

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 03/02/2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ADIÇÃO DE ÁCIDO LINOLÊNICO E L-CARNITINA NA  
MATURAÇÃO OOCITÁRIA: EFEITOS SOBRE O  
METABOLISMO CELULAR, POTENCIAL DE  
DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES  
BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO**

**Beatriz Caetano da Silva Leão**

Médica Veterinária

2016

**T  
E  
S  
E**

**/**

**L  
E  
Ã  
O**

**B.  
C.  
S.**

**2  
0  
1  
6**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**ADIÇÃO DE ÁCIDO LINOLÊNICO E L-CARNITINA NA  
MATURAÇÃO OOCITÁRIA: EFEITOS SOBRE O  
METABOLISMO CELULAR, POTENCIAL DE  
DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES  
BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO**

**Beatriz Caetano da Silva Leão**

**Orientadora: Profa. Adj. Gisele Zoccal Mingoti**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal

2016

Leão, Beatriz Caetano da Silva  
L437a Adição de ácido linolênico e L-carnitina na maturação oocitária: efeitos sobre o metabolismo celular, potencial de desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* / Beatriz Caetano da Silva Leão. -- Jaboticabal, 2016  
xii, 94 p. : Il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016  
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti  
Banca examinadora: Felipe Perecin, Gilson Helio Toniolo, Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, Marcus Antônio Feliciano  
Bibliografia

1. Ácido linolênico. 2. L-carnitina. 3. Maturação *in vitro*. 4. Acúmulo lipídico. 5. Criotolerância embrionária. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.64:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ADIÇÃO DE ÁCIDO LINOLÊNICO E L-CARNITINA NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA: EFEITOS SOBRE O METABOLISMO CELULAR, POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINIOS PRODUZIDOS IN VITRO.

AUTORA: BEATRIZ CAETANO DA SILVA LEÃO

ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMVA / UNESP - Araçatuba/SP




Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA

Departamento de Ciências Biológicas / FCL / UNESP - Assis/SP



Prof. Dr. FELIPE PERECIN

FZEA/USP - Pirassununga/SP

Jaboticabal, 03 de fevereiro de 2016

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

BEATRIZ CAETANO DA SILVA LEÃO – nascida em Rio Verde – GO, aos 12 dias do mês de fevereiro de 1987. Concluiu o ensino médio na Cooperativa de Ensino de Rio Verde (COOPEN), na cidade de Rio Verde – GO, em dezembro de 2004. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus Araçatuba-SP, em março de 2005. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2009. Durante a graduação realizou estágio de Iniciação Científica sob orientação da Profa. Ass. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, junto à disciplina de Fisiologia dos Animais Domésticos, com bolsas de iniciação científica da FAPESP. Ingressou no curso de Pós- graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2010, sob orientação da Profa. Ass. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado do CNPq. Ingressou no curso de Pós- graduação em Medicina Veterinária, nível de Doutorado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2012, sob orientação da Profa. Ass. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de doutorado FAPESP.

## EPÍGRAFE

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”

**Antoine de Saint-Exupéry**



## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meus pais Nelson e Helena  
por todo seu amor e sempre me apoiarem em  
minhas escolhas profissionais.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por ter me dado força em mais essa conquista, além de todos os ensinamentos e o amadurecimento que ela me proporcionou.

À minha querida orientadora Gisele Zoccal Mingoti, que há tantos anos me acompanha nessa jornada de pesquisa por sua paciência, confiança, dedicação, conselhos, ensinamentos e todo seu esforço para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada por sempre permitir meu crescimento profissional.

Aos funcionários Adão Custódio e Alexandre José Teixeira pela ajuda e disposição em me atender durante a realização dos experimentos e na organização do laboratório.

Às minhas queridas amigas e companheiras de trabalho no laboratório: Nathália Rocha Frigoni, Priscila Chediek Dall'Acqua e Marcela Ambrogi por sua imprescindível ajuda, conselhos, apoio, ensinamentos e carinho.

Às meninas da Iniciação Científica que muito ajudaram na realização das atividades experimentais: Giovana Barros Nunes, Juliana Viegas, Luana Teixeira Rodrigues e Maria Isabela Azeredo.

Às estagiárias que passaram pelo laboratório, por toda sua ajuda e disposição em acompanhar e auxiliar nos experimentos: Laís Rigon e Joice Martins.

Aos outros companheiros de laboratório que de alguma forma me ajudaram e apoiaram: Mônica Accorsi, Guilherme Rossi, Melissa Meneghel e Diego Jimenez Filho.

Aos meus pais Nelson e Helena, minhas irmãs Lívia e Ludimilla, meus avós Mário e Therezinha e a todos meus familiares por todo amor, apoio e orações.

À todas as minhas amigas e amigos, que mesmo à distância tornaram meus dias mais alegres e divertidos e por sempre torcerem por mim: Caio Vieira, Daniela Junqueira, Fabio Frigoni, Heloíse Pazian Paulo, Ludmila Mangialardo, Mariana Ferreira de Souza, Naiara Reis Gil, Poliana Peres, Renata Furquim.

Às empresas Frigorífico Brasfrigo e Alta Genetics pelo apoio na realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de estudos e apoio financeiro.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este projeto foi financiado pela **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, sob processos nº 2012/10084-4 e 2013/07382-6.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....</b>	<b>1</b>
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Metabolismo lipídico.....	3
Efeito do cultivo de oócitos e embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meios suplementados com ácidos graxos poliinsaturados.....	4
Efeitos da suplementação com L-carnitina no sistema de PIV de embriões bovinos.....	6
OBJETIVO GERAL.....	7
HIPÓTESE.....	8
REFERÊNCIAS.....	9
<b>CAPÍTULO 2 – Efeito da suplementação com ácido linolênico durante a MIV de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e citoplasmática, acúmulo lipídico intracelular, potencial oxidativo celular e de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> .....</b>	<b>13</b>
RESUMO.....	13
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Reagentes químicos.....	17
Obtenção e seleção dos oócitos.....	18
Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos .....	18
Avaliação da maturação nuclear.....	19

<b>Avaliação da maturação citoplasmática.....</b>	<b>19</b>
<b><i>Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e da distribuição citoplasmática das mitocôndrias.....</i></b>	<b>19</b>
<b><i>Quantificação lipídica intracitoplasmática.....</i></b>	<b>20</b>
<b><i>Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína .....</i></b>	<b>21</b>
<b>Produção <i>in vitro</i> dos embriões.....</b>	<b>23</b>
<b>Delineamento experimental.....</b>	<b>23</b>
<b>Análise estatística.....</b>	<b>24</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>Maturação nuclear.....</b>	<b>25</b>
<b>PMM e distribuição citoplasmática das mitocôndrias.....</b>	<b>26</b>
<b>Quantificação lipídica intracitoplasmática.....</b>	<b>28</b>
<b>Mensuração do conteúdo intracelular de ROS.....</b>	<b>29</b>
<b>Produção <i>in vitro</i> de embriões .....</b>	<b>30</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>

<b>CAPÍTULO 3 – Efeito da suplementação com L-carnitina durante a MIV de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e citoplasmática acúmulo lipídico intracelular, potencial oxidativo celular e de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>41</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
<b>Reagentes químicos.....</b>	<b>45</b>
<b>Obtenção e seleção dos oócitos.....</b>	<b>45</b>
<b>Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....</b>	<b>46</b>
<b>Avaliação da maturação nuclear.....</b>	<b>46</b>
<b>Avaliação da maturação citoplasmática.....</b>	<b>47</b>

<i>Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e da distribuição citoplasmática das mitocôndrias</i> .....	47
<i>Quantificação lipídica intracitoplasmática</i> .....	48
<i>Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína</i> .....	48
<i>Produção in vitro dos embriões</i> .....	49
<i>Delineamento experimental</i> .....	50
<i>Análise estatística</i> .....	51
<b>RESULTADOS</b> .....	51
<i>Maturação nuclear</i> .....	51
<i>PMM e distribuição citoplasmática das mitocôndrias</i> .....	52
<i>Quantificação lipídica intracitoplasmática</i> .....	55
<i>Mensuração do conteúdo intracelular de ROS</i> .....	55
<i>Produção in vitro de embriões</i> .....	56
<b>DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62

<b>CAPÍTULO 4 – Efeito da suplementação com ácido linolênico e/ou L-carnitina, durante o cultivo de maturação <i>in vitro</i> sobre o metabolismo celular, potencial de desenvolvimento oocitário e criotolerância embrionária</b> .....	65
<b>RESUMO</b> .....	65
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	67
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	69
<i>Reagentes químicos</i> .....	69
<i>Obtenção e seleção dos oócitos</i> .....	70
<i>Maturação in vitro dos oócitos</i> .....	70
<i>Produção in vitro dos embriões</i> .....	71
<i>Quantificação lipídica intracitoplasmática</i> .....	71
<i>Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína</i> .....	72

Detecção da fragmentação nuclear através da coloração com “Terminal Transferase Assay” – TUNEL.....	73
Vitrificação e avaliação da re-expansão embrionária pós-desvitrificação.....	73
Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	74
Delineamento experimental.....	76
Análise estatística.....	77
RESULTADOS.....	78
Quantificação lipídica intracitoplasmática em blastocistos.....	78
Mensuração do conteúdo intracelular de ROS em blastocistos.....	78
Avaliação da fragmentação nuclear em blastocistos.....	79
Avaliação da criotolerância embrionária.....	80
Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	80
Expressão gênica em oócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> .....	81
Expressão gênica em blastocistos bovinos.....	82
DISCUSSÃO.....	85
CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94

## LISTA DE TABELAS

Página

### **CAPÍTULO 2 – Efeito da suplementação com ácido linolênico durante a MIV de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e citoplasmática, acúmulo lipídico intracelular, potencial oxidativo celular e de desenvolvimento embrionário *in vitro***

**Tabela 1.** Estágio da meiose de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido linolênico.....26

**Tabela 2.** Estágio da meiose de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....26

**Tabela 3.** Potencial de membrana mitocondrial (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido linolênico.....27

**Tabela 4.** Potencial de membrana mitocondrial (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....27

**Tabela 5.** Distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido linolênico.....28

**Tabela 6.** Distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....28

### **CAPÍTULO 3 – Efeito da suplementação com L-carnitina durante a MIV de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e citoplasmática acúmulo lipídico intracelular, potencial oxidativo celular e de desenvolvimento embrionário *in vitro***

**Tabela 1.** Estágio da meiose de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de L-carnitina.....52

**Tabela 2.** Estágio da meiose de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....52



**Tabela 3.** Distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de L-carnitina.....54

**Tabela 4.** Distribuição citoplasmática das mitocôndrias em oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....54

#### **CAPÍTULO 4 – Efeito da suplementação com ácido linolênico e/ou L-carnitina, durante o cultivo de maturação *in vitro* sobre o metabolismo celular, potencial de desenvolvimento oocitário e criotolerância embrionária**

**Tabela 1.** Sequência dos “primers” utilizados na reação de PCR em tempo real.....75

**Tabela 2.** Número de células totais e proporção de células apoptóticas em blastocistos bovinos derivados de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car).....80

**Tabela 3.** Taxa de re-expansão da blastocèle e de eclosão pós-aquecimento em blastocistos bovinos derivados de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car).....80

## LISTA DE FIGURAS

Página

### **CAPÍTULO 2 – Efeito da suplementação com ácido linolênico durante a MIV de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e citoplasmática, acúmulo lipídico intracelular, potencial oxidativo celular e de desenvolvimento embrionário *in vitro***

- Figura 1.** Fotomicrografias de oócitos bovinos corados com: A: Sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação dos núcleos (em azul). Classificação de acordo com a configuração nuclear em: vesícula germinativa (VG), metáfase da meiose I (MI) e metáfase da meiose II (MII); B: sonda fluorescente MitoTracker Red e classificados de acordo com a predominância da distribuição citoplasmática das mitocôndrias em periférica (P), transição (T) e geral (G), C: corante lipofílico Sudan Black B para determinação do acúmulo lipídico intracitoplasmático. Oócitos MIV em meio suplementado com 100  $\mu$ M de ácido linolênico na presença de SFB (a1) e BSA (b1); D. sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA. Quanto maior a intensidade da fluorescência, maior o conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio.....22
- Figura 2.** Esquema ilustrativo do delineamento experimental de acordo com a composição dos meios de maturação *in vitro* utilizados no Experimento I.....24
- Figura 3.** Conteúdo lipídico intracitoplasmático (em pixels) de oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de ácido linolênico na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....29
- Figura 4.** Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) em oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de ácido linolênico na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....30
- Figura 5.** Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido linolênico.....31
- Figura 6.** Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....32

### **CAPÍTULO 3 – Efeito da suplementação com L-carnitina durante a MIV de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e citoplasmática acúmulo lipídico intracelular, potencial oxidativo celular e de desenvolvimento embrionário *in vitro***

- Figura 1.** Esquema ilustrativo do delineamento experimental de acordo com a composição dos meios de maturação *in vitro* utilizados no Experimento II.....50
- Figura 2.** Potencial de membrana mitocondrial (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de L-carnitina na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....53
- Figura 3.** Conteúdo lipídico intracitoplasmático (em pixels) de oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de L-carnitina na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....55
- Figura 4.** Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) em oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de L-carnitina na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....56
- Figura 5.** Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de L-carnitina.....57
- Figura 6.** Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA).....58

### **CAPÍTULO 4 – Efeito da suplementação com ácido linolênico e/ou L-carnitina, durante o cultivo de maturação *in vitro* sobre o metabolismo celular, potencial de desenvolvimento oocitário e criotolerância embrionária**

- Figura 1.** Esquema ilustrativo do delineamento experimental de acordo com a composição dos meios de maturação *in vitro* utilizados no Experimento III.....76

- Figura 2.** Conteúdo lipídico intracitoplasmático (em pixels) de blastocistos bovinos derivados de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car).78
- Figura 3.** Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) de blastocistos bovinos derivados de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car).....79
- Figura 4.** Taxas de clivagem e de blastocistos obtidos a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car).....81
- Figura 5.** Expressão relativa dos genes carnitina palmitoil transferase I (CPT1B) e II (CPT2), “fatty acid synthase” (FASN), estearoil-CoA-dessaturase (SCD1) e “sterol-regulatory element binding protein” (SREBP1) em oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car).....82
- Figura 6.** Expressão relativa dos genes carnitina palmitoil transferase I (CPT1B) e II (CPT2), “fatty acid synthase” (FASN), estearoil-CoA-dessaturase (SCD1) e “sterol-regulatory element binding protein” (SREBP1) em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car).84

## LISTA DE ABREVIATURAS

AI - anáfase I

ALA – Ácido linolênico

BME - Solução de aminoácidos 50X

BSA - Albumina sérica bovina

°C - Graus Celsius

Ca – Cálcio

CIV - Cultivo *in vitro*

CO<sub>2</sub>- Dióxido de carbono

COCs - Complexos cumulus oócito

CPT1B - carnitina palmitoil transferase 1B

CPT2 - carnitina palmitoil transferase 2

DMSO – Dimetil-sulfóxido

DPBS - Solução salina em tampão fosfato

DV-1 – Solução de desvitrificação 1

DV-2 – Solução de desvitrificação 2

DV-3 – Solução de desvitrificação 3

EPM - Erro padrão da média

FASN - enzima sintetizadora de ácidos graxos

FIV - Fertilização *in vitro*

FSH - Hormônio folículo estimulante

G - Gauge (unidade de medida de calibre)

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

HO• - radical hidroxila

ROO• - radical peroxila

H<sub>2</sub>DCFDA - diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína

HEPES - N- (2-hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid); 4- (2 Hydroxyethyl) piperazine- 1-ethanesulfonic acid

hpi - horas pós-inseminação

IETS – “International Embryo Transfer Society”

M I - metáfase I  
M II - metáfase II  
MAPK 1 - “mitogen-activated protein kinase 1”  
MAPK 3 - “mitogen-activated protein kinase 3”  
MEM - Solução de aminoácidos não essenciais 100X  
mg - Miligrama  
MIV - Maturação *in vitro*  
mL - Mililitro  
mm - Milímetros  
mM – Milimolar  
mRNA – RNA mensageiro  
n - Número  
n-3 – Ômega 3  
P – probabilidade  
PGE<sub>2</sub> – Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina F<sub>2α</sub>  
PHE - Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina  
PIV - Produção *in vitro* de embriões  
PTGER2 - genes Knockout para o receptor da PGE<sub>2</sub>  
PTGS2 - prostaglandina-endoperoxidase sintetase  
PUFA – Ácidos graxos poliinsaturados  
PVP – Polivinil pirrolidona  
ROS - “reactive oxygen species”  
SAS – Sistema de análise estatística  
SCD – “Stearoyl-CoA desaturases”  
SFB - Soro fetal bovino  
SOFaa- “Synthetic Oviduct Fluid” suplementado com aminoácidos  
SREBP - “Sterol-regulatory element binding protein”  
TI - telófase I  
TALP-FIV – “Tyrode’s” albumina lactato piruvato  
TCM-199 – “Tissue culture medium” 199  
VI-1 – Solução de vitrificação 1

VI-2 - Solução de vitrificação 2

VG - vesícula germinativa

vs - versus

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm – Micrometro

µM – Micromolar

% - Porcentagem

## ADIÇÃO DE ÁCIDO LINOLÊNICO E L-CARNITINA NA MATURAÇÃO OOCITÁRIA: EFEITOS SOBRE O METABOLISMO CELULAR, POTENCIAL DE DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

**RESUMO** – Com o intuito de aperfeiçoar os resultados da criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), este estudo foi conduzido com o objetivo principal de avaliar o impacto da suplementação do meio de maturação *in vitro* (MIV) com ácido linolênico (ALA), associado ou não à L-carnitina (L-car), sobre a maturação e qualidade do oócito, especialmente no que se refere ao metabolismo lipídico, e sobre o desenvolvimento e resistência à criopreservação dos embriões produzidos. Para tanto, em uma primeira etapa (Experimentos I e II) foram realizados experimentos de dose-resposta para determinar as concentrações ideais de ALA (0, 10, 50 ou 100  $\mu$ M) e L-car (0, 1, 5 ou 10 mM) a serem adicionadas ao meio de MIV, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) ou 0,6% de albumina sérica bovina (BSA). Foram avaliados os efeitos do ALA e L-car sobre a maturação nuclear e citoplasmática (avaliação mitocondrial, acúmulo lipídico intracelular e produção de espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS) em oócitos bovinos) e o subsequente desenvolvimento embrionário. No Experimento I, a adição de 100  $\mu$ M de ALA em meio de MIV suplementado com SFB resultou em redução ( $P < 0,05$ ) do acúmulo lipídico citoplasmático e do acúmulo intracelular de ROS, assim como aumento ( $P < 0,05$ ) do potencial de membrana mitocondrial (PMM), em relação às demais concentrações de ALA. No entanto, nenhum desses efeitos prejudicou ( $P > 0,05$ ) a maturação oocitária e o subsequente potencial de desenvolvimento embrionário. No Experimento II, a suplementação do meio de MIV com L-car resultou em redução ( $P < 0,05$ ) do acúmulo lipídico citoplasmático, na presença de SFB. Somados os efeitos da concentração de 10 mM de L-car na presença de SFB sobre a redução ( $P < 0,05$ ) do PMM e elevação ( $P < 0,05$ ) do conteúdo de ROS e, do efeito negativo ( $P < 0,05$ ) da suplementação do meio de MIV com BSA sobre o desenvolvimento embrionário, conclui-se que a suplementação com 5 mM de L-car na presença de SFB superou os resultados dos demais grupos. Em uma segunda etapa (Experimento III), baseado nos resultados dos experimentos anteriores foi avaliado o efeito da suplementação com ALA (100  $\mu$ M), L-car (5mM) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car), durante o cultivo de MIV com 10% de SFB, sobre o subsequente desenvolvimento *in vitro*, qualidade embrionária (avaliada pela contagem do número total de células e taxa de apoptose), conteúdo intracelular de ROS e acúmulo lipídico intracitoplasmático, além da criotolerância embrionária. Para tanto, oócitos foram fecundados durante 24 horas e os prováveis zigotos cultivados *in vitro* (CIV). Foram avaliadas a taxa de clivagem (48 hpi) e o desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos (D7 do CIV). Estes foram vitrificados e posteriormente reaquecidos para avaliação da sobrevivência embrionária pós-criopreservação, após 24 h e, taxa de eclosão após 48 h de re-cultivo *in vitro*. Também nesta etapa, foi avaliada a regulação da expressão de genes envolvidos com o metabolismo lipídico (regulação da lipogênese: SCD1, FASN e SREBP1; regulação da via metabólica de  $\beta$ -oxidação: CPT1B e CPT2), em oócitos suplementados com ALA e/ou L-carnitina durante o cultivo de MIV, e nos embriões produzidos. Os tratamentos com ALA e L-car



realizados na etapa de MIV não suportaram os efeitos positivos observados nos estudos anteriores sobre a redução do acúmulo lipídico e melhora do potencial de desenvolvimento oocitário. Os tratamentos não alteraram o conteúdo lipídico e consequentemente a criotolerância dos embriões resultantes. Apesar disso, houve melhora da qualidade embrionária pela redução do índice apoptótico e acúmulo de ROS. A expressão dos genes relacionados à lipogênese sofreram influência do tratamento com os suplementos realizado na MIV. Porém, para os genes relacionados à lipólise, um possível efeito positivo foi perdido e, talvez seja necessário o tratamento na etapa de CIV. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar a etapa mais adequada da PIV para se realizar a suplementação com ALA, L-car e a associação de ambos os tratamentos, objetivando alterar o conteúdo lipídico e consequentemente a criotolerância embrionária.

**Palavras-chave:** ácido linolênico, L-carnitina, maturação *in vitro*, acúmulo lipídico, criotolerância embrionária

## LINOLENIC ACID AND L-CARNITINE ON OOCYTE MATURATION: EFFECTS ON CELLULAR METABOLISM, DEVELOPMENT POTENTIAL AND CRYOTOLERANCE OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS

**ABSTRACT** – In order to improve the results of cryopreservation of bovine *in vitro* produced (IVP) embryos, this study was conducted with the main objective to assess the impact of *in vitro* maturation medium (IVM) supplementation with linolenic acid (ALA), associated or not with L-carnitine (L-car), on oocyte maturation and quality, specially regarding to lipid metabolism and on development and cryoresistance of produced embryos. Therefore, in a first step (Experiments I and II) were performed dose-response experiments to determine the optimal concentrations of ALA (0, 10, 50 or 100  $\mu$ M) and L-car (0, 1, 5 or 10 mM) to be added to IVM medium, supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) or 0.6% bovine serum albumin (BSA). The effects of ALA and L-car on nuclear and cytoplasmic maturation [mitochondrial evaluation, intracellular lipid accumulation and intracellular production of reactive oxygen species (ROS)] and subsequent embryonic development were evaluated. In Experiment I, the IVM supplementation with 100  $\mu$ M of ALA in FCS-supplemented medium resulted in reduction ( $P < 0.05$ ) of cytoplasmic lipid and intracellular ROS accumulation, as well as, increased ( $P < 0.05$ ) mitochondrial membrane potential (MMP), relative to the other ALA concentrations. However, none of these effects damaged ( $P < 0.05$ ) oocyte maturation and the subsequent embryo development potential. In Experiment II, the IVM medium supplementation with L-car resulted in significant reduction ( $P < 0.05$ ) of cytoplasmic lipid content even in the FCS presence. Combined effects of 10 mM L-car in FCS-supplemented medium on MMP reduction ( $P < 0.05$ ), ROS production increase ( $P < 0.05$ ), and the negative effect ( $P < 0.05$ ) on embryonic development of BSA IVM medium supplementation, we can conclude that concentration of 5 mM L-car in the presence of FCS exceeded the results of the other groups. Based on previous experiments results, in a second step (Experiment III), the effects of supplementation with ALA (100  $\mu$ M), L-car (5 mM) or a combination of both treatments (ALA + L-car) during IVM culture, with 10% FCS were evaluated on subsequent embryo development and quality (assessed by total cell number and apoptosis rate), intracellular lipid and ROS content, in addition to embryonic cryotolerance. For this, oocytes were fertilized for 24 h and the presumptive zygotes *in vitro* cultured (IVC). Cleavage rate (48 hpi) and embryonic development until blastocyst stage (D7 IVC) were evaluated. Blastocysts were vitrified and subsequently warmed for post-cryopreservation embryo survival evaluation, after 24 h, and hatching rate, after 48 h IVC. The gene expression regulation of lipid metabolism related genes (lipogenesis regulation: SCD1, FASN and SREBP1;  $\beta$ -oxidation pathway regulation: CPT1B and CPT2), was also performed in this step. There were evaluated ALA and/or L-car supplemented oocytes during IVM culture, and the produced embryos. The treatments made in IVM step did not support the positive effects observed in the previous studies on the lipid content reduction and the improvement in oocyte development potential. They did not change the lipid content and therefore, embryonic cryotolerance. Despite this, there was an improvement in embryo quality by reduction of the apoptotic index and ROS production. Lipogenesis-related genes expression was influenced by the treatment conducted during IVM. However, for lipolysis-related genes, a potential positive effect

was losted and, may be need the treatment on IVC step. Therefore, further studies are necessary to assess the most appropriate IVP step to perform ALA, L-car and the combination of both treatments supplementation, aiming changes in lipid content, and consequently the embryonic cryotolerance.

**Keywords:** linolenic acid, L-carnitine, *in vitro* maturation, lipid content, embryo cryotolerance

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas ocorreram grandes melhorias nos sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões, com o aperfeiçoamento dos métodos de cultivo e novos conhecimentos sobre a fisiologia, ultra-estrutura e morfologia embrionária (GARDNER, 2008). Atualmente, um dos principais obstáculos associado com a utilização extensiva dessa tecnologia é a maior sensibilidade dos embriões PIV à criopreservação (SUDANO *et al.*, 2011).

A reduzida criotolerância de embriões bovinos PIV se deve, principalmente, ao seu excessivo conteúdo lipídico (SEIDEL, 2006; HORVATH *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007; LAPA *et al.*, 2011). A maior parte dos lipídios intracelulares em oócitos e embriões bovinos são os triacilgliceróis, os quais correspondem a 50% da massa lipídica total em embriões produzidos *in vivo*. No entanto, essa proporção pode alcançar até 88% da massa de lipídios em embriões produzidos *in vitro* (PEREIRA *et al.*, 2008). Embora esse acúmulo lipídico intracitoplasmático seja prejudicial à criotolerância, tem um papel fisiológico importante, pois funciona como um reservatório potencial de energia para o desenvolvimento embrionário inicial, antes da ativação de seu próprio genoma (KIM *et al.*, 2001; ZERON *et al.*, 2001; STURMEY *et al.*, 2009), e também atua na biossíntese da membrana plasmática (AARDEMA *et al.*, 2011).

Até o momento, não está claro o porquê e como ocorre esse acúmulo excessivo de lipídios em oócitos cultivados *in vitro*. Sabe-se que pode ser influenciado pelos suplementos utilizados no meio de cultivo indefinido, especialmente o soro fetal bovino (SFB) utilizado durante a maturação *in vitro* (MIV), do qual os oócitos absorvem lipídios que serão esterificados em triacilgliceróis e ésteres de colesterol e estes são armazenados em gotas de lipídios citoplasmáticas na forma de lipídios neutros (KIM *et al.*, 2001). Há uma grande necessidade em se compreender os mecanismos envolvidos na transferência e utilização dos lipídios

por parte dos oócitos e embriões em meios suplementados com fontes de ácidos graxos (BILBY *et al.*, 2006).

Outra possibilidade para explicar o excessivo conteúdo lipídico é a ocorrência de anormalidades no metabolismo energético do embrião, que afetam a função mitocondrial, levando ao decréscimo tanto na qualidade quanto na sobrevivência embrionária pós-criopreservação (SUDANO *et al.*, 2011). Todavia, isto ainda deve ser melhor investigado.

Acredita-se que o maior acúmulo de lipídios intracelulares em embriões PIV seja decorrente do efeito “Crabtree”, ou seja, a glicólise excessiva resultante da elevação na concentração celular de precursores para a síntese de lipídios (GARDNER *et al.*, 2000). Concomitantemente, ocorre um declínio na oxidação e redução celulares, afetando o metabolismo mitocondrial e prejudicando a metabolização dos complexos de lipídios a partir da  $\beta$ -oxidação (SUDANO *et al.*, 2011). Dessa forma, há a produção inadequada de energia (GARDNER *et al.*, 2000).

Todavia, o acúmulo excessivo de lipídios intracelulares durante o desenvolvimento embrionário *in vitro* prejudica a qualidade dos embriões PIV pelo aumento de sua sensibilidade ao estresse oxidativo e à criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2008; AL DARWICH *et al.*, 2010).

Para lidar com as baixas taxas de sucesso da criopreservação embrionária, duas estratégias podem ser adotadas: buscar modificar as técnicas de criopreservação ou as próprias células, tornando-as mais criotolerantes (SEIDEL, 2006). As modificações das técnicas geralmente melhoram os resultados, porém são limitadas. Já as modificações nos sistemas de PIV resultam na produção de embriões com melhor qualidade e maior resistência à criopreservação (SUDANO *et al.*, 2011).

O acúmulo de lipídios em oócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser alterados pela adição de moléculas como os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA – “polyunsaturated fatty acids”) nos meios de cultivo (PEREIRA *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2015). Particularmente, os PUFA da família Omega 3 (n-3) tem um papel importante no controle da lipogênese, assim como em eventos fisiológicos que reduzem a expressão gênica de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios (AL DARWICH *et al.*, 2010). Estudos recentes

relataram que a suplementação com L-carnitina (L-car) nos meios de cultivo promoveu a redução do conteúdo lipídico intracelular em embriões bovinos PIV (TAKAHASHI *et al.*, 2013; BALDOCEDA *et al.*, 2015) e em oócitos suínos MIV (SOMFAI *et al.*, 2011), podendo ser utilizada como um tratamento visando aumentar a criotolerância (BALDOCEDA *et al.*, 2015).

Com o intuito de aperfeiçoar os resultados da criopreservação de embriões bovinos PIV, este estudo foi conduzido com o objetivo principal de avaliar o impacto da suplementação do meio de MIV com ALA, associado ou não à L-car, sobre a maturação e qualidade do oócito, especialmente no que se refere ao metabolismo lipídico, e sobre o desenvolvimento e resistência à criopreservação dos embriões bovinos produzidos.

## 5. REFERÊNCIAS

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

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

AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M.H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK $\alpha$  phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v.93, p.30-36, 2010.

BALDOCEDA, L.; GAGNE, D.; FERREIRA, C.R.; ROBERT, C. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by L-carnitine. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.

BILBY, T.R.; BLOCK, J.; do AMARAL, B.C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F.T.; HANSEN, P.J.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **J. Dairy Science**, v.89, p.3891-3903, 2006.

CHILDS, S.; CARTER, S.; LYNCH, C.O.; SREENAN, J.M.; LONERGAN, P.; HENNESSY, A.A.; KENNY, D.A. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v.70, p.992–1003, 2008.

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

COMBELLES, C.M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the *in vitro* maturation of oocytes? **Reprod. Biomed. Online**, v.18, p.864-880, 2009.

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; CHILDS, S.; SREENAN, J.M.; WATERS, S.M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. **Theriogenology**, v.70, p.772–782, 2008.

DALVIT, G.C.; CETICA, P.D.; PINTOS, L.N.; BECONI, M.T. Reactive oxygen species in bovine embryo *in vitro* production. **Biocell**, v.29, p.209–212, 2005.

DUNNING, K.R.; CASHMAN, K.; RUSSEL, D.L.; THOMPSON, J.G.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental

competence and early embryo development. **Biology of Reproduction**, v.83, p.909-918, 2010.

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J.; A potencial role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.73, p.1195-1201, 2006.

FOULADI-NASHTA, A.A.; WONNACOTT, K.E.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; SINCLAIR, K.D.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, v.138, p.771–781, 2009.

GARDNER, D.K. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. **Reprod. Fertil. Develop.**, v.20, p.9-18, 2008.

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

HORVATH, G.; SEIDEL Jr., G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Theriogenology**, v.66, p.1026-1033, 2006.

JUMP, D. B.; CLARKE, S.D.; THELEN, A.T.; LIIMATA, M. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. **J. Lipid Res.**, v.35, p.1076-1084, 1994.

KERNER, J.; HOPPEL, C. Fatty-acid import into mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1486, p.1–17, 2000.

KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131–138, 2001.

LAPA, M.; MARQUES, C.C.; ALVES, S.P.; VASQUES, M.I.; BAPTISTA, M.C.; CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A.E.M.; BESSA, R.J.B; PEREIRA, R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reprod. Domest. Anim.**, v.46, p.904-910, 2011.

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

LEÃO, B.C.S. Efeitos da suplementação lipídica sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro. 2012. 87 f.



Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of in vitro-derived bovine embryos cultured in 5% de CO<sub>2</sub> in air or in 5% O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>. **Hum. Reprod.**, v.14, n.2, p.458-464, 1999.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULAD-NASHTA, A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction Research**, v.139, p. 979–988, 2010.

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

MC EVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.; SPEAKE, B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **J. Reprod. Fertil.**, v.118, p.163-170, 2000.

MORADO, S.A.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; DALVIT, G.C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.21, p.608–614, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 2ed., RR Donnelley: São Paulo, cap. 17, 975p., 2002.

PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v.40, p.283–298, 2001.

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

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. 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.322-332, 2008.

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

SAMPATH, H.; NTAMBI, J.M. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. **Annu. Rev. Nutr.**, v.25, p.317-340, 2005.

SAMPATH, H.; NTAMBI, J.M. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. **Nutrition Reviews**, v.62, p.333-339, 2004.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v.69, p.88-97, 2008.

SEIDEL Jr., G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.

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

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. **Reprod. Dom. Anim.**, v.44, p.50–58, 2009.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.O.; 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.1211-1220, 2011.

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

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

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77, p.190-201, 2007.

WU, G.Q.; JIA, B.Y.; LI, J.J.; FU, X.W.; ZHOU, G.B.; HOU, Y.P.; ZHU, S.E. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pig. **Theriogenology**, v.76, p.785–793, 2011.

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

ZERON, Y.A.; OCHERETNY, O.; KEDAR, A.; BOROCHOV, D.; SKLAN, D.; ARAV, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v.121, p.447-454, 2001.

## **CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os tratamentos propostos nesse estudo, com ALA e L-car na etapa de MIV demonstraram efeitos satisfatórios sobre a redução do acúmulo lipídico e aumento da qualidade oocitária, mesmo na presença de SFB. O comprometimento da produção embrionária na ausência da suplementação com SFB na MIV, viabiliza a utilização dos suplementos no sistema de PIV de embriões bovinos, uma vez que demonstraram efeitos positivos sobre o metabolismo lipídico em oócitos.

Entretanto, esses efeitos não foram continuados nos embriões produzidos oriundos dos oócitos tratados. Acredita-se que as condições do ambiente de cultivo e mesmo o momento da suplementação tenham influenciado nestes resultados. A expressão dos genes relacionados à lipogênese sofreram influência do tratamento com os suplementos realizado na MIV. Porém, para os genes relacionados à lipólise, um possível efeito positivo foi perdido.

Portanto, mais estudos são necessários para avaliar a etapa mais adequada da PIV para se realizar a suplementação com ALA, L-car e a associação de ambos os tratamentos, objetivando alterar o conteúdo lipídico e consequentemente a criotolerância embrionária.