glicose, lactato e aminoácidos, do que metabólitos necessários para biossíntese de constituintes celulares e moleculares que seriam excretados para o meio extracelular.

### 3.2.1. Vias metabólicas

A energia celular é produzida sob a forma da ATP a partir de diferentes vias metabólicas e utilizando diferentes substratos energéticos. O ATP não pode ser armazenado, por isso, o mecanismo biossintético de ATP deve estar em perfeita sincronia para atender as demandas específicas de cada processo (STEEVES e GARDNER, 1999). Caso haja um excesso de substrato energético a célula irá realizar a biossíntese de lipídios como forma de armazenamento de energia (NELSON e COX, 2009).

O ATP é produzido por apenas dois mecanismos metabólicos: a glicólise e a oxidação fosforilativa. A glicólise ocorre no citoplasma celular e envolve a conversão de uma molécula de glicose em duas de piruvato. Nesse processo há a formação de 4 moléculas de ATP e o consumo de 2, com um saldo, portanto, de 2 moléculas de ATP. Na presença de oxigênio o piruvato entra na mitocôndria e é metabolizado via ciclo do ácido tricarboxílico, resultando na produção de 34 moléculas de ATP, H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>. Para que o ciclo do ácido tricarboxílico ocorra são necessárias moléculas de NAD<sup>+</sup> e FAD, que são geradas a partir do processo de oxidação fosforilativa. NADH e FADH<sub>2</sub> transferem elétrons para o oxigênio por meio da cadeia de transporte de elétrons, resultando em ATP, NAD<sup>+</sup> e FAD. Desta maneira, a taxa de atividade do ciclo do ácido tricarboxílico e conseqüentemente a produção de ATP é comandada pelo próprio requerimento de ATP da célula (NOJI *et al.*, 1997; NOJI e YOSHIDA, 2001; CHEN *et al.*, 2004).

Ao longo do desenvolvimento *in vitro* os embriões apresentam diferentes necessidades metabólicas e por conseqüência, diferentes substratos serão usados nos diferentes estádios de desenvolvimento (KHURANA e NIEMANN, 2000). No período pré-compactação os embriões são dependentes da fosforilação oxidativa para produção de ATP. Por outro lado, após a compactação e blastulação, ocorre uma maior contribuição da glicólise na produção de energia, sendo necessária uma maior quantidade de glicose, já que a demanda por ATP também será maior (Figuras 1 e 2).

Embora o consumo de glicose aumente rapidamente durante o período de formação do blastocisto, esta via é responsável por apenas 17% do ATP produzido,

enquanto a oxidação do piruvato contribui com cerca de 40%. O restante do ATP produzido é originado pela oxidação de outras fontes energéticas, ainda não definidas, podendo ser inclusive a oxidação de ácidos graxos (HOUGHTON e LEESE, 2004), fato este descrito também em outras espécies (LEESE, 1995; HARVEY, 2007).

Steeves e colaboradores (1999), avaliando o consumo de glicose e piruvato em embriões bovinos, verificaram uma diferença significativa desses substratos entre os estádios iniciais de desenvolvimento e o estágio de blastocisto. O estágio de blastocisto chega a consumir cerca de 5 e 3 vezes mais de glicose e piruvato, respectivamente, quando comparado aos estádios anteriores.

Mesmo assim, durante todo o período pré-implantação a captação e utilização de glicose são essenciais para a sobrevivência do embrião e o seu desenvolvimento, ou seja, desde a fertilização até o estágio de blastocisto o metabolismo energético do embrião depende da glicose e o decréscimo na captação nesse período pode comprometer o desenvolvimento embrionário (RILEY e MOLEY, 2006).

Neste sentido, tem sido proposto que os meios de cultivo embrionário *in vitro* sejam produzidos com o intuito de reduzir, mas não cessar completamente, a glicólise durante o período pré-compactação e em seguida favorecer a retomada da atividade glicolítica, sugerindo a remoção da glicose dos meios de cultivo embrionário, no entanto, a ausência de glicose poderia ocasionar a redução de substratos como a ribose e NADPH produzidos pela via das pentoses (THOMPSON, 2000).

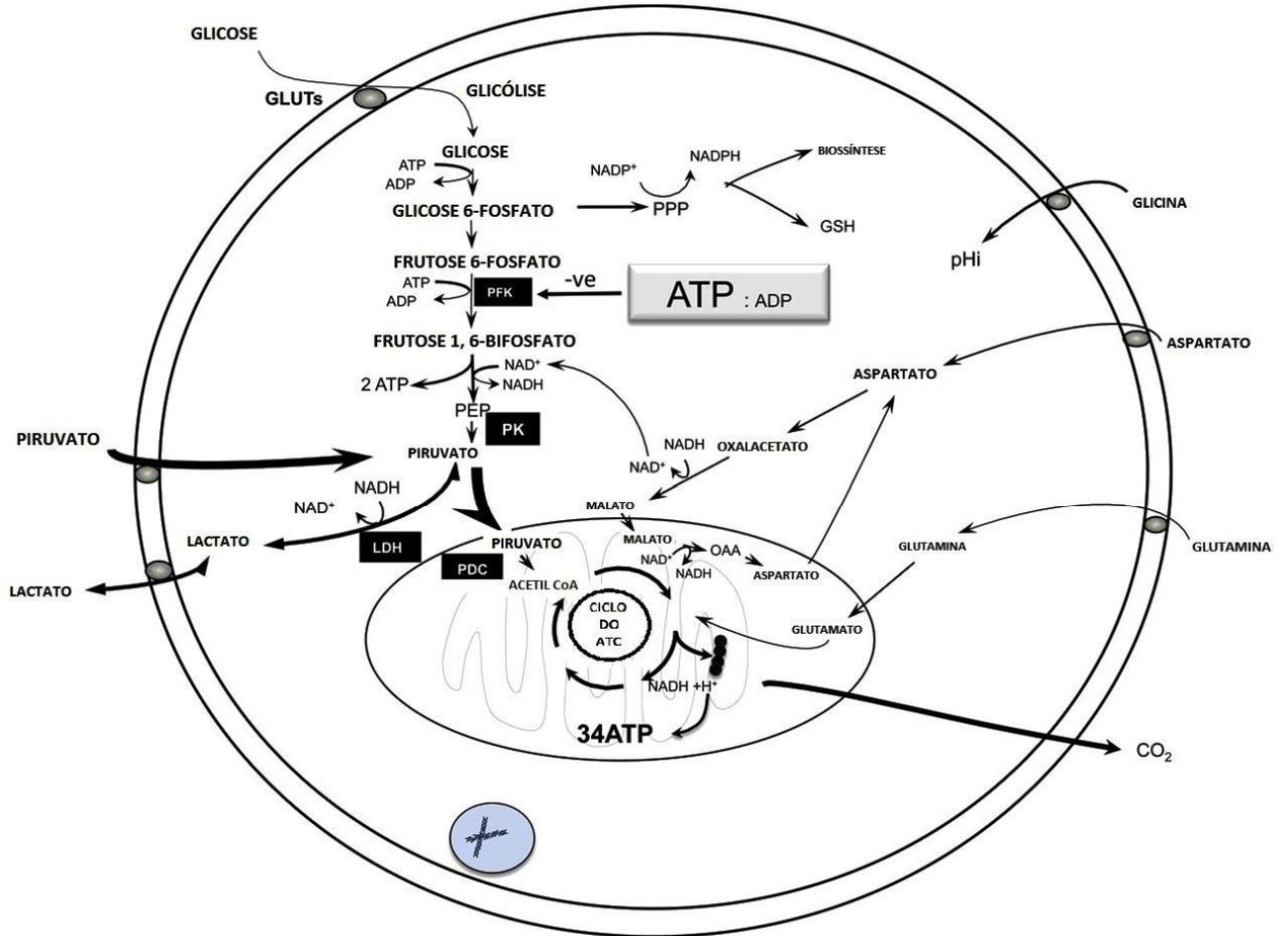


Figura 1 - Metabolismo do oócito pró-nuclear e embrião nos estágios iniciais de clivagem. O oócito pós-ovulação ainda possui células do *cumulus*, que produzem ativamente lactato a partir da glicose e lactato, elevando as concentrações de lactato intracelular e reduzindo as concentrações de glicose. O embrião nos estágios iniciais é caracterizado por uma elevada relação ATP/ADP, que por sua vez inibe a fosfofrutoquinase, limitando assim o fluxo de glicose através da via glicolítica antes da compactação. Adaptado de Gardner e Wale, 2013.

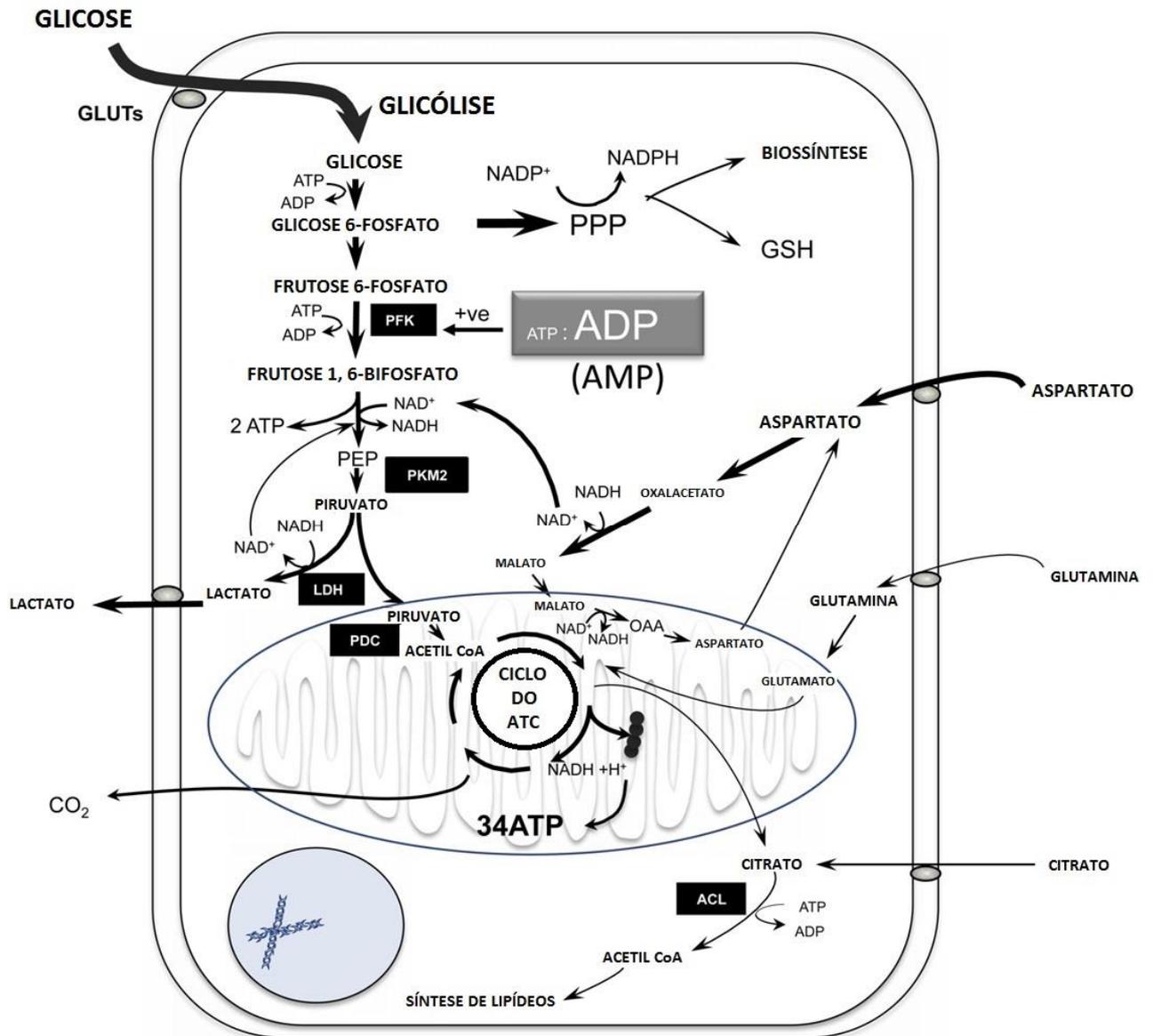


Figura 2 - Metabolismo do blastocisto. Após a compactação o embrião aumenta muito o consumo de oxigênio e a capacidade de consumir glicose como fonte de energia. O aumento da utilização de glicose reflete um aumento da demanda por precursores biossintéticos. Conseqüentemente há uma redução na relação ATP/ADP e um aumento concomitante de ADP exercendo um efeito positivo sobre a fosfofrutoquinase, facilitando desta maneira um maior fluxo de glicose via glicólise. Ao invés de oxidar a glicose consumida o blastocisto exibe altos níveis de glicólise aeróbica. Embora isso possa parecer energeticamente desfavorável ele garante que a via das pentoses esteja sempre com substrato disponível para sua ativação, permitindo assim que a biossíntese ocorra de forma satisfatória.

O metabolismo da glicose através da via das pentoses é necessário para a produção de NADPH, molécula usada na formação de nucleotídeos como DNA e RNA. Desta maneira, a via das pentoses é de grande importância durante o desenvolvimento embrionário inicial, principalmente em estádios pós-compactação onde a biossíntese é ainda maior (GARDNER e WALE, 2013).

A mudança no uso da glicose como substrato primário pode ser decorrente de modificações biossintéticas e de desenvolvimento, relacionadas à formação do fluido da blastocela e à preparação para o processo de implantação (LIMA e SOUZA, 2009), a qual coincide com a máxima expressão de cinco membros da família dos facilitadores de transporte de glicose - GLUT. O GLUT-1 é expresso no oócito e no embrião em todas as fases de desenvolvimento (PANTALEON *et al.*, 2001). Os GLUT-2, GLUT-3 e GLUT-5 são ativados no estágio embrionário de oito células, enquanto o GLUT-8 é observado apenas no estágio de blastocisto (RILEY e MOLEY, 2006).

Segundo Riley e Moley (2006), altas concentrações de glicose podem reduzir a expressão gênica de GLUT-1, e por consequência gerar uma maior taxa de apoptose, induzida por uma alteração na concentração de glicose intracelular. Adicionalmente, alterações nas concentrações de glicose geradas pela menor expressão de GLUT-1 poderiam ocasionar uma alteração da via metabólica embrionária, podendo, portanto, aumentar o acúmulo de lipídios.

Gardner e colaboradores (2000, citados por Sudano, 2010) verificaram que o metabolismo da glicose é anormal em embriões produzidos *in vitro*. Segundo Bavister (1995), essa alteração é definida como *rabtree effect*, que seria um aumento na metabolização da glicose via glicólise, ocorrendo, portanto, uma menor participação da via que utiliza a fosforilação oxidativa. Este autor cita ainda que esse efeito não é observado em embriões produzidos *in vivo*, pois, possivelmente, no ambiente fisiológico existiria um inibidor natural da glicólise.

Esse aumento de utilização de glicose via glicólise ocasionado pelo *rabtree effect* em embriões produzidos *in vitro* poderia comprometer a capacidade de desenvolvimento embrionário (KISCHER *et al.*, 1999), pois desta maneira uma quantidade muito pequena de glicose iria para a via da pentose-fosfato. Esta via é de grande importância para a biossíntese embrionária, fornecendo, por exemplo, nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADPH), que é uma molécula

importante na síntese de membranas celulares e de enzimas responsáveis pela síntese de ácidos nucleicos (NELSON e COX, 2005; GARDNER e WALE, 2013).

Além do comprometimento da biossíntese embrionária o *crabtree effect* pode gerar um acúmulo de lipídios devido ao aumento na concentração de precursores de ácidos graxos, como a Acetil-CoA (RIEGER, *et al.*, 2002).

Na figura 3 é possível avaliar a evolução temporal das mudanças metabólicas de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário (CHANSON *et al.*, 2011).

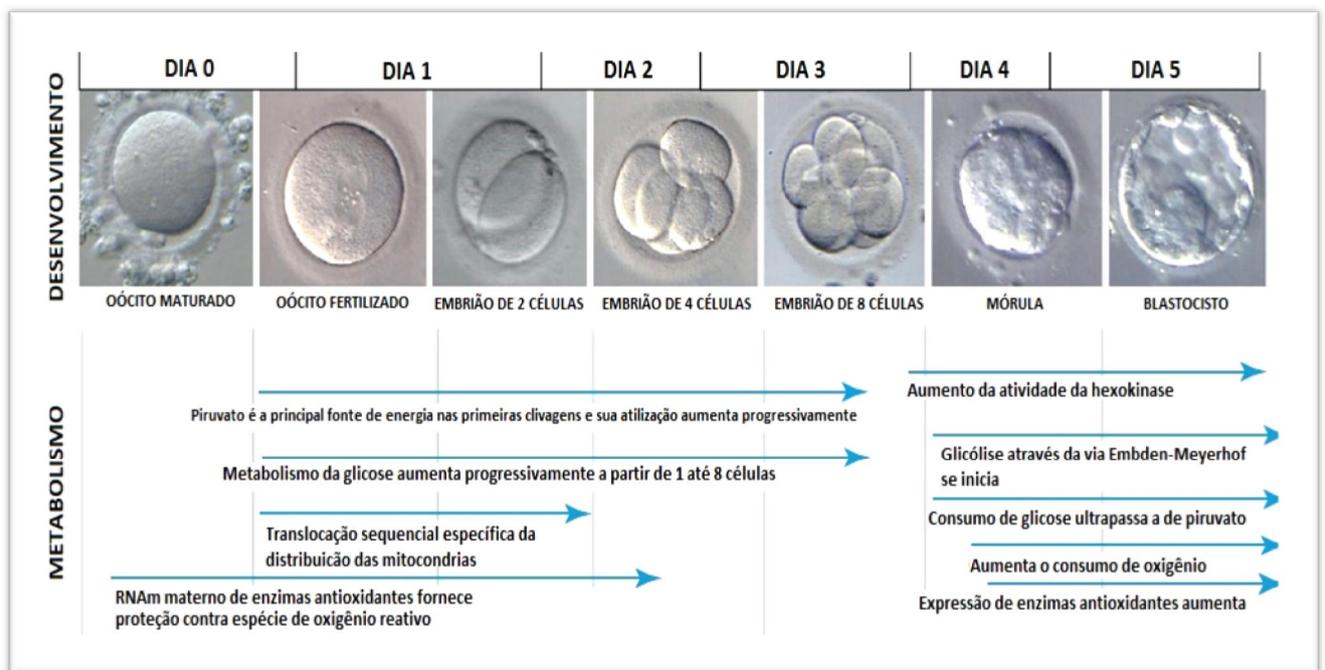


Figura 3 - Metabolismo e desenvolvimento de embriões pré-implantacionais. Momentos específicos baseados em embriões murinos, podendo variar conforme a espécie. Adaptado de Chanson *et al.*, 2011.

### 3.3. METABOLISMO DE LIPÍDIOS

Nas células de mamíferos os ácidos graxos são sintetizados no citoplasma celular a partir da acetil-CoA. No entanto, sua síntese não é simplesmente uma reação de degradação de forma reversa. Trata-se de um novo

conjunto de reações, envolvendo uma série de enzimas específicas (NELSON e COX, 2009).

A Acetil CoA é produzida no interior da mitocôndria através de dois mecanismos: 1) beta oxidação de ácidos graxos e 2) conversão de piruvato em Acetil CoA pela ação da piruvato desidrogenase e diidrolipoil transacetilase. Quando a cadeia de transporte de elétrons e a oxidação fosforilativa estão em baixa atividade ocorre um acúmulo de Acetil CoA no interior da mitocôndria, que é então transportada para o citoplasma celular através de um mecanismo denominado sistema de transporte dos ácidos tricarbóxicos, sob a forma de citrato, que, no citoplasma, é convertido em Acetil CoA novamente (WITTERS e KEMP, 1992) (Figura 4).

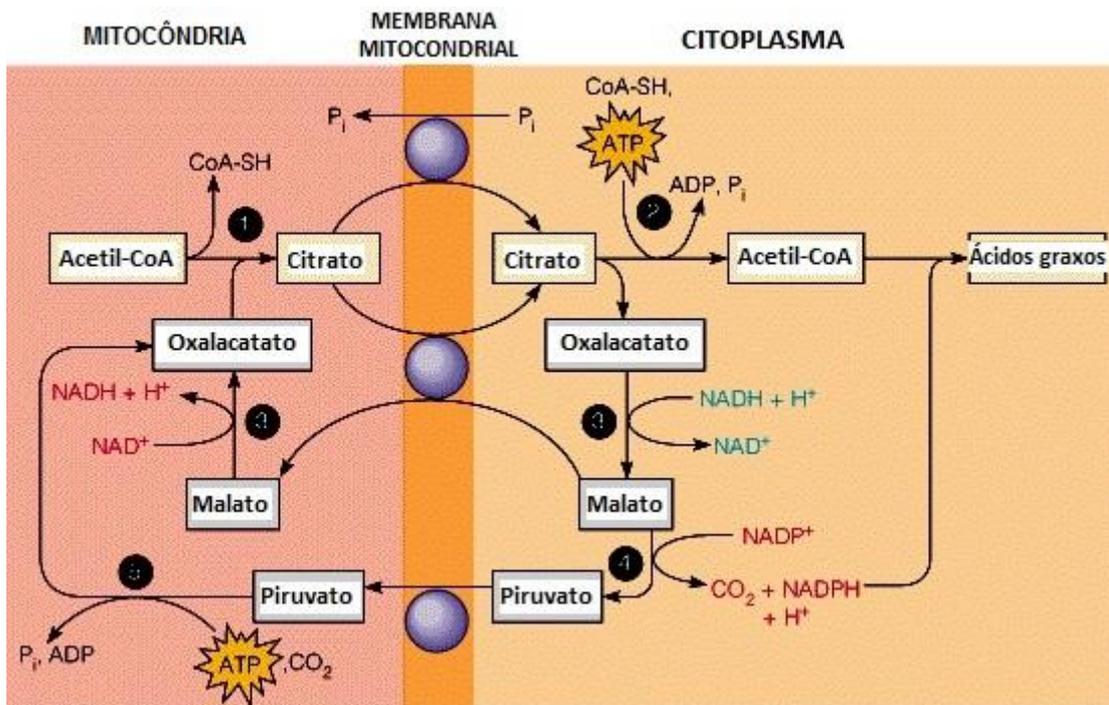


Figura 4 - Transporte da Acetil-CoA através da membrana mitocondrial. Acetil-CoA é utilizada na síntese de citrato quando combinado com o oxaloacetato no interior da mitocôndria. O citrato é então transferido para o citoplasma e convertido novamente a oxaloacetato e acetil-CoA (usando ATP e CoA). Oxaloacetato pode ser reduzido pela malato desidrogenase em malato e NADH. Malato é então convertido em piruvato, que é permeável à membrana mitocondrial e volta ao interior da mitocôndria, onde pode ser convertido em oxaloacetato pela piruvato-carboxilase (juntamente com o íon de bicarbonato e ATP), completando o ciclo.

A primeira reação de formação dos ácidos graxos é catalisada pela enzima acetilCoA carboxilase e, para que esta reação ocorra, é necessário um gasto de energia (Figura 5).

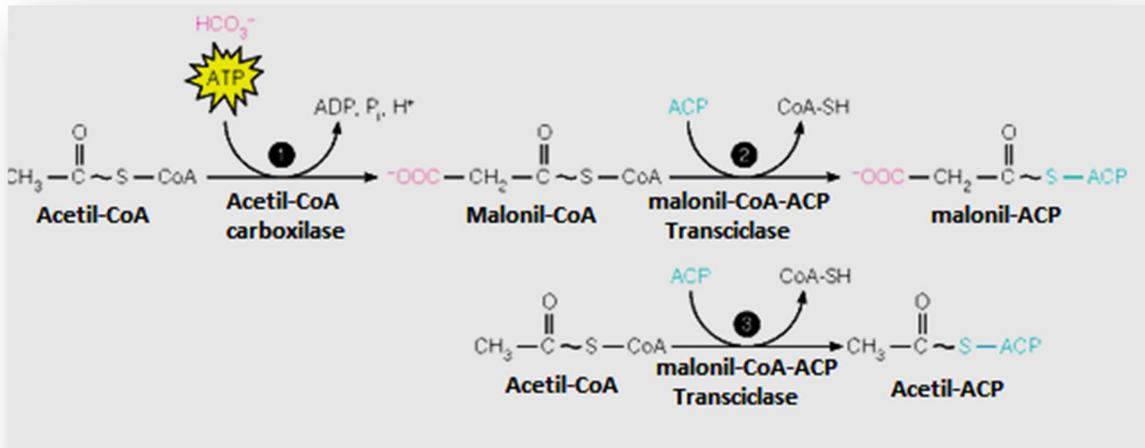


Figura 5 - Primeira reação para a formação de ácidos graxos. A primeira etapa da biossíntese do ácido graxo é catalisada pela acetil-CoA carboxilase. A enzima contém biotina, e adiciona uma molécula de  $\text{CO}_2$  (resultando em um grupo carboxílico) para a extremidade metil da Acetil-CoA.

A atividade da Acetil CoA carboxilase é regulada por diversos fatores, inclusive por hormônios. O glucagon, a epinefrina e a norepinefrina, por exemplo, desencadeiam um processo de fosforilação AMPc dependente, fazendo com que ocorra uma reação que muda sua conformação, perdendo sua atividade. Por outro lado, a insulina estimula a desfosforilação, permitindo assim que a enzima fique ativa. A enzima responsável por fosforilar a Acetil CoA carboxilase é a proteína-quinase dependente de adenosina monofosfato (AMPK) (WITTERS e KEMP, 1992).

Após essa primeira etapa de reações inicia-se o chamado complexo ácido graxo sintase, que corresponde às atividades enzimáticas múltiplas da enzima ácido graxo sintase. Esta enzima multifuncional catalisa sete reações através das quais duas unidades do carbono da malonil-CoA são ligadas entre si, para ao final, formar a palmitoil CoA (KIM, 1997) (Figura 6).

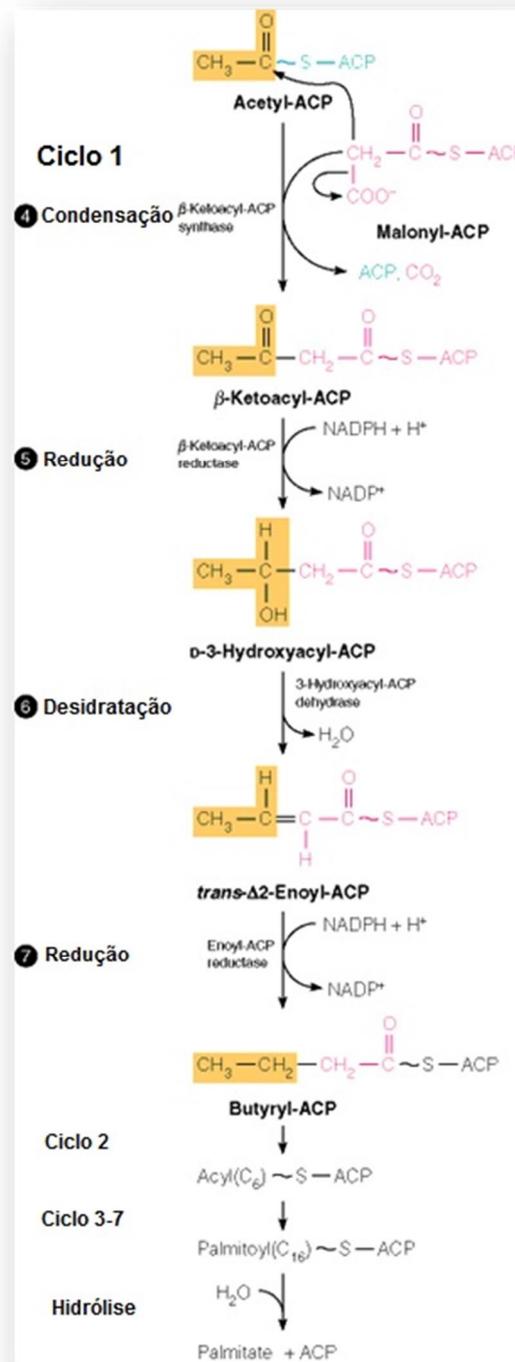


Figura 6 - Síntese de palmitato. Reações catalisadas pelo complexo enzimático denominado Ácido Graxo Sintase. Em todo o processo são gastos 14 NADPH e 7 ATP.

O produto final das reações catalisadas pela ácido graxo sintase é o palmitato, que seria o primeiro ácido graxo formado de muitos outros presentes no organismo, que, para que sejam produzidos, são necessárias reações de alongamento do palmitato. As enzimas responsáveis por esse alongamento são

denominadas elongases e estão presentes nas mitocôndrias e retículo endoplasmático. Em síntese, para a formação do palmitato são necessárias 8 moléculas de Acetil CoA, 14 de NADPH e 7 moléculas de ATP (NELSON e COX, 2009).

O processo de alongamento dos ácidos graxos é idêntico ao que ocorre na formação do palmitato: doação de dois carbonos a partir da malonil-CoA, seguindo-se redução, desidratação e nova redução do produto saturado de 18 carbonos, a estearoil CoA (WITKOWSKI *et al.*, 2004).

Além dos ácidos graxos de cadeia longa outros tipos de lipídios são importantes para o metabolismo celular, principalmente em embriões pré-implantacionais. Entre estes se pode destacar o colesterol, que é precursor de hormônios esteroides, fundamentais no período embrionário. Entretanto, o colesterol é produzido por uma via diferente daquela dos ácidos graxos de cadeia longa, apesar de também usar a Acetil CoA como precursor (ZHANG *et al.*, 2001).

Embora muitas pesquisas tenham sido direcionadas ao metabolismo de carboidratos em embriões pré-implantacionais pouco se sabe sobre o metabolismo intracelular de lipídios (SUTTON-McDOWALL *et al.* 2012).

O citoplasma de embriões e oócitos de algumas espécies, como a suína e a bovina, é rico em lipídios, enquanto que em outras, como camundongos e humanos, não. Essa diferente quantidade no conteúdo lipídico entre espécies pode estar relacionada com o período entre a ovulação e a implantação, ou seja, as espécies cujo embrião demora mais para se implantar teriam uma maior quantidade de lipídio, que poderia ser usado como fonte de energia durante o período pré-implantacional (SUTTON-McDOWALL *et al.* 2012).

Apesar de existirem poucos dados na literatura, há relatos de que o embrião bovino é capaz de usar os lipídios intracelulares como fonte de energia. Gomez e colaboradores (2001, 2002) mostraram que é possível a produção de blastocistos através do uso de corpos cetônicos, evidenciando que embriões podem utilizar produtos da quebra de lipídios para a geração de energia de forma indireta (STURMEY *et al.* 2009).

Além da produção de energia os lipídios e ácidos graxos são precursores de esteroides e são usados na biossíntese de esteroides hormonais e biossíntese de membranas. De acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário podem

ocorrer mudanças na densidade e na utilização dos lipídios pelo embrião. Em bovinos, por exemplo, ocorre um aumento na atividade de lipases conforme avança o processo de maturação no oócito (CETICA *et al.*, 2002).

Por ser um processo complexo, que envolve uma série de enzimas e substratos, a biossíntese de lipídios pode ser influenciada por diferentes fatores, entre eles a expressão gênica de enzimas que catalisam as reações que participam do metabolismo de lipídios. Subsequentemente, a expressão dos genes que sintetizam essas enzimas também está sujeita à influência de diversos fatores, entre eles pode destacar o ambiente em que o embrião se desenvolve (KIM, 1997).

Al Darwich e colaboradores (2010) avaliaram o efeito da adição de diferentes ácidos graxos no meio de cultivo embrionário de bovinos com o intuito de avaliar a expressão gênica de enzimas ligadas ao metabolismo de lipídios. Os autores não encontraram diferenças na produção de embriões entre os grupos avaliados. Por outro lado, foi encontrada uma retro-regulação das enzimas esteroil CoA desaturase e ácido graxo desaturase 2. Tais diferenças podem contribuir para um desbalanço na relação ácido graxo saturado/insaturado. Essa alteração pode explicar, pelo menos em parte, o motivo pelo qual ocorrem as alterações no metabolismo de lipídios em embriões pré-implantacionais produzidos *in vitro* (*Crabtree effect*).

Na tentativa de mitigar esse efeito negativo do *crabtree effect* e melhorar a viabilidade de embriões produzidos *in vitro* criopreservados tem sido proposto a utilização de ácidos graxos poli-insaturados nos meios de cultivo embrionário com intuito de reduzir o conteúdo lipídico.

Dois importantes ácidos graxos têm sido alvo de estudos por serem substâncias biologicamente ativas, são os isômeros posicionais do ácido linoleico conjugado (CLA, com 18 carbonos com duas duplas ligações conjugadas). Entre estes pode destacar o *cis-9, trans-11*, que exerce seu efeito na carcinogênese regulando a expressão das proteínas que controlam o ciclo celular e induzindo apoptose nessas células (EVANS *et al.*, 2000), e o *trans-10, cis-12*, que exerce seu efeito sobre as enzimas que participam da lipogênese e reduzindo a absorção de ácidos graxos (PARIZA *et al.*, 2001).

### 3.4. ÁCIDO GRAXO LINOLEICO CONJUGADO (CLA)

O ácido graxo linoleico conjugado (CLA) é um ácido graxo de 18 carbonos com duas duplas ligações conjugadas (Figura 7). Os seus isômeros mais estudados são *cis* 9, *trans* 11 CLA e *trans* 10, *cis* 12 CLA, sendo que suas atividades biológicas diferem entre si. O efeito na composição corporal e no metabolismo lipídico de células em cultura é induzido pelo *trans* 10, *cis* 12, e o crescimento e a eficiência alimentar parecem estar mais relacionados com o *cis* 9, *trans* 11 (Pariza *et al.*, 2000).

Inicialmente, o interesse científico no CLA limitava-se a microbiologistas que estudavam a bio-hidrogenação do ácido linoleico no rúmen. Em 1987, porém, Ha *et al.* observaram que o CLA era capaz de inibir neoplasia epitelial em camundongos. Desde então, inúmeros efeitos benéficos têm sido atribuídos ao CLA, incluindo a inibição da carcinogênese, a modulação do sistema imune (MILLER *et al.*, 1994; YANG e COOK, 2003), a inibição da aterosclerose (KRITCHEVSKY *et al.*, 2000; MITCHELL e McLEOD, 2008), da diabetes (HOUSEKNECHT *et al.*, 1998; RYDER *et al.*, 2001), o aumento do crescimento (CHIN *et al.*, 1994; BEE, 2000) e da eficiência reprodutiva (DE VETH *et al.*, 2009).

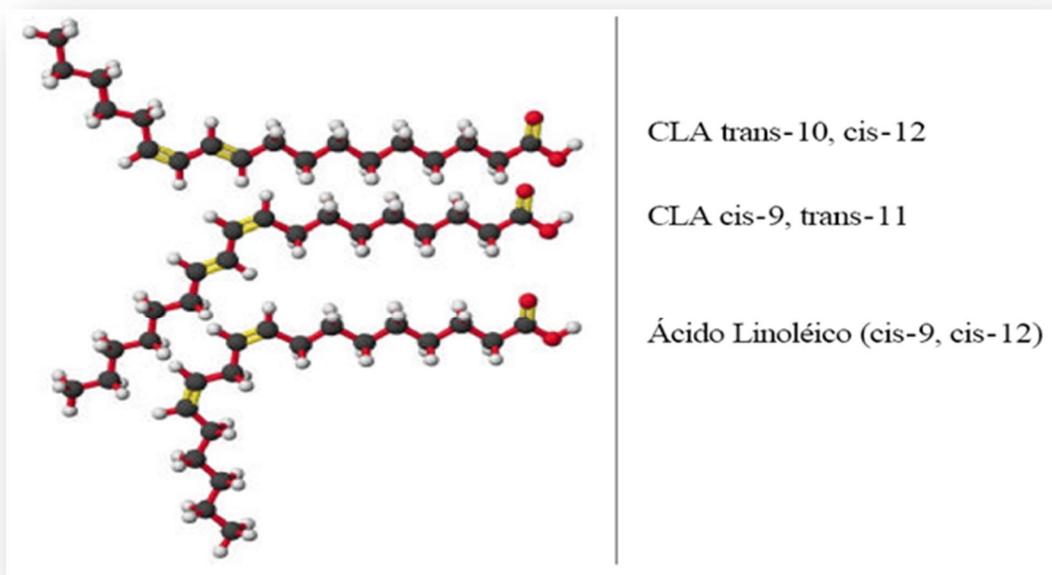


Figura 7 - Estrutura dos isômeros do CLA *trans*-10, *cis*-12; *cis*-9, *trans*-11 e ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12). Adaptado de Pariza *et al.* (2001).

O CLA induz modificações no perfil de ácidos graxos, seja no conteúdo de triglicerídeos, ou diretamente nos níveis de ácidos graxos saturados ou insaturados provavelmente pela inibição da expressão de genes de proteínas transportadoras que carregam glicose para dentro das células (GLUT-4) (Takahashi *et al.*, 2002); que codificam a síntese de enzimas lipídicas (ácido-graxo sintetase; Acetil-Coa sintetase; Acetil-Coa carboxilase; glicerol-fosfato-aciltransferase; acilglicerol-fosfato-aciltransferase) (Piperova *et al.*, 2000; Baumgard *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004); assim como inibem a atividade da lipoproteína lipase (PARK *et al.*, 2000).

Em mamíferos a mobilização do depósito de triglicerídeos ocorre por ação da lipase dos adipócitos (LHS) que hidrolisa os triglicerídeos (TG) a ácidos graxos (AG) e glicerol, processo esse denominado lipólise. Essa enzima estimula a lipase lipoproteica (LPL), localizada na parede dos capilares, que hidrolisa os triacilgliceróis extracelulares e libera ácidos graxos, possibilitando que estes sejam então captados pelas células. Uma série de estudos sugere que o CLA altera o metabolismo lipídico induzindo a lipólise. Park *et al.* (1997) demonstraram que adipócitos murinos tratados com CLA tiveram 22% mais liberação de glicerol quando comparados ao grupo controle. Baumgard *et al.* (2000) relataram que as taxas de ácidos graxos não esterificados foram aumentadas no plasma de vacas tratadas com CLA.

Além do possível efeito do CLA na lipólise, existem indícios de que esta substância estimula também a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Para sua oxidação os AG são ativados e transportados para a matriz mitocondrial das células. A ativação ocorre sob a ação da enzima acil-CoA-sintetase. Os radicais acila atravessam a membrana mitocondrial ligados a carnitina. Foi demonstrado que o CLA, *t-10, c-12* estimula a atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT), enzima mitocondrial que promove o transporte dos ácidos graxos de cadeia longa através da membrana, para serem então oxidados (PARK *et al.*, 1997).

A síntese de gordura pode ocorrer por duas vias bioquímicas diferentes: 1) reesterificação de ácidos graxos pré-formados; 2) síntese *de novo*. A primeira envolve a síntese de triglicerídios realizada através da reesterificação do glicerol e de mono ou diglicerídios com ácidos graxos pré-formados provenientes da dieta. A segunda via envolve a síntese de ácidos graxos que ocorre em sua maior parte a partir dos carboidratos da dieta. Nos animais domésticos (exceto em aves), a síntese *de novo* de lipídios ocorre no próprio tecido adiposo (Bauman e Davis, 1975) e

envolve as enzimas lipogênicas principalmente a Acetil-Coa Carboxilase (ACC) e o Ácido Graxo Sintase (FASN).

A ACC catalisa a síntese do malonil-CoA em uma reação irreversível que dá início à biossíntese de ácidos graxos. Estudos mostram que a expressão de RNAm da ACC pode ser reduzida em até 72% (TSUBOYAMAKASAOKA *et al.*, 2000) em células de camundongos (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000) e de bovinos (BAUMGARD *et al.*, 2002) pelo *t10, c12* CLA.

O complexo FASN é um dímero, composto por dois monômeros idênticos, cada um contendo sete atividades enzimáticas. A FASN é imprescindível na síntese *de novo* de ácidos graxos, pois catalisa múltiplas reações que culminam com a incorporação de uma unidade de dois carbonos na cadeia de ácidos graxos em formação, até que se forme o ácido palmítico (16:0). O CLA mostrou ser capaz de reduzir a expressão de RNAm deste complexo em até 88% em diferentes espécies e tecidos (TSUBOYAMA-KASAOKA *et al.*, 2000; BAUMGARD *et al.*, 2002).

Como a membrana do adipócito é pouco permeável a glucose, estas células dependem da difusão facilitada para a entrada deste nutriente. Portanto, além da atividade das enzimas como ACC e FASN, outro sistema que pode ser alterado é o de transportadores de glucose na membrana celular (BAUMAN e VERNON, 1993). TAKAHASHI *et al.* (2002) relataram redução nos transcritos da glucose-4 (Glut-4), proteína transportadora da glicose para o interior da célula, no tecido adiposo marrom e branco de camundongos que receberam suplementação de CLA na dieta.

### 3.5. UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO LINOLEICO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

De acordo com Kim e colaboradores (2001), os lipídios desempenham um papel importante nos embriões, participando de ações metabólicas e funcionais, além de servirem como reserva de energia. No entanto, o excesso de lipídios intracelular pode alterar o metabolismo dos embriões, aumentando níveis de estresse oxidativo, além de diminuir a criorresistência (REIS *et al.*, 2003).

O efeito da adição do CLA, *t-10, c-12*, aos meios de cultivo *in vitro* de embriões tem sido avaliado como uma alternativa para o controle do excesso de lipídios observado nos embriões bovinos produzidos *in vitro*, LEE *et al.* (1998) e BAUMGARD *et al.* (2002) demonstraram que tal condição pode reduzir o acúmulo de lipídios através da redução dos níveis de RNA mensageiros (RNAm) das enzimas lipogênicas, e da abundância de RNAm da esteroil coenzima A dessaturase, que atua na catalização de reações responsáveis pela introdução de duplas ligações em ácidos graxos (SANTANA, 2004).

Pereira e colaboradores (2007) demonstraram pela primeira vez que a suplementação do isômero *trans-10 cis-12* no meio de cultivo na presença de soro reduz o acúmulo de lipídios em embriões bovinos, sem afetar a taxa de clivagem e produção *in vitro* de blastocistos, demonstrando um aumento na capacidade dos embriões de manterem a sua integridade e voltarem a expandir após a criopreservação.

O efeito benéfico do CLA pode ser explicado pelo aumento da fluidez da membrana plasmática (nível de insaturação) devido à incorporação do ácido graxo linoleico conjugado (ácido graxo poli-insaturado) na membrana dos blastômeros durante o cultivo. O ácido graxo conjugado induz modificações no perfil de ácidos graxos, seja no conteúdo de triglicerídeos, ou diretamente nos níveis de ácidos graxos saturados ou insaturados provavelmente pela inibição da expressão de genes que codificam a síntese de enzimas lipogênicas, assim como inibem a atividade da lipoproteína lípase (DARWICH *et al.*, 2010), sendo esta caracterizada como principal enzima mediadora do consumo de triglicerídeos pelos tecidos e pelas células (GUEDES E GUEDES, 1998). Dessa forma, o aditivo poderia contribuir para o aumento da resistência embrionária à criopreservação.

O CLA *trans-10, cis-12*, exerce seu efeito sobre as enzimas que participam da lipogênese reduzindo a absorção de ácidos graxos, dessaturação destes, síntese e secreção dos triglicerídeos (PARIZA *et al.*, 2000). Adicionalmente, Takahashi e colaboradores (2002) relataram redução nos transcritos proteína transportadora da glicose-4 (Glut-4) para o interior da célula, no tecido adiposo marrom e branco de camundongos que receberam suplementação de CLA na dieta.

Recentemente, Darwich e colaboradores (2010) verificaram o efeito de diferentes ácidos graxos na expressão gênica de embriões produzidos *in vitro*. Os

autores concluíram que a adição de CLA *trans-10, cis-12*, ácido linoleico (C18:3) e ácido decohexaenoico (DHA, C22:6) promoveram *down regulation* na expressão de RNAm de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios em embriões com 7 e 8 dias pós-fertilização, indicando uma alteração no balanço de ácidos graxos saturados/insaturados, o que pode gerar por consequência uma alteração na fluidez da membrana. Porém, os mesmos autores não observaram uma diferença significativa na sobrevivência dos embriões criopreservados, cultivados na presença dos diferentes ácidos graxos citados, o que contraria outros achados da literatura (PEREIRA et al.; 2007)

Neste sentido, diante dos resultados contraditórios presentes na literatura são necessários mais estudos que avaliem a utilização de CLA no cultivo de embriões *in vitro* e sua influência na criorresistência.

### 3.6. LIPÍDIOS, MEMBRANAS E O PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO

Os lipídios têm papel crucial no estoque de energia, na estrutura celular e podem modificar as propriedades físicas e a função metabólica das membranas biológicas (Kim *et al.*, 2001).

A membrana plasmática, devido à sua semipermeabilidade, mantém gradiente químico adequado de íons e outros componentes solúveis. Ela é composta de lipídios, proteínas e carboidratos, sendo os lipídios responsáveis pela integridade estrutural. A fluidez da membrana depende da temperatura, do conteúdo de colesterol, e de sua composição lipídica, sendo o comprimento e o grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos de extrema importância. Quanto mais alta a temperatura e quanto maior o número de insaturações mais fluida fica a membrana.

Aparentemente as células regulam a fluidez da membrana ajustando os tipos de ácidos graxos que nela são incorporados. Os lipídios quando refrigerados, tornam-se endurecidos e quebradiços, podendo a integridade e a permeabilidade das membranas serem afetadas nesse processo. Essas modificações físico-

químicas das membranas alteram a dinâmica e conseqüentemente as concentrações intra e extracelulares da água durante a criopreservação.

A membrana plasmática é a organela mais sensível a baixas temperaturas (ARAV *et al.*, 1996) e então, sua constituição lipoproteica determinará seu comportamento durante o resfriamento.

A baixas temperaturas a conformação tridimensional dos canais de membrana se altera e a membrana fica menos fluida. Uma perturbação na fluidez, estrutura e função da membrana plasmática causada pela peroxidação de lipídios pode reduzir a permeabilidade à água e aos agentes crioprotetores, diminuindo a tolerância do embrião ao processo de congelamento. Durante esse processo, as células passam por um estresse de grande importância que é o estresse osmótico. As células e seus compartimentos celulares se tornam maiores e mudam de volume devido ao movimento da água e dos crioprotetores intracelulares. Em vista disso, células que apresentam uma estrutura de membranas mais flexível provavelmente sofrem menores índices de lesões do que aquelas que apresentam membranas mais rígidas. E essas características são reflexos da composição dessas membranas celulares (Seidel Jr, 2006).

O conteúdo lipídico de oócitos e embriões é um importante parâmetro que relaciona a qualidade com a criorresistência. A maioria dos lipídios intracelulares são os triacilgliceróis, os quais representam 88% da massa total de lipídios celulares em embriões *in vitro* contra apenas 40 . 50% em embriões produzidos *in vivo* (CHARPIGNY *et al.*, 2003). Tal excesso lipídico pode causar, além de alteração na fluidez dessas membranas, alteração na função das mesmas, danos no citoesqueleto e nas junções célula-célula, ocorrência de mitocôndrias imaturas, microvilus pequenos e em menor número (Abe *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2008).

A remoção dos lipídios intracelulares por centrifugação aumenta a tolerância a criopreservação dos embriões bovinos *in vitro* (Abe *et al.*, 2002), mas a transferência desses embriões resulta em baixas taxas de prenhez (Diez *et al.*, 2001). A partir desses dados, estudos sobre os mecanismos moleculares da inibição da absorção lipídica e do controle da proliferação celular identificaram moléculas capazes de modular esses eventos nas células de mamíferos.

Essas substâncias promissoras e biologicamente ativas são os isômeros posicionais do ácido linoleico conjugado, o *cis-9, trans-11*, que exerce seu efeito na carcinogênese regulando a expressão das proteínas que controlam o ciclo celular e induzindo apoptose nessas células (EVANS et al., 2000), e o *trans-10, cis-12*, que exerce seu efeito sobre as enzimas que participam da lipogênese e reduzindo a absorção de ácidos graxos (PARIZA et al., 2001). Pereira et al. (2006) demonstraram pela primeira vez que a suplementação do isômero *trans-10 cis-12* no meio de cultivo na presença de soro reduz o acúmulo de lipídios em embriões, sem afetar a taxa de clivagem e produção de blastocisto, além de aumentar a taxa de sobrevivência após o descongelamento.

### 3.7. SENSIBILIDADE DOS EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* À CRIOPRESERVAÇÃO

Várias técnicas e procedimentos foram desenvolvidos para a criopreservação de embriões produzidos *in vivo* com bons resultados, os quais, na maioria dos casos alcançam taxas de gestações em torno de 80 a 90% das obtidas com embriões transferidos a fresco. Por outro lado, a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* tem sido um desafio, pois mesmo com todo o avanço no sistema de produção *in vitro* os índices obtidos pós-criopreservação ainda são muito baixos, com taxas de concepção abaixo de 30% (HASLER, 2014; HASLER, 2003, SEIDEL Jr, 2006).

Os embriões produzidos *in vitro* apresentam uma elevada sensibilidade ao resfriamento e congelamento, provavelmente devido ao seu alto conteúdo lipídico. A utilização do soro fetal bovino no meio de cultivo *in vitro* tem sido responsabilizada pela grande quantidade de lipídios intracitoplasmáticos e conseqüentemente pela menor criorresistência (ABE et al., 2002; RIZOS et al., 2003). Esse conceito foi primeiramente demonstrado por Nagashima e colaboradores (1995), que demonstraram um aumento da criorresistência de embriões suínos após a remoção de gotas lipídicas intracitoplasmáticas de embriões em estádios iniciais de clivagem.

Embriões produzidos *in vitro* contêm mais triglicerídeos e menos lipídios das outras classes (Mc EVOY *et al.*, 2000). Essa diferença, aliada a baixas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados nos fosfolipídios da membrana dos embriões, pode ser responsável pela baixa tolerância à criopreservação (NAGASHIMA *et al.*, 1992).

Já foi demonstrado que embriões fertilizados *in vitro* e cultivados *in vivo* possuem menor conteúdo lipídico e apresentam maior criorresistência do que embriões produzidos totalmente *in vitro*, sugerindo que o acúmulo de lipídio poderia estar associado ao cultivo *in vitro* (LONERGAN *et al.*, 2003; RIZOS *et al.*, 2002). Todavia, o mecanismo pelo qual o acúmulo de lipídio interfere na criopreservação e como ocorre esse maior acúmulo de lipídio ainda não foi totalmente elucidado (SUDANO, 2010).

Além do acúmulo de lipídios existem outras diferenças encontradas nos embriões produzidos *in vitro* que podem contribuir para uma menor criorresistência, entre elas poderia citar alterações no tempo de desenvolvimento (VAN SOOM *et al.*, 1997), metabolismo embrionário (KHURANA & NIEMANN, 2000), expressão gênica (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; LAZZARI *et al.*, 2002) e alterações na morfologia (GREVE *et al.*, 1995).

Diferenças morfológicas entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* têm sido relacionadas à menor capacidade de sobrevivência pós-descongelamento destes últimos (FAIR *et al.*, 2001), os quais apresentam citoplasma mais escuro, blastômeros mais dilatados e de menor densidade (POLLARD & LEIBO, 1993), provavelmente devido à alta relação lipídio:proteína (LEIBO *et al.*, 1995). Tem sido descrito ainda que embriões PIV apresentam grande número de vesículas no espaço perivitelino (Epv) e nas células trofoblásticas. Os blastocistos apresentam debris celulares no Epv e muitos deles mostram debris celulares na blastocele. Uma dramática diminuição das microvilosidades e um reduzido número de desmossomos, comparado àqueles produzidos *in vivo* também são observados. Pequenos espaços intercelulares são vistos circundando as células da massa celular interna e o número de gotas lipídicas é quase o dobro do encontrado em blastocistos produzidos *in vivo* (FAIR *et al.*, 2001).

Diferenças não só no conteúdo, mas também no perfil lipídico, bem como no número de estruturas celulares são relatadas entre embriões produzidos *in vivo*

ou *in vitro*. Os triacilgliceróis representam 88% da massa total de lipídios celulares em embriões *in vitro*, contra apenas 40.50% em embriões produzidos *in vivo* (CHARPIGNY *et al.*, 2003; SEIDEL Jr, 2006).

Ferguson e Leese (1999) reportaram que as concentrações de triacilgliceróis em embriões produzidos *in vivo* permanecem estáveis desde o estágio de duas células até o de blastocisto, enquanto que nos produzidos *in vitro* as reservas de triacilgliceróis podem duplicar no estágio de blastocisto em embriões expostos ao soro fetal (10%v/v), o que poderia influenciar diretamente no resultado de viabilidade pós-criopreservação.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma, exceto aqueles indicados no texto.

### 4.1. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Os embriões foram produzidos de acordo com Pontes *et al.* (2011), com algumas modificações. Resumidamente, foram utilizados complexos *cumulus oophorus* ovócitos (CCOs) aspirados de ovários obtidos em matadouros locais, os quais foram transportados ao laboratório em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%), acrescida de antibióticos (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina). Os CCOs foram aspirados de folículos ovarianos com diâmetro de 3-8 mm e posteriormente meio de manipulação (TCM 199 com sais de Earle, 25mM de HEPES, 10% de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). Somente COCs de grau I e II, contendo três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma uniforme foram utilizados.

Os CCOs selecionados foram mantidos em gotas de 100 µL de meio de maturação (meio 199 com sais de Earle acrescido de 10% de soro fetal bovino, 20 µg/mL de FSH, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina) por 22 h.

Para a fertilização *in vitro* (FIV) foi utilizado sêmen congelado oriundo de uma mesma partida. A seleção dos espermatozoides viáveis foi realizada pela técnica do mini Percoll. Em um tubo de microcentrífuga foram colocados 400 µl de Percoll 90% e acima desse, formando outra camada, 400 µl de Percoll 45%. O sêmen foi depositado na superfície do gradiente e então o tubo foi centrifugado a 600 x g / 10 minutos. Em seguida foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado com 1,0 mL de meio TALP-sp. Foi realizada então, uma segunda centrifugação, a 270 x g / 10 minutos. Finalmente o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado com 100 µl do meio de fertilização (TALP suplementado com 6 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de penicilamina, 1mM de hipotaurina, 25 mM de epinefrina e 0,2mM de piruvato de sódio).

Os CCOs maturados foram lavados duas vezes em meio Talp (Nutricell®) e transferidos para gotas de 100 µL de meio de fertilização, cobertas por óleo mineral. A inseminação (D0) foi realizada pela adição de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL em cada gota, por 18 h.

Após a co-incubação com os espermatozoides, os possíveis zigotos foram desnudados parcialmente, lavados e co-cultivados em meio SOF comercial contendo 5% de SFB (Nutricell®). Durante o cultivo, foram utilizados diferentes tempos de suplementação com CLA (código 92321; 100mM), conforme os tratamentos a seguir: nas primeiras 72h (CLA-I), nas últimas 72h (CLA-F), ou durante todo o período de cultivo *in vitro* (CLA-T). Como controle os embriões foram cultivados *in vitro* nas mesmas condições dos demais tratamentos, sem adição de CLA (CLA-C). No primeiro dia de cultivo também eram preparadas as placas que receberiam os embriões dos tratamentos nas 72 h finais de cultivo. Nestas placas era colocada uma pequena quantidade de células do *cumulus oophorus* em cada gota para que se formasse uma monocamada de células e as condições de cultivo não sofressem alteração entre as primeiras e as últimas 72 h. Os tratamentos foram dispostos nas placas de maneira que o grupo controle nunca estivesse junto com algum tratamento contendo CLA, para evitar um possível efeito de contaminação do meio (Figura 8). Os possíveis zigotos foram distribuídos aleatoriamente entre os diversos tratamentos e cultivados por mais sete dias após a FIV.

Durante todo o experimento os embriões foram mantidos em gotas de 100 L de meio, sob óleo mineral, na incubadora a 38,5 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade. Em cada gota foram colocados entre 20 e 25 oócitos. A taxa de clivagem foi avaliada 48 h (D2) pós-fertilização e a taxa de blastocistos avaliada sete dias (D7) pós-fertilização.

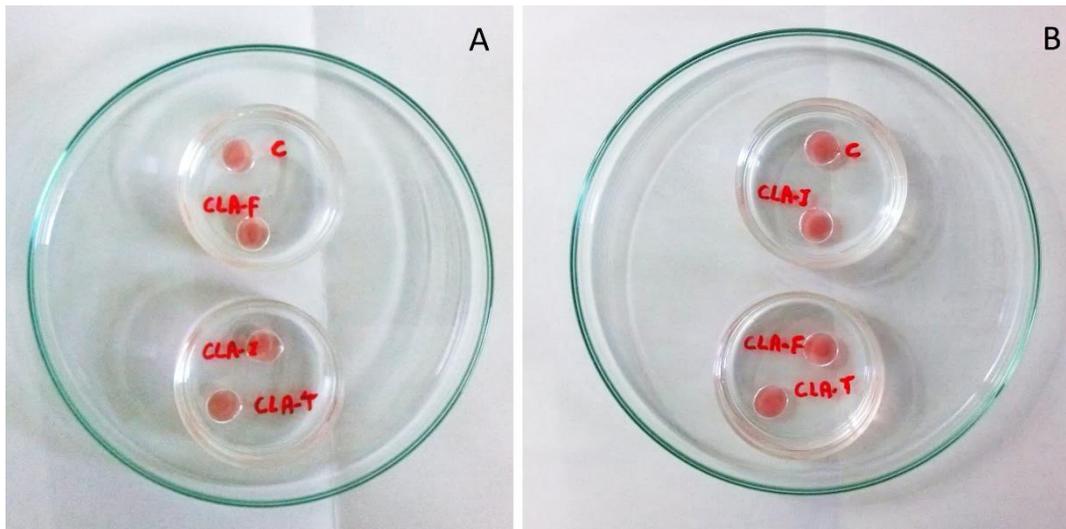


Figura 8 - Distribuição dos tratamentos nas placas de cultivo *in vitro* (CIV). CLA-C: CIV sem a adição de CLA; CLA-I: CIV com CLA nas primeiras 72h; CLA-F: CIV com CLA nas últimas 72h; CLA-T: CIV com CLA durante todo o período. A: Arranjo das placas de cultivo nas primeiras 72 h e B: Arranjo das placas de cultivo nas últimas 72 h.

#### 4.2. CRIOPRESERVAÇÃO

Os embriões foram criopreservados por vitrificação (VAJTA, 1997), para posterior análise pós-descongelamento.

Inicialmente os embriões foram colocados no meio de manutenção (TCM 199-HEPES + 20% SFB), por 1 minuto, sendo em seguida transferidos para a solução de equilíbrio [SV1 - 10% de etilenoglicol (EG) e 10% de DMSO, em meio de manutenção], onde permaneceram por três minutos. Em seguida os embriões foram mantidos por 30 segundos na solução de vitrificação (20% de EG + 20% de DMSO, em meio de manutenção).

Durante os 30 segundos de permanência na solução de vitrificação, os embriões (três por palheta) foram envasados em palhetas abertas estiradas (OPS), (VAJTA *et al.*, 1998) e logo em seguida, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido.

A desvitrificação foi realizada colocando a extremidade fina da OPS na solução de desvitrificação (0,3 M de sacarose em solução de manutenção) e logo após a expulsão dos embriões no meio, estes foram transferidos para outro poço contendo a mesma solução anterior, permanecendo por 5 min. Posteriormente, os

embriões foram transferidos para um terceiro poço com a mesma solução, porém com a concentração de sacarose reduzida pela metade, onde permaneceram por mais 5 min. Finalmente foram transferidos para a solução de manutenção. Todas as soluções de vitrificação e desvitrificação foram mantidas a 39°C.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DA CRIORRESISTÊNCIA

Para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a criorresistência após a desvitrificação os embriões foram cultivados por 48h em meio SOF contendo 5% de SFB (Nutricell ®), sob as mesmas condições de cultivo do grupo controle (CLA-C). As avaliações das taxas de sobrevivência embrionária foram realizadas 24h após o início do cultivo, sendo considerados viáveis os embriões que apresentaram re-expansão da blastocela ou eclosão nesse período. A taxa de eclosão foi avaliada após 48 h de cultivo, contabilizando todos os embriões eclodidos neste período.

#### 4.4. QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS PELA TÉCNICA DO VERMELHO DO NILO

A quantificação de lipídios foi realizada segundo Barceló-Fimbres e Seidel Jr (2011) com pequenas modificações. Os embriões (n=48, 10 a 14 por tratamento) foram fixados em solução salina tamponada e fosfatada (PBS) contendo 10% de formol e 0,01% de PVA. Em seguida foram mantidos *overnight* em gota de 500 µL de PBS contendo 1 µg/mL de Vermelho do Nilo (Sigma N-3013) e então lavados duas vezes em PBS e montados em lâmina e lamínula utilizando glicerol entre estas. Todas as soluções citadas foram armazenadas em ambiente escuro e as avaliações realizadas ao abrigo da luz. Foi utilizado microscópio de epifluorescência (Eclipse TE 300, Nikon) para promover a excitação do corante e visualização do conteúdo lipídico. As imagens foram capturadas utilizando-se uma máquina fotográfica (Nikon

DS Ri1) acoplada ao microscópio e posteriormente analisada individualmente utilizando o software NIS-AR (versão 3.1-Nikon, Japão).

Em cada imagem dos embriões dos diferentes grupos foi avaliada a intensidade de emissão da fluorescência utilizando-se plataforma específica do software, na qual quanto maior a intensidade da fluorescência, maior seria o conteúdo lipídico. Dentro da plataforma foi selecionado o modo de avaliação que utiliza duas linhas transversais entre si, indo de uma borda à outra do embrião, onde em cada ponto de cada uma destas linhas foi quantificada a emissão de fluorescência em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF), variando de 0 (zero) a 255 em cada pixel analisado. Para reduzir o erro experimental uma segunda avaliação foi realizada da mesma maneira, no entanto, o segundo arranjo das duas linhas transversais foi disposto na diagonal, formando um ângulo de 90 graus com o primeiro arranjo. Desta maneira, cada embrião foi avaliado em quatro diâmetros diferentes quanto à emissão de fluorescência. Cada uma das quatro linhas avaliadas em cada embrião gerou de 195 a 531 pontos mensurados, totalizando 74.349 pontos em todo o experimento. Os dados foram exportados para o software Excel (Microsoft®, 2010) para posterior análise estatística. A mesma técnica foi realizada com oócitos no estágio de vesícula germinativa [VG (n=10)] e após 22 h de maturação [MII (n=9)] para comparar o conteúdo lipídico dos embriões produzidos nos diferentes grupos com o conteúdo lipídico dos oócitos (Figura 1).

#### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o ambiente R (versão 2.11.1). Primeiramente os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e aqueles que não apresentaram distribuição normal (conteúdo lipídico) foram analisados utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas das médias. Os dados referentes à taxa de clivagem, produção de embriões, taxa de sobrevivência, taxa de eclosão e expressão gênica foram analisados através de análise de variância e as médias que apresentaram diferença comparadas pelo teste de Tukey. Para

correlacionar os dados de taxa de eclosão, heterogeneidade, conteúdo lipídico e produção de blastocisto foi utilizada a correlação de Pearson. O nível de significância para o efeito avaliado em todas as análises foi de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a utilização do CLA durante todo o cultivo (CLA-T) reduziu o conteúdo lipídico de embriões produzidos *in vitro*, sem afetar a taxa de blastocistos. Não foram observadas diferenças na taxa de clivagem, produção de blastocistos/oócitos (Tabela 1). Tais achados estão de acordo com outros já descritos na literatura. Pereira e colaboradores (2007), avaliando a adição de CLA durante todo o cultivo *in vitro* de embriões, não observaram efeito na produção de blastocisto e taxa de clivagem. Por outro lado, recentemente, foi demonstrado que o cultivo *in vitro* de embriões em meio sem soro fetal bovino (SFB) e suplementado com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de CLA reduziu a taxa de blastocistos (STINSHOFF et al. 2013). No entanto quando o cultivo dos embriões foi feito em meios suplementados com soro fetal, como no presente trabalho, a adição do CLA não alterou a taxa de blastocistos.

**Tabela 1:** Taxa de clivagem e de blastocisto produzidos *in vitro* em meio suplementado com CLA em diferentes momentos do cultivo.

Produção Embrionária				
Tratamento	Oócitos (n)	Repetições	Clivagem (%)	Blastocisto (%)
CLA-C	229	7	67,6 $\pm$ 1,7	33,1 $\pm$ 5,0
CLA-I	250	7	62,8 $\pm$ 4,9	25,6 $\pm$ 3,5
CLA-F	247	7	60,8 $\pm$ 4,8	25,9 $\pm$ 4,6
CLA-T	248	7	60,7 $\pm$ 4,2	32,5 $\pm$ 8,3

CLA-C: CIV sem a adição de CLA; CLA-I: CIV com CLA nas primeiras 72h; CLA-F: CIV com CLA nas últimas 72h; CLA-T: CIV com CLA durante todo o período.

O SFB tem sido amplamente utilizado nos meios de produção *in vitro* de embriões, por diferentes laboratórios com o objetivo de fornecer substrato energético, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados (MUCCI et al. 2006). Seus efeitos benéficos já foram demonstrados por diferentes autores, os quais puderam constatar que o SFB promove uma aceleração no desenvolvimento embrionário e conseqüentemente a chegada ao estágio de mórula mais rapidamente (Van WAGTENDONK-DE LEEUW, et al. 1997, LAZZARI et al., 2002; LEQUARRE et al., 2003; RIZOS et al., 2003), maior número de células por

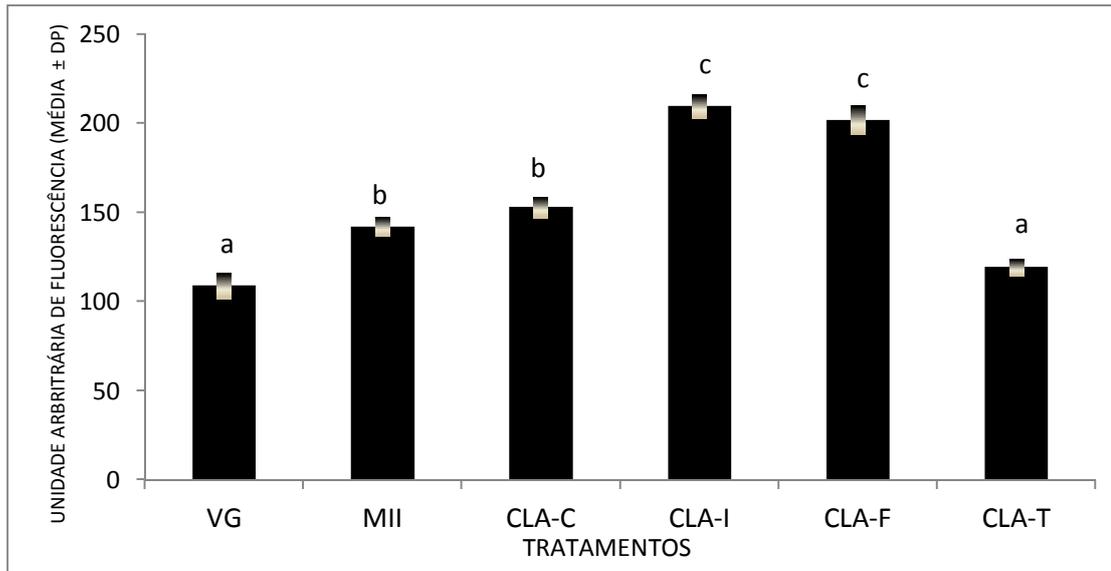
embrião e maior número de embriões produzidos (HOLM *et al.*, 2002; LAZZARI *et al.*, 2002, GEORGE *et al.* 2008, SUDANO *et al.*, 2011).

Por outro lado, apesar dos benefícios citados, o uso de SFB tem sido associado a alguns problemas como a ocorrência da síndrome do bezerro grande (LAZZARI *et al.*, 2002), acúmulo excessivo de lipídios (ABE *et al.*, 1999, ABE *et al.*, 2002; MUCCI *et al.*, 2006; BARCELÓ-FIMBRES e SEIDEL JR, 2007b; SUDANO *et al.*, 2011) e menor criorresistência (RIZOS *et al.*, 2002; ABE *et al.*, 2002; MUCCI *et al.*, 2006, SUDANO *et al.*, 2011).

O motivo pelo qual os embriões produzidos *in vitro* acumulam lipídios excessivamente quando cultivados na presença de SFB, ainda não está totalmente elucidado. SATA (1999) demonstrou que ovócitos maturados em meio contendo SFB apresentaram um aumento no conteúdo lipídico, o que poderia ser devido a internalização de lipídios contidos no próprio soro.

A presença do CLA durante o cultivo *in vitro* alterou o conteúdo lipídico dos embriões bovinos (Figuras 9 e 10). Embriões expostos ao CLA durante as primeiras 72 h (CLA-I), assim como durante as últimas 72 h (CLA-F) do cultivo *in vitro* aumentaram o conteúdo lipídico, quando comparado ao controle. A redução do conteúdo lipídico, no entanto, só foi observada nos embriões mantidos em meio suplementado com CLA durante todo o período do cultivo (CLA-T). Nos embriões desse grupo o conteúdo lipídico não diferiu significativamente dos oócitos VG ( $P > 0,5$ ).

Existe um período marcante de mudança no metabolismo, que coincide com a ativação do genoma embrionário. Até o estágio de 8-16 células os embriões utilizam como fonte energética basicamente piruvato e, após a compactação, o consumo de glicose aumenta acentuadamente (KHURANA e NIEMANN, 2000). Com intuito de estudar uma possível influência deste momento específico do desenvolvimento embrionário no acúmulo lipídico e produção de *in vitro* de embriões foi avaliado no presente trabalho o uso do CLA antes e depois da compactação.



**Figura 9:** Conteúdo lipídico de oócitos no estágio de vesícula germinativa (VG) e metáfase II (MII), e de embriões contendo ou não CLA. CLA-C: CIV sem a adição de CLA; CLA-I: CIV com CLA nas primeiras 72h; CLA-F: CIV com CLA nas últimas 72h; CLA-T: CIV com CLA durante todo o período \*Letras diferentes entre grupos indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Nossos resultados demonstraram que o momento da adição do CLA durante o cultivo *in vitro* não influenciou as taxas de clivagem e de blastocistos. Por outro lado, foi observada uma diferença significativa no conteúdo lipídico em relação ao momento de adição do CLA. Embriões mantidos em meio com CLA durante todo o período de cultivo (CLA-T) apresentaram o menor conteúdo lipídico, sendo semelhante aos dos oócitos no estágio de vesícula germinativa, ou seja, oócitos que não sofreram influência das condições *in vitro* de cultivo. Esta redução no conteúdo lipídico poderia ter ocorrido devido a uma redução na produção de transcritos de enzimas lipogênicas promovidos pelo CLA, o que ocasionaria, por consequência, uma menor produção de lipídios (LEE et al., 1998; DARWICH, et al., 2010). Baumgard et al. (2002) verificaram a ocorrência de redução de produção de transcritos de enzimas lipogênicas em tecido mamário de vacas lactantes após a infusão intramamária de solução contendo CLA. A consequência desta redução da expressão gênica foi um leite com menor conteúdo lipídico. Em embriões bovinos o CLA também afetou a expressão de enzimas ligadas ao metabolismo lipídico (DARWICH, et al., 2010).

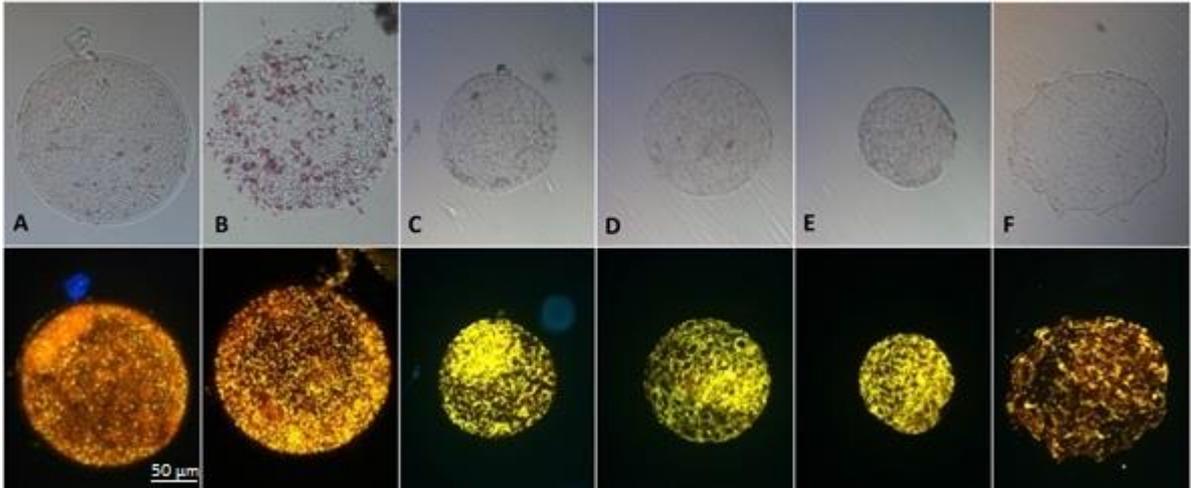


Figura 10 - Oócitos em vesícula germinativa (A), oócitos em MII (B), embriões CLA-C (C), CLA-I (D), CLA-F (E), CLA-T (F) corados com vermelho do Nilo. Campo claro e fluorescência (Aumento 200 x).

Quando os embriões foram cultivados com CLA somente no período pré-compactação (CLA-I) e pós-compactação (CLA-F) foi observado um aumento no conteúdo lipídico, sendo este superior ao do grupo controle. Isso demonstra que a ação do CLA no sistema de produção *in vitro* de embriões é complexo e precisa ser melhor estudado. Provavelmente para que ocorra seu efeito na *down-regulation* de enzimas lipogênicas é necessária sua presença durante todo o cultivo. Ou ainda, seu efeito estaria especificamente entre as 72 h iniciais e finais de cultivo *in vitro*, pois existe um aumento do número de gotas lipídicas citoplasmáticas médias e grandes nos estádios de dois e de oito células até o estágio de mórula, que é o estágio onde ocorre o maior acúmulo lipídico embrionário em meios suplementados com soro (ABE et al., 2002).

O motivo da importância dada pela literatura ao acúmulo lipídico embrionário é a aparente redução da criorresistência embrionária (RIZOS et al., 2002; ABE et al., 2002; MUCCI et al., 2006; BARCELO-FIMBRES & SEIDEL JR, 2007b).

No presente estudo os embriões que permaneceram na presença de CLA durante todo o cultivo apresentaram uma maior taxa de eclosão após a desvitrificação, mostrando assim uma maior criorresistência. Tais achados podem ter ocorrido pela redução do conteúdo lipídico, pelo aumento da fluidez da membrana plasmática (nível de insaturação) devido à incorporação do ácido linoléico conjugado (ácido graxo poli-insaturado) na membrana dos blastômeros, ou ainda pela associação de ambos os efeitos. O CLA induz modificações no perfil de ácidos

graxos, seja no conteúdo de triglicerídeos, ou diretamente nos níveis de ácidos graxos saturados ou insaturados (BAUMGARD et al., 2002). No entanto no presente trabalho não foram realizadas avaliações quanto às classes de lipídios presentes nos embriões.

A taxa de sobrevivência após 24 h da desvitrificação e a taxa de eclosão após 48 h estão demonstradas na Tabela 2. O cultivo dos embriões em meio contendo CLA nas últimas 72 h do cultivo *in vitro* (CLA-F) reduziu significativamente ( $P = 0,0317$ ) a taxa de sobrevivência avaliada 24 h após a desvitrificação em relação aos tratamentos CLA-I e CLA-T ( $P < 0,05$ ), porém não sendo estatisticamente diferente do controle ( $P > 0,05$ ). Entretanto a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com CLA durante todo o período (CLA-T) melhorou a taxa de eclosão dos embriões ( $P = 0,0005$ ).

Nagashima e colaboradores (1995), trabalhando com embriões suínos, demonstraram pela primeira vez que a redução do conteúdo lipídico aumenta a criorresistência. A partir daí uma série de estudos corroboraram tais achados também em bovinos (SEIDEL JR, 2006; SEIDEL Jr e BARCELÓ-FIMBRES, 2011; RIZOS *et al.*, 2003; BARCELÓ-FIMBRES, 2009, SUDANO, 2011; PEREIRA, 2007; PEREIRA, 2008). De maneira semelhante foi encontrado no presente trabalho que os embriões com maior criorresistência apresentaram o menor conteúdo lipídico, mostrando que o CLA pode ser um aditivo utilizado com a finalidade de melhorar a criorresistência de embriões bovinos.

O efeito benéfico do CLA na criorresistência pode ser explicado pelo aumento da fluidez da membrana plasmática (nível de insaturação) devido à incorporação do ácido graxo linoléico conjugado (ácido graxo polinsaturado) na membrana dos blastômeros durante o cultivo. O ácido graxo conjugado induz modificações no perfil de ácidos graxos, seja no conteúdo de triglicerídeos, ou diretamente nos níveis de ácidos graxos saturados ou insaturados provavelmente pela inibição da expressão de genes que codificam a síntese de enzimas lipogênicas, assim como inibem a atividade da lipoproteína lipase (Al DARWICH *et al.*, 2010). Os mesmos autores avaliaram o efeito da utilização de diferentes ácidos graxos polinsaturados no meio de cultivo de embriões bovinos, demonstrando que estes ácidos graxos podem afetar os níveis de transcrito de genes *FADS2*, mas não afetou os níveis de transcritos dos genes *ACC*, *FAS ADPR*, *DGAT* e *ACSL1*.

**Tabela 2:** Taxa de sobrevivência (%) e de eclosão (%) determinadas às 24 e 48 h após a desvitrificação de embriões bovinos cultivados em meio suplementado com CLA em diferentes momentos do cultivo.

Tratamento	n	Sobrevivência 24 h	Eclosão 48 h
Controle	65	50,3 ± 3,5 <sup>ab</sup>	26,0 ± 8,6 <sup>a</sup>
CLA-I	67	60,6 ± 4,6 <sup>b</sup>	33,7 ± 4,3 <sup>a</sup>
CLA-F	46	40,0 ± 8,2 <sup>a</sup>	22,6 ± 3,4 <sup>a</sup>
CLA-T	68	61,8 ± 3,2 <sup>b</sup>	61,8 ± 4,7 <sup>b</sup>

CLA-C: CIV sem a adição de CLA; CLA-I: CIV com CLA nas primeiras 72h; CLA-F: CIV com CLA nas últimas 72h; CLA-T: CIV com CLA durante todo o período. \*Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Além da ação na redução da expressão de enzimas lipogênicas, o CLA também poderia estar atuando na expressão de genes ligados ao transporte de glicose (GLUTs). Takahashi et al. (2002) observaram uma redução de transcritos de GLUT 4 em células de tecido adiposo de camundongos cultivadas em meio suplementado com CLA.

Em estudos com embriões bovinos Wrenzycki e colaboradores (1998 e 1999) observaram que a expressão do GLUT-1 aumentou significativamente no estágio de 8-16 células. Este aumento na expressão desta proteína coincide com o momento de ativação do genoma embrionário e também a partir deste período o embrião fica dependente do uso da glicose como substrato energético. No presente trabalho foi observada uma maior criorresistência nos embriões cultivados na presença de CLA durante todo o cultivo. Tais achados poderiam estar associados a uma redução na expressão de GLUT-1, uma vez que o CLA poderia bloquear ou reduzir o aumento da expressão dos GLUTs no estágio de 8-16 células. A redução na expressão de GLUTs poderia reduzir o conteúdo lipídico por promover uma menor entrada de glicose na célula. Desta maneira, haveria uma menor quebra da glicose via glicólise, o que, por consequência, ocasionaria uma menor concentração de Acetil-CoA, precursor dos ácidos graxos.

Pelo exposto, o CLA pode ser uma opção para reduzir o conteúdo lipídico e conseqüentemente aumentar a criorresistência dos embriões em sistemas de produção que utilizam soro nos meios de cultivo, sem afetar a produção de embriões. Porém, é importante que pesquisas voltadas para a avaliação da

expressão gênica de enzimas ligadas ao metabolismo de lipídios e metabolismo energético sejam desenvolvidas com o intuito de elucidar os mecanismos pelos quais o CLA atuaria no aumento da criorresistência dos embriões.

## 6. CONCLUSÃO

Pelos resultados apresentados conclui-se que o uso de CLA durante todo o cultivo *in vitro* promove uma redução do conteúdo lipídico e um aumento da criorresistência. Desta maneira, poderia ser utilizado como aditivo nos meios de produção *in vitro* de embriões bovinos com o intuito de aumentar a criorresistência. Para que sejam elucidados os mecanismos pelos quais o CLA atua neste aumento de criorresistência propõe-se futuros estudos ligados à expressão de genes que atuam na lipólise e lipogênese e também aqueles ligados ao metabolismo energético embrionário.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *Journal of Reproduction and Development.*, v. 49, p.193, 2003.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, v.53 p.325-335, 1999.
- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum containing media. *Molecular Reproduction and Development*, v.61, p. 57, 2002.
- AI.DARWICH, A., PERREAU, C., P., PETIT M. H., PAPILLIER, P., DUPONT, J., GUILLAUME, D., MERMILLOD, P., GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK phosphorylation in IVF derived bovine embryos. *Prostaglandins & OTHER Lipid Mediators*, v. 93, p. 30, 2010.
- AVERILL, R.L.W., ADAMS, C.E., ROWSON, L.E.A. Transfer of mammalian ova between species. *Nature*, v.176, p.167, 1955.
- BARCELO´-FIMBRES, M., BRINK, Z., SEIDEL Jr, G.E.. Effects of phenazine ethosulfate during culture of bovine embryos on pregnancy rate, prenatal and postnatal development. *Theriogenology*, v. 71, p. 355, 2009.

- BARCELÓ-FIMBRES, M., SEIDEL Jr, G.E. Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. *Theriogenology*, p. 75, p. 434. 444, 2011.
- BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL Jr, G.E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid acumulation in Vitro. *Molecular. Reproduction and. Development*, v. 74, p. 1406, 2007a.
- BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL Jr, G.E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate an either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embrionic development alter cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, p. 1395, 2007b.
- 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. p. 2155, 2002.
- BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*, v. 1, p. 91, 1995.
- BRACKETT, R.G., BOUSQUET, D., BOICE, M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, DRESSEL M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, v.27, p.147, 1982.
- CETICA, P., PINTOS, L., DALVIT, G., BECONI, M.. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction*, v. 124, p. 675, 2002.
- CHANSON, R. J., CSOKMAY, J., SEGARS, J. H., DECHERNEY, A. H., ARMANT, R.: Environmental and epigenetic effects upon

preimplantation embryo metabolism and development. Trends in Endocrinology and Metabolism, v. 22, p. 412, 2011.

CHEN, C., KO, Y., DELANNOY, M., LUDTKE, S.J., CHIU, W., PEDERSEN, P.L. Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. Journal of Biological Chemistry, v. 279, p. 31761, 2004.

CROSIER, A.E., FARIN, P.W., DYKSTRA, M.J., ALEXANDER, L.E., FARIN, C.E. Ultrastructural Morphometry of Bovine Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. Biology of Reproduction, v. 64, p. 1375, 2001.

De La TORRE-SANCHEZ, J.F., GARDNER, D.K., PREIS, K., GIBBONS, J., SEIDEL Jr, G.E. Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. II. Effects of three metabolic regulators during post-compaction development. Reproduction Fertility and Development, v.18, p.597, 2006a.

De La TORRE-SANCHEZ, J.F., PREIS, K.M., SEIDEL, G.E., Jr. Metabolic regulation of in vitro produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen of different bulls. Reproduction Fertility and Development, v.18, p.585, 2006b.

ECKERT, J., PUGH, P.A., THOMPSON, J.G., NIEMANN, H., TERVIT, H.R. Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine preimplantation embryos *in vitro*. Reproduction Fertility and Development, v.10, p.327, 1999.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Classificação mundial dos principais países produtores de leite de vaca . 2008, <http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>; acessado em 01/12/2013.

EVANS, M., GEIGERMAN, C., COOK, J., CURTIS, L., KUEBLER, B., MCINTOSH, M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride content and induces apoptosis in 3t3. I1 preadipocytes. *Lipids*, v. 35, p. 899, 2000.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTEL, D.C.; HITTEL, P. Ultrastructure of bovine blastocysts following criopreservation:effect of method of blastocyst production. *Molecular. Reproduction and Development*, v.58, p.186-195, 2001.

FELTRIN, C. Avaliação de sistemas de cultivo in vitro em micropoços para embriões bovinos produzidos por handmade cloning (HMC). Dissertação de mestrado, Porto Alegre, RS, 2010.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 116, p. 373, 1999.

FEUGANG, J. M., CAMARGO-RODRÍGUEZ, O., MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, v. 121, p. 141, 2009.

GARCIA, J.M., AVELINO, K.B., VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. *Anais do I Simpósio Internacional de reprodução Aplicada*, 2004.

GARDNER, D.K., WALE, P.L., Analysis of metabolism to selectviable human embryos for transfer. *Fertility and Sterility*, v. 99, p. 1062, 2013.

- GEORGE, F.; DANIAUX, C.; GENICOT, G.; VERHAEGHE, B.; LAMBERT, P.; DONNAY, I. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*, v. 69, p. 612, 2008.
- GOMEZ, E., DUQUE, P., DÍAZ, E., FACAL, N., ANTOLÍN, I., HIDALGO, C., DÍEZ, C. Effects of acetoacetate and D-beta-hydroxybutyrate on bovine in vitro embryo development in serum free medium. *Theriogenology*, v. 57, p. 1551, 2002.
- GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. Ed. Varela, São Paulo, p. 360, 2002.
- GORDON, I. Oocyte recovery and maturation. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International, p.30, 1994.
- GREVE, T.; CALLESSEN, H.; HYTTEL, P.; AVERY, B. From oocyte to calf: in vivo and in vitro. In Greppi, G.F.; Enne, G. (eds.). *Animal Production and Biotechnology*. Paris: Elsevier Biofutur, p. 71-97, 1995.
- HARVEY, A.J.. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, v. 98, p. 113, 2007.
- HASLER, J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, v. 81, p. 152, 2014.
- HASLER, J.F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or co-culture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.81, 2000.

- HEO, Y. S., CABRERA, L. M., BORMANN, C. L., SMITH, G. D., TAKAYAMA, S. Real time culture and analysis of embryo metabolism using a microfluidic device with deformation based actuation. *Lab on a Chip*, v.12 p. 2240, 2012.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; CALLESEN, H. Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo* and *in vitro* derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum containing media. *Reproduction*, v. 123, p. 553, 2002.
- HOUGHTON, F.D., LEESE, H.J. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. v. 115,p. S92, 2004.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal 2012, v. 40, 2012.
- JONES, K.L., WESTHUSIN, M.E. Effect of polyvinyl alcohol, bovine serum albumin fraction V, fetal calf serum and fetal calf serum plus bovine serum albumin fraction V on bovine embryo development. *Theriogenology*, v. 45, p. 205, 1996.
- KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*. n. 62, p. 847, 2000.
- KIM, H.K. REGULATION OF MAMMALIAN ACETYL-COENZYME A CARBOXYLASE. *Annual Review of Nutrition*, V.17, P. 77, 1997.
- KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Reproduction*, v.122, p.131, 2001.

- KRISHER, R.L.; LANE, M.; BAVISTER, B.D. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of. Reproduction*, v. 60, p. 1345, 1999.
- LAZZARI G., COLLEONI S., LAGUTINA I., CROTTI G., TURINI P., TESSARO I., BRUNETTI D., DUCHI R., GALLI C. Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. *Theriogenology*, v. 73, p. 748, 2010.
- LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction.*, v. 67, p. 767, 2002.
- LEE, K.N.; PARIZA, M.W.; NTAMBI, J.M. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase m RNA expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 248, p.817, 1998.
- LEESE, H.J. Metabolic control during preimplantation mammalian development. *Human Reproduction Update*, v. 1, p. 63, 1995.
- LEESE, H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*, v. 143, p. 417, 2012.
- LEQUARRE, A.S., MARCHANDISE, J., MOREAU, B., MASSIP, A., DONNAY, I. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro- produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1707, 2003.
- 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, p.194, 2009.

- LONERGAN, P. e FAIR, T. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, v.81, p. 49, 2014.
- MARQUES, C.C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t,12c* CLA). *Animal Reproduction Science*, n. 98, p. 293, 2007.
- MILOVANOV C., HERRADÓN, P. G. *In vitro* development of IVM/IVF bovine embryos in b2 medium supplemented with albumin (BSA) or polyvinyl alcohol (PVA). *Theriogenology*, v. 45, p. 215, 1996.
- MINGOTI, G. Z. Maturação oocitária associada à esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides, 141 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) . Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
- 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, p.1551, 2006.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. São Paulo , 2009.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. ed. New York: WH Freeman and Company, p. 237,2005.
- NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alteration of expression of developmentally important genes in pre implantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, v.53, p. 21, 2000.

- NOJI, H., YASUDA, R., YOSHIDA, M., KINOSITA, JR., K. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature*, v. 386, p. 299, 1997.
- NOJI, H., YOSHIDA, M. The Rotary Machine in the Cell, ATP Synthase *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 1665, 2001.
- ORSI, N.M., LEESE, H.J. Amino acid metabolism of preimplantation bovine embryos cultured with bovine serum albumin or polyvinyl alcohol. *Theriogenology*, v. 61, p. 561, 2004.
- PALMA, G. Producción in vitro de embriones. In: PALMA, G. *Biotecnología de la Reproducción*, Argentina, 1Ed. INTA Editora, 2001.
- PANTALEON, M., RYAN, J.P., GIL M., KAYE, P.L. An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1247, 2001.
- PARIZA, M., Y. PARK, M. COOK, The biologically active isomers of conjugated linoleic acid, *Progress in Lipid Research*, v. 40, p. 283, 2001.
- PEREIRA, R.M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J., BAPTISTA, M. C., VASQUES, M.I. et al. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by *trans10*, *cis12* conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. *Animal Reproduction Science*, v. 106 p. 322, 2008.
- 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. Cryosurvival of bovine blastocysts is

enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t, 12c* CLA). *Animal Reproduction Science*, n. 98, p. 293, 2007.

PETYIM S, MAKEMAHAR O, KUNATHIKOM S, CHOAVARATANA R, LAOKIRKKIAT P, PENPARKKUL K. The successful pregnancy and birth of a healthy baby after human blastocyst vitrification using Cryo-E, first case in Siriraj Hospital. *J Med Assoc Thai* v. 92, p. 1116, 2009.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology*, n.39 p.287, 1993.

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

PUGH PA, TERVIT HR, NIEMAN H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Animal Reproduction Science*; v.58, p.9-22, 2000.

QUINN, P.J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology* n. 22 p.128. 146, 1985.

RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free criopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Letters to Nature*, v.313, p.573, 1985.

RIEGER, D.; MCGROWAN, L.T.; COX, S.F.; PUGH, P.A.; THOMPSON, J.G. Effect of 2,4 dinitrofenol on the energy metabolism of cattle embryos produced by *in vitro* fertilization and culture. *Reproduction Fertility and Development*, v. 14, p. 339, 2002.

- RILEY, J. K, MOLEY, K. H.. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. *Reproduction*, v. 131, p. 823, 2006.
- RIZOS D.; GUTIERREZ-ADAN A.; PEREZ-GARNELO S.; DE LA FUENTE J.; BOLAND M.P.; LONERGAN P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 236. 2003.
- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, p. 234, 2002.
- SANTIN, T.R.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Criopreservação de embriões . metodologias de vitrificação. *Veterinária e Zootecnia.*, v.16, p.561, 2009.
- SATA, R.; TSUJI, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum free and serum-containing medium during early embryonic development. *J. Reprod. Dev.*, v. 45, p. 97. 103, 1999.
- SCHIEWE, M.C. The science and significance of embryo cryopreservation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.22, p.6-22, 1991.
- SEIDEL JR, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, n. 65 p.228 . 235, 2006.

- SHAW J.M., ORANRATNACHAI A., TROUNSON A.O.; Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue, *Theriogenology*, 53:59-72; 2000.
- SHNEIDER HJ JR, CASTLEBERRY RS, GRIFFIN JL. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*; v. 13, p.73-85, 1980.
- SMORAG, Z., HEYMAN, Y., GARNIER, V., AND GADJA, B. The effect of sucrose and trehalose on viability of one- and- two-cell rabbit embryos. *Theriogenology* 33: 741, 1990.
- SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene Glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, v.38, p.95-105, 1999.
- SREENAN, J.M., SCANLON, P.F. Continued cleavage of fertilized bovine ova in the rabbit. *Nature*, v.217, p.867, 1968.
- STEEVES, T.E., GARDNER, D.K. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Molecular, Reproduction and. Development*, v. 54, p. 92, 1999.
- STEEVES, T.E., GARDNER, D.K., ZUELKE, K.A., SQUIRES, T.S., FRY, R.C.. In vitro development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of pre-pubertal and adult cows. *Molecular, Reproduction and. Development*, v. 54, p. 49, 1999.
- 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*, 2013.

- STROUD, B. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report: The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. Disponível em: <http://www.iets.org/pdf/December2012.pdf>, 2012.
- STUBBS, C.D. e SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function *Biochimica et Biophysica Acta* n.779 p. 89. 137, 1984.
- 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 (Sup.. 3), p. 50, 2009.
- SUDANO, M.J. efeito do soro fetal bovino e do etossulfato de fenazina sobre o acúmulo lipídico, apoptose e resposta à vitrificação em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Dissertação de mestrado, 2010.
- SUDANO, M.J., PASCHOAL, D. M., RASCADO, T.S., OÑA MAGALHÃES, L. C CROCOMO, L. F., LIMA-NETO, J.F., LANDIM-ALVARENGA, F.C. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v. 75, p. 1211, 2011.
- SUGIYAMA R, NAKAGAWA K, SHIRAI A, SUGIYAMA R, NISHI Y, KURIBAYASHI Y, INOUE. M. Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). *J Assist Reprod Genet*, v. 27, p. 161, 2010.
- SUTTON-McDOWALL, M.L., FEIL, D., ROBKERR.L., THOMPSON, J.G., DUNNING, K.R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy

production in bovine preimplantation embryos *Theriogenology*, v. 77, p. 1632, 2012.

TAKAHASHI, Y.; KUSHIRO, M.; SHINOHARA, K.; IDE, T. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 133, p. 395, 2002.

TETZNER, T. A. D. Efeitos da substituição do soro fetal bovino (sfb) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção *in vitro* de embriões bovinos, Dissertação de mestrado, 2008.

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

THOMPSON, J.G.; SHERMAN, A.N.M.; ALLEN, N.W.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. Protein content, synthesis and uptake in pre-elongation stage bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 50, p. 139, 1998.

TSANG WH, CHOW KL. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*, v.46, p. 550, 2009.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

VAJTA, G., KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v. 65, p.236 - 244 , 2006.

VAJTA, G., RIENZI, L., COBO, A., YOVICH, J. Embryo culture: can we perform better than nature? *Reproductive Biomedicine Online*, v. 4, p. 453, 2010.

- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Animal Reproduction Science*. v.45, p.191-200, 1996.
- VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo Letters*, v.18, p.191-195, 1997.
- VAN SOOM, A.; BOERJAN, M.L.; BOLS, P.E.J.; VANROOSE, G.; LEIN, A.; CORYN, M.; de KRUIF, A. Timing of compactation and inner cell allocation in bovine embryos, produced in vivo after superovulation. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1041, 1997.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; RALL, W.F. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: Vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*, v.48, p.1071, 1997.
- VANDERZWALMEN P, BERTIN G, DEBAUCHE C, STANDAART V, SCHOYSMAN E. In vitro survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility*, v. 74, p. S215, 2000.
- VARAGO, F. C., MENDONÇA, L. F., LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, p.100, 2008.
- VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; PALHÃO, M.P.; CAMARGO, L.S.A. Evolução no uso das técnicas de fertilização *in vitro* na última década e

impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil. Anais da XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2010.

VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.B.; NICACIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Cryopreservation of *Bos Taurus* vs *Bos Indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology*, v.57, p.345, 2002.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, v.233, p.125-6, 1971.

WILMUT, I.; ROWSON, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record*, v.92, p.686-90, 1973.

WITKOWSKI, A., GHOSAL, A., JOSHI, A.K., WITKOWSKA, H.E., ASTURIAS, F.J., SMITH, S., Head-to-Head Coiled Arrangement of the Subunits of the Animal Fatty Acid Synthase, *Chemistry & Biology*, v. 11, p. 1667, 2004.

WITTERS, L.A., KEMP, B.E. Insulin activation of acetyl-CoA carboxylase accompanied by inhibition of the 5'-AMP-activated protein kinase. *Journal Of Biological Chemistry*, v. 267, p. 2864, 1992.

WRIGHT JM. Nonsurgical embryo transfer in cattle: embryo-recipient interactions. *Theriogenology*; v.15: p.43-56, 1981.

WURTH, Y.A., REINDERS, J.M.C., RALL, W.F., KRUIP, T.H.A.M. Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology*, v. 42, p. 1275, 1994.

- YANG, M. COOK, M.E. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor-alpha production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med* ,v. 228, p. 51, 2003.
- ZERON, Y. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*.
- WRENZYCKI, C., D. HERRMANN, J. W. CARNWATH, AND H. NIEMANN.. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol. Reprod. Dev.* 53:8-18. 1999.
- WRENZYCKI, C., D. HERRMANN, J. W. CARNWATH, AND H. NIEMANN.. Expression of RNA from developmentally important genes in preimplantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J. Reprod. Fertil.* 112:387-398, 1998.
- ZHANG, Y.M., RAO, M.S., HEATH, R.J., PRICEI, A.C., OLSON, A.J., ROCK, C.O., WHITEIS.W. Identification and Analysis of the Acyl Carrier Protein (ACP) Docking Site on b-Ketoacyl-ACP Synthase III. *Journal Of Biological Chemistry*, v. 276, p. 8231, 2001.