

**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

L437a Leão, Beatriz Caetano da Silva
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
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
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
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>	13
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

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

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>.....	41
RESUMO.....	41
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
Reagentes químicos.....	45
Obtenção e seleção dos oócitos.....	45
Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	46
Avaliação da maturação nuclear.....	46
Avaliação da maturação citoplasmática.....	47

<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
RESULTADOS	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
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

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	65
RESUMO	65
INTRODUÇÃO	67
MATERIAL E MÉTODOS	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 μ M de ácido linolênico na presença de SFB (a1) e BSA (b1); D. sonda fluorescente H₂DCFDA. 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*

CO₂- 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

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HO• - radical hidroxila

ROO• - radical peroxila

H₂DCFDA - 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
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}
PHE - Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina
PIV - Produção *in vitro* de embriões
PTGER2 - genes Knockout para o receptor da PGE₂
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 μ 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 μ 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 μ 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 β -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 μ 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 μ 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 μ 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; β -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 β -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.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metabolismo lipídico

A nível celular, os lipídios funcionam como fonte de energia e são componentes críticos para sua estrutura física e funcional. O conteúdo e a composição de lipídios em oócitos e embriões podem influenciar sua competência e, seu impacto pode ser crítico, particularmente durante a criopreservação (SANTOS *et al.*, 2008b). Todavia, sabe-se que os ácidos graxos são utilizados como fonte de energia durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (FERGUSON *et al.*, 2006), até o estágio de 8 a 16 células, que em bovinos corresponde à ativação do genoma do próprio embrião e início da síntese *de novo* de transcritos (LIM *et al.*, 1999).

A utilização das reservas de lipídios intracelulares para o metabolismo celular consiste, primeiramente, na hidrólise dos triacilgliceróis para liberação de moléculas de ácidos graxos de cadeia longa e glicerol. No citoplasma, essas moléculas de ácidos graxos sofrem uma reação enzimática, mediada pela acil-CoA sintetase, e geram as acil-CoA. Nessa forma, são transportadas para dentro das mitocôndrias pela carnitina palmitoil transferase 1B (CPT1B), processo esse facilitado pela ligação

da molécula de acil-CoA com a L-carnitina (NELSON e COX, 2002). Uma vez no interior das mitocôndrias, a enzima CPT2 desliga a L-car da molécula de acil-CoA, a qual entra para a via da β -oxidação e é convertida em acetil-CoA para ser metabolizada no ciclo do ácido carboxílico e fosforilação oxidativa, gerando ATP. Portanto, a enzima CPT1B limita a taxa de β -oxidação e requer a L-car como co-fator (SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2012), já que sua ligação com a molécula de acil-CoA torna-se necessária para o transporte do complexo acil-carnitina-CoA até o interior da mitocôndria.

Em oócitos bovinos, os ácidos palmítico e oléico são os tipos mais comuns de triacilgliceróis, correspondendo respectivamente a 32 e 25% do total de ácidos graxos nessas células (MC EVOY *et al.*, 2000). Para efeitos de comparação, o metabolismo de uma molécula de ácido palmítico produz 106 moléculas de ATP e o de uma molécula de glicose, 27 a 31 moléculas de ATP. Portanto, a utilização da reserva de lipídeos intracelulares torna-se mais econômica para o metabolismo embrionário (SUTTON- MCDOWALL *et al.*, 2012).

2.2. Efeito do cultivo de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* em meios suplementados com ácidos graxos poliinsaturados

Está bem estabelecido que os PUFA são absolutamente necessários para numerosos processos fisiológicos e metabólicos, incluindo crescimento, reprodução, visão e desenvolvimento cerebral (WATHES *et al.*, 2007). Os ácidos graxos Omega-3 (n-3), como por exemplo o linolênico, são considerados essenciais, já que o organismo animal é incapaz de produzi-los por não possuir as enzimas dessaturases apropriadas para sua síntese (SAMPATH e NTAMBI *et al.*, 2004; WATHES *et al.*, 2007). Especificamente, os ácidos graxos n-3 eicosapentaenóico e o docosaexaenóico podem ser obtidos a partir da gordura de peixe e outros animais marinhos (SAMPATH e NTAMBI, 2005).

Na célula, esses ácidos graxos funcionam como parte essencial para formação da dupla camada de fosfolipídios da membrana plasmática e atuam como precursores para moléculas sinalizadoras, como os esteróides e prostaglandinas (PG) (SAMPATH e NTAMBI, 2005; SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2012).

Além dessas funções bem estabelecidas para os PUFA, nos últimos anos o entendimento de que os lipídios são mais do que um reservatório estático de energia levou à descoberta de várias vias pelas quais os ácidos graxos podem afetar a expressão gênica (SAMPATH e NTAMBI, 2005). Relatos anteriores demonstraram que dentro de horas após a suplementação animal com dietas ricas em PUFA, houve ativação rápida e contínua de genes responsáveis pela oxidação lipídica e redução da expressão de genes que codificam enzimas para a síntese lipídica (JUMP *et al.*, 1994).

Particularmente, os PUFA das famílias 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). Como exemplo, eles reprimem a transcrição das esteroil-CoA dessaturases (SCD do inglês, “stearoyl-CoA desaturase”) (CHOI *et al.*, 2000; PARIZA *et al.*, 2001) e da enzima sintetizadora de ácidos graxos (FAS do inglês, “fatty acid synthase”), enzimas chave envolvidas na síntese de ácidos graxos (SAMPATH e NTAMBI, 2005; AL DARWICH *et al.*, 2010). Também foi recentemente demonstrado que os PUFA podem suprimir a expressão de genes lipogênicos a partir de pelo menos três receptores nucleares (PPAR, LXR e HNF-4 α), e de fatores de transcrição, como o SREBP (“Sterol-regulatory element binding protein”), considerado o fator chave de regulação da síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis (SAMPATH e NTAMBI, 2005; AL DARWICH *et al.*, 2010).

Por outro lado, outros genes demonstram ter sua expressão aumentada pela suplementação com PUFA como os carnitina palmitoil transferase 1 e 2 (CPT-1 e CPT-2), envolvidos na transcrição dos transportadores de moléculas de ácidos graxos ligadas à coenzima A (acil-CoA) do citoplasma para o interior das mitocôndrias, onde serão oxidadas pela via da β -oxidação (DUNNING *et al.*, 2010).

Além dos ácidos graxos serem potenciais fontes de energia, recentes trabalhos sugerem um efeito indireto dos PUFA sobre a regulação de alguns eventos associados à maturação oocitária (MAREI *et al.*, 2009). Os PUFA modulam o balanço entre a produção de protaglandina E2 (PGE2) e PGF2 α (COYNE *et al.*, 2008). A PGE2 é considerada um mediador crítico para a maturação oocitária e expansão das células do cumulus (MAREI *et al.*, 2009), uma vez que, em ratos, a

inibição na produção da PGE2 via inibidores da prostaglandina-endoperoxidase sintetase (PTGS2) ou por Knockout gênico para o receptor da PGE2 (PTGER2) demonstrou diminuir a expansão das células do cumulus e a maturação oocitária, reduzindo a taxa de fertilização *in vitro*. Desta forma, este efeito indireto poderia explicar observações anteriores do efeito benéfico dos PUFA sobre eventos associados à maturação oocitária, o que resulta em melhor potencial de desenvolvimento e qualidade embrionária (MAREI *et al.*, 2009).

O efeito dos PUFA sobre o desenvolvimento dos complexos cumulus-oócito pode ser parcialmente mediado a partir de alterações na composição do fluido folicular, que consiste do microambiente que cerca os oócitos durante seu crescimento e maturação (FOULADI-NASHTA *et al.*, 2009). Isto porque o perfil de ácidos graxos do fluido folicular pode ser correlacionado com o tipo e quantidade de PUFA fornecidos na alimentação (CHILDS *et al.*, 2008). Todavia, a suplementação com PUFA não altera a composição de ácidos graxos nos oócitos (STURMEY *et al.*, 2009). Acredita-se que a ação dos PUFA, como acima exposto, se dê por meio da atuação sobre mecanismos reguladores da expressão de genes de metabolismo lipídico (SAMPATH e NTAMBI, 2005) e, indiretamente, sobre a maturação do oócito e a expansão das células do cumulus, eventos críticos para o desenvolvimento oocitário e fertilização (MAREI *et al.*, 2010).

O aumento da criotolerância embrionária poderia ser a consequência da alteração/redução do conteúdo lipídico do oócito e, subsequentemente, do embrião. Todavia, até o presente momento, poucos trabalhos demonstraram efeitos benéficos da adição de PUFA n-3 no sistema de PIV sobre a criotolerância embrionária (AL DARWICH *et al.*, 2010; LEÃO, 2012).

2.3. Efeitos da suplementação com L-carnitina no sistema de PIV de embriões bovinos

A L-carnitina (L-car) é um regulador metabólico que desempenha um papel crucial na via de β -oxidação por catalizar o transporte de ácidos graxos até a matriz mitocondrial para a geração de ATP (KERNER e HOPPEL, 2000), aumentando assim o metabolismo lipídico nesta organela (BALDOCEDA *et al.*, 2015).

A energia produzida pela via da β -oxidação mitocondrial é responsável por suportar processos críticos do desenvolvimento associados à maturação nuclear (retomada da meiose) e citoplasmática, bem como o desenvolvimento embrionário (DUNNING *et al.*, 2010). O aumento da atividade mitocondrial promovida pela suplementação *in vitro* com L-car demonstrou estar relacionado à melhora da maturação oocitária e no aumento do potencial de desenvolvimento embrionário em ratos (ABDELRAZIK *et al.*, 2009; DUNNING *et al.*, 2010), suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011) e bovinos (PHONGNIMITR *et al.*, 2013).

Dunning *et al.* (2010) demonstraram que o aumento da competência oocitária, observada pelo aumento no desenvolvimento de blastocistos e do número de células da massa celular interna, foi mediada pelo aumento na expressão do gene CPT1B nos complexos cumulus-oócitos de camundongos durante a maturação. Sabe-se que este gene é limitante para a taxa de β -oxidação e requer a L- car como co-fator (SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2012),

Além do efeito regulador do metabolismo, a L-car atua como antioxidante para as células animais, reduzindo a peroxidação lipídica e apoptose induzida pelo estresse oxidativo (YE *et al.* 2010). A suplementação com L-car demonstrou reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – “reactive oxygen species”) durante a MIV de oócitos suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011). Este efeito é importante, uma vez que a produção de ROS é evidente durante a maturação oocitária (DALVIT *et al.*, 2005), e pode flutuar dependendo das condições de cultivo, podendo influenciar a progressão meiótica (MORADO *et al.*, 2009). As ROS são moléculas derivadas do oxigênio e formadas pelas mitocôndrias como produtos intermediários de metabolismo celular (COMBELLES *et al.*, 2009).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação com ácido linolênico, associado ou não à L-carnitina, durante a etapa de MIV sobre a maturação e qualidade do oócito, especialmente no que se refere ao metabolismo lipídico, e sobre o desenvolvimento e resistência à criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

4. HIPÓTESE

A suplementação com ácido linolênico e/ou L-carnitina no meio de MIV exerce efeito benéfico sobre a maturação e aquisição da competência de desenvolvimento de oócitos bovinos, além de reduzir o acúmulo lipídico intracelular por alterar os padrões de expressão de genes ligados ao metabolismo de lipídios. Como consequência, promove o aumento da criotolerância, sem prejudicar o desenvolvimento embrionário.

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 α 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- β -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 CO₂ in air or in 5% O₂, 5% de CO₂ and 90% N₂. **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 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*

RESUMO - Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação durante a etapa de maturação *in vitro* (MIV), com diferentes concentrações de ácido linolênico (0, 10, 50 e 100 μM de ALA) na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA), sobre o acúmulo lipídico intracitoplasmático e atividade mitocondrial, bem como sobre a maturação oocitária e potencial de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. A suplementação com diferentes concentrações de ALA durante a MIV não afetou ($P>0,05$) a taxa de maturação nuclear (70,02 - 75,45%) e distribuição citoplasmática das mitocôndrias, que apresentaram classificação predominantemente geral (89,71 - 92,27%), independente do suplemento proteico utilizado. De forma semelhante, não houve efeito ($P>0,05$) dos suplementos proteicos (SFB vs BSA) sobre a taxa de oócitos em metáfase II (72,19 - 74,83%) e distribuição mitocondrial após a MIV (90,26 - 91,88%). O potencial de membrana mitocondrial (PMM) aumentou após suplementação com 100 μM (1,20 unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) e 0 μM de ALA (1,17 UAF), em relação às concentrações de 10 μM (0,83 UAF) e 50 μM de ALA (0,74 UAF). Entretanto, o suplemento proteico utilizado não alterou ($P>0,05$) o potencial de membrana mitocondrial (0,92 - 1,05 UAF). Considerando apenas os grupos suplementados com SFB nota-se que a concentração de 100 μM de ALA reduziu ($P<0,05$) o conteúdo lipídico (186,6 pixels) e o conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) em oócitos bovinos (0,80 UAF), em relação ao grupo Controle (0 μM de ALA; 218,0 pixels e 1,27 UAF, respectivamente), se igualando ($P>0,05$) ao conteúdo observado nos oócitos imaturos (178,4 pixels e 1,00 UAF, respectivamente). Entretanto, a suplementação com as diferentes concentrações de ALA na presença de BSA não alterou ($P>0,05$) o conteúdo lipídico (187,7 - 205,1 pixels) e o nível intracelular de ROS (0,93 - 1,49 UAF). As taxas de clivagem (80,8 - 86,0%) e de blastocistos (32,2 - 39,2%) não foram alteradas

($P > 0,05$) pelas diferentes concentrações de ALA utilizadas na MIV de oócitos. Todavia houve redução significativa ($P < 0,05$) na taxa de blastocistos quando a etapa de MIV foi realizada na presença de BSA (29,0 vs 39,3, respectivamente para os grupos BSA e SFB). Em conclusão, a adição de 100 μM de ALA em meio de MIV suplementado com SFB resultou em redução do acúmulo lipídico citoplasmático e do nível intracelular de ROS, assim como aumento do potencial de membrana mitocondrial. Nenhum desses efeitos prejudicou a maturação oocitária e o subsequente potencial de desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: ácido linolênico, maturação *in vitro*, acúmulo lipídico, oócito, bovino

1. INTRODUÇÃO

A etapa de maturação do oócito é determinante para a subsequente qualidade embrionária (RÄTY *et al.*, 2011; DEL COLLADO *et al.*, 2015). Durante esta etapa, o oócito passa por modificações em processos essenciais, necessários para suportar não apenas a posterior ativação do genoma embrionário, mas também o desenvolvimento até o estágio de blastocisto, uma vez que o gameta feminino é o único doador citoplasmático durante a formação do zigoto (GILBERT, 2003).

Oócitos bovinos maturados *in vitro* apresentam aumento significativo no número de gotas lipídicas citoplasmáticas, em relação aos oócitos em estágio de vesícula germinativa (AARDEMA *et al.*, 2011). A alteração no conteúdo lipídico dos oócitos pode ser influenciada pelo ambiente de cultivo dessas células, particularmente pela presença de certos suplementos, como por exemplo o soro fetal bovino (SFB) e suplementos lipídicos, como os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA; DUNNING *et al.*, 2014). Oócitos bovinos maturados na presença de 10% de SFB acumulam mais triacilgliceróis e colesterol do que aqueles maturados em condições livres de soro, pois absorvem os lipídios presentes no SFB, os quais são armazenados em gotas de lipídios citoplasmáticas (KIM *et al.*, 2001).

Apesar deste efeito deletério do SFB sobre o aumento do acúmulo lipídico, sugere-se que os demais elementos presentes neste suplemento promovam além da melhora da taxa de maturação nuclear, a migração e reposicionamento de organelas durante a etapa de MIV (DEL COLLADO *et al.*, 2015). Por esta razão, tem sido difícil evitar ou encontrar um substituto adequado para o soro em formulações de meios, particularmente para laboratórios com fins comerciais. O SFB e a albumina sérica bovina (BSA – “bovine seric albumin”) são os suplementos protéicos frequentemente utilizados para melhorar a produção *in vitro* de embriões bovinos (LEIVAS *et al.*, 2011).

A formação excessiva de gotas de lipídios vem sendo associada à alterações na função mitocondrial, o que afeta o metabolismo lipídico e compromete a viabilidade oocitária (PLOURDE *et al.*, 2012). A oxidação mitocondrial é a via pela qual ocorre a síntese de maior parte da energia no oócito (DUMOLLARD *et al.*,

2004). Esta energia é necessária para suportar a maturação nuclear (retomada da meiose) e citoplasmática, assim como o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (DUNNING *et al.*, 2010). Porém, o metabolismo aeróbico mitocondrial resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – “reactive oxygen species”), as quais são derivadas de moléculas de oxigênio, como produtos intermediários de metabolismo celular (COMBELLES *et al.*, 2009). A produção de ROS é elevada durante a maturação do oócito (DALVIT *et al.*, 2005), mas pode flutuar dependendo das condições de cultura, podendo influenciar a progressão meiótica (MORADO *et al.*, 2009).

Evidências indicam que o acúmulo de lipídios em oócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser alterados pela suplementação dos meios de cultivo com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA – “polyunsaturated fatty acids”) (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). O ácido linolênico (ALA; 18:3) é a principal fonte de PUFA n-3 obtido pela dieta, sendo encontrado principalmente nos cloroplastos de vegetais verdes, capim e linhaça (DEWHURST *et al.*, 2003). É um constituinte natural do plasma e fluido follicular em bovinos. Concentrações apropriadas de ALA no meio de MIV podem induzir alterações moleculares associadas à maturação de oócitos, levando ao aumento do potencial de desenvolvimento oocitário e melhora da qualidade embrionária (MAREI *et al.*, 2009).

Os efeitos benéficos do ALA foram associados ao aumento da síntese de prostaglandina E2 (PGE2), concentração de cAMP intracelular e fosforilação das “mitogen-activated protein kinases” (MAPKs) 1 e 3 (MAPK1 e MAPK3) nos complexos cumulus-oócito (COCs; MAREI *et al.*, 2009). A PGE2 é considerada um mediador crítico para a maturação oocitária e expansão das células do cumulus (CALDER *et al.*, 2001). A estimulação da PGE2 resulta na elevação de cAMP nas células do cumulus e conseqüentemente na ativação das MAPKs (LIANG *et al.*, 2005), as quais podem resultar no aumento da taxa de maturação nuclear de oócitos bovinos (FISSORE *et al.*, 1996).

Assim, os potenciais efeitos benéficos do ALA, adicionado como suplemento do meio de MIV, incluem a indução de alterações moleculares associadas à maturação de oócitos, levando ao aumento do potencial de desenvolvimento oocitário e melhora da qualidade embrionária (MAREI *et al.*, 2009). Apesar disso, pouco se sabe sobre o metabolismo de lipídios (SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2012) e ainda permanecem obscuros os mecanismos pelos quais os PUFA traduzem seus sinais sobre o metabolismo lipídico em oócitos e embriões (AL DARWICH *et al.*, 2010).

Este estudo foi desenvolvido para testar a hipótese de que a suplementação com ALA no meio de MIV exerce efeito benéfico sobre a maturação e aquisição da competência de desenvolvimento de oócitos bovinos, além de reduzir o acúmulo lipídico intracelular em oócitos bovinos. Como consequência, espera-se a redução do acúmulo lipídico intracitoplasmático, sem prejudicar o desenvolvimento embrionário. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação com diferentes concentrações de ALA, na presença de SFB ou BSA, sobre o acúmulo lipídico intracitoplasmático e atividade mitocondrial, bem como sobre a maturação e potencial de desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes químicos

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Caso contrário, encontram-se especificados no texto. Todos os reagentes são testados para o cultivo celular ou embrionário. O ALA (L2376) foi diluído em DMSO (concentração final de DMSO < 0,1%), para obter uma solução estoque de 90 mM, a qual foi aliqüotada e armazenada a - 20°C. No momento da utilização, a solução estoque de ALA foi diluída em meio de maturação (B-199) para obtenção das concentrações finais de 10, 50 e 100 µM.

O meio de lavagem H-199 foi constituído de TCM-199 (Tissue Culture Medium 199 (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 20 mM de HEPES, 5mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/mL

de amicacina. O meio de maturação (B-199) foi constituído de TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 100 UI/mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de SFB (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) ou 6 mg/mL (0,6%) de BSA. O meio de fertilização foi TALP-FIV, suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 6 mg/mL de BSA "FA-free" fração V, 25 mM de bicarbonato de sódio, 13 mM de lactato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 40 µL/mL de solução de PHE (concentrações finais de 20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina e 2 µM epinefrina), e 10 µg/mL de heparina. O meio de cultivo utilizado foi SOFaa, suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BEM aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB.

Obtenção e seleção dos oócitos

Os complexos cumulus-oócito (COCs) foram obtidos a partir de ovários de vacas abatidas em frigoríficos na região de Araçatuba-SP e transportados até o laboratório em garrafas contendo solução salina (30-35 °C). Folículos ovarianos entre 3-8 mm de diâmetro foram puncionados com seringa acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL, que permaneceu em repouso por 15 minutos para decantação do conteúdo, posteriormente inspecionado para seleção dos COCs. Somente COCs circundados por pelo menos quatro camadas de células do cumulus compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação. O tempo médio da seleção até o início do cultivo foi de aproximadamente 1 hora.

Maturação *in vitro* dos oócitos

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 e uma vez em meio de maturação B-199. Foram transferidas 50 estruturas para cada poço da placa de cultivo (NUNC, Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), contendo 500 µL de meio B-199, sem óleo mineral. O meio de maturação foi suplementado com concentrações crescentes de ALA (0, 10, 50 e 100 µM),

associadas à suplementação com 10% de SFB ou 0,6% de BSA. O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar, a 38,5°C e com máxima umidade, durante 22 horas.

Avaliação da maturação nuclear

COCs imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora) e após a MIV (22 horas) foram transferidos para microtubos contendo 200 µL de solução de hialuronidase 0,2%, diluída em PBS acrescido de 1% PVP (PBS-PVP), e foram desnudados com pipetagens sucessivas. Então foram fixados em solução de paraformaldeído (4%) à temperatura ambiente, por 1 hora. Posteriormente, os oócitos foram permeabilizados com Triton X-100 (0,5%, v/v) em solução de citrato de sódio (0,1%), por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os oócitos foram incubados em solução de Hoechst 33342 (1 µg/mL de PBS-PVP) por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Após serem lavados duas vezes em PBS-PVP, os oócitos corados foram avaliados imediatamente em microscópio equipado com epifluorescência (IX51, Olympus, Tóquio, Japão), sob excitação de 404 nm e emissão de 526 nm para determinação do estágio da meiose. Os oócitos foram classificados em imaturos (configuração nuclear em vesícula germinativa - VG), maduros (metáfase II - MII) ou nos estágios intermediários da meiose (quebra da vesícula germinativa - GVBD, metáfase I - MI, anáfase I - AI ou telófase I - TI), como apresentado na Figura 1.

Avaliação da maturação citoplasmática

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e da distribuição citoplasmática das mitocôndrias

A distribuição citoplasmática das mitocôndrias e o PMM foram avaliados pela coloração com MitoTracker Red (CMXRos, Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. COCs imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora) e após a MIV (22 horas) foram desnudados (como descrito no item anterior) e lavados duas vezes em PBS-PVP. Os oócitos foram incubados no escuro por 30 minutos em solução de PBS-PVP acrescido de

500 nM de MitoTracker Red, em temperatura de 37°C. Posteriormente foram lavados duas vezes em PBS-PVP e avaliados imediatamente em microscópio equipado com epifluorescência (IX51, Olympus, Tóquio, Japão), sob excitação de 543 nm e emissão de 575 nm. Os oócitos avaliados após 0 e 22 horas de maturação foram classificados pela distribuição citoplasmática de mitocôndrias (Figura 1; distribuição periférica: oócitos imaturos; distribuição geral: oócitos maduros; transição: oócitos parcialmente maduros) e fotografados. As imagens obtidas foram armazenadas e posteriormente analisadas pelo software Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Versão 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, após conversão em escala de cinza. Foi realizada a delimitação dos oócitos para determinação da área e da intensidade do sinal de fluorescência (pixels) pela área. A intensidade do sinal de background foi subtraída dos valores obtidos nas fotos dos tratamentos. O grupo de oócitos imaturos foi escolhido como calibrador e o valor de cada tratamento foi dividido pela média do calibrador para gerar o nível de expressão relativa (unidades arbitrárias de fluorescência). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o PMM.

Quantificação lipídica intracitoplasmática

Para avaliação do acúmulo lipídico intracitoplasmático, os COCs imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora) e após a MIV (22 horas) foram desnudados, como descrito anteriormente e lavados duas vezes em PBS-PVP. Os oócitos foram fixados em solução de paraformaldeído (4%) à temperatura ambiente, por 2 horas. Após a fixação, os mesmos foram lavados em PBS e imersos em solução de etanol 50% em água destilada, durante 2 minutos. Em seguida foram corados com Sudan Black B 1% (corante lipofílico) diluído em etanol 70%, por 2 minutos. Posteriormente, foram imersos 3 vezes, por 5 minutos cada em solução de etanol 50% e, em sequência, em água destilada acrescida de 1% PVP. Então, os oócitos foram colocados em lâminas com glicerol para serem analisados no microscópio de luz (IX51, Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram fotografadas (Figura 1) e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) após conversão em escala de cinza e delimitação dos oócitos, para determinação da área e da intensidade média (pixels) pela área. O grupo de

oócitos imaturos foi escolhido como calibrador e o valor de cada tratamento foi dividido pela média do calibrador para gerar o nível de expressão relativa.

Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína

Os níveis intracelulares de ROS (peróxido de hidrogênio: H_2O_2 , radical hidroxila: $HO\cdot$, radical peroxila: $ROO\cdot$) foram quantificados por meio da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA ; Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) de acordo com Rocha-Frigoni *et al.* (2014). COCs imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora) e após a MIV (22 horas) foram desnudados, como descrito anteriormente e lavados duas vezes em PBS-PVP. Em seguida foram incubados em $5 \mu M$ de H_2DCFDA durante 30 minutos, no escuro, a $38,5^\circ C$ e 5% CO_2 em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS-PVP e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (IX51, Olympus, Tóquio, Japão), sob excitação de 495 nm e emissão de 520 nm. As imagens obtidas (Figura 1) foram posteriormente analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) após conversão em escala de cinza, para quantificação da intensidade de fluorescência emitida. Foi realizada a delimitação dos oócitos para determinação da área e da intensidade do sinal de fluorescência (pixels) pela área. A intensidade do sinal de background foi subtraída dos valores obtidos nas fotos dos tratamentos. O grupo de oócitos imaturos foi escolhido como calibrador e o valor de cada tratamento foi dividido pela média do calibrador para gerar o nível de expressão relativa (unidades arbitrárias de fluorescência). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o conteúdo intracelular de ROS.

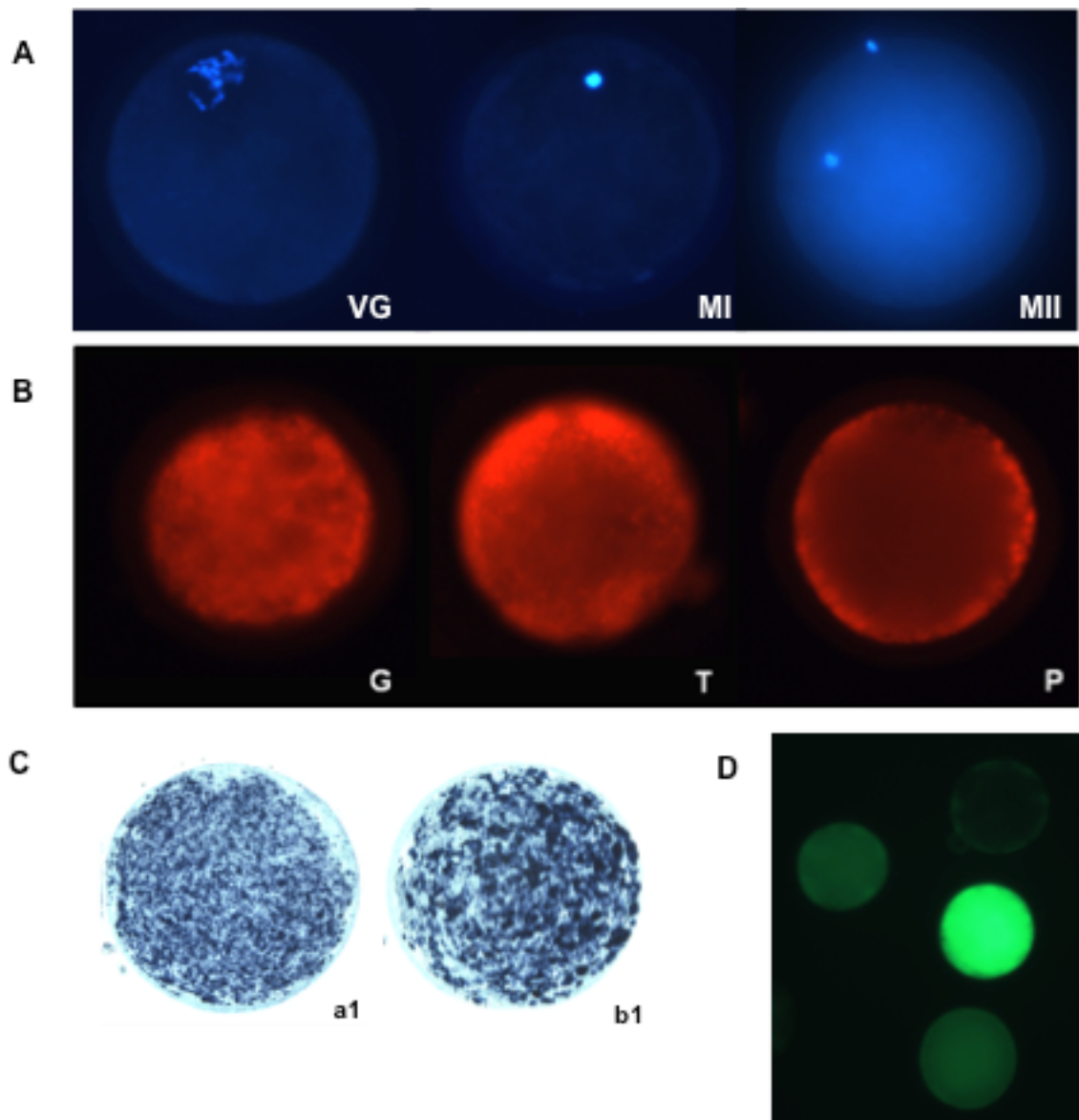


Figura 1. Fotomicrografias de oócitos bovinos corados com: A: Sonda fluorescente Hoechst 33342 para identificação dos núcleos (em azul). Classificação de acordo com a configuração nuclear em: vesícula germinativa (VG), metáfase da meiose I (MI) e metáfase da meiose II (MII); B: sonda fluorescente MitoTracker 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 μ M de ácido linolênico na presença de SFB (a1) e BSA (b1); D: sonda fluorescente H₂DCFDA. Quanto maior a intensidade da fluorescência, maior o conteúdo intracelular de espécies reativas do oxigênio.

Produção *in vitro* dos embriões

Ao término da etapa de MIV (descrita no item Maturação *in vitro* dos oócitos), os COCs foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV). Para o preparo do sêmen, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36°C, durante 40 segundos e seu conteúdo centrifugado em gradiente de densidade descontínua de Percoll (250 µL de Percoll 45% sobre 250 µL de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL; Pharmacia, Uppsala, Sweden) durante 7 minutos a 2750 rpm. O sedimento recuperado foi avaliado quando ao volume, concentração e motilidade espermática. Os espermatozoides foram adicionados à gota de fertilização na concentração de 2×10^6 células/mL. Os COCs (25/gota de 90 µL) e os espermatozoides foram coincubados em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5 °C, por até 22 horas. O dia da fertilização foi definido como Dia 0 (D0).

Após a etapa da FIV, os prováveis zigotos foram pipetados sucessivamente para a retirada do excesso de células do cumulus e transferidos para o meio de CIV. O cultivo embrionário foi realizado em poços de placas NUNC contendo 500 µL de meio SOFaa, sem óleo mineral. Esta etapa foi conduzida em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e temperatura de 38,5 °C por até sete dias. Após 72 horas de cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário avaliado às 168 hpi (D7).

Delineamento experimental

Neste estudo foi avaliado o impacto da suplementação do meio de MIV com diferentes concentrações de ALA sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos (acúmulo lipídico intracelular, distribuição citoplasmática e PMM e acúmulo intracelular de ROS), além do potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Oócitos bovinos foram MIV durante 22 horas em meio B-199 suplementado com 10% SFB ou 0,6% BSA, acrescido de três concentrações crescentes de ALA, baseadas em estudo de Marei *et al.* (2009), conforme os grupos experimentais apresentados na Figura 2.

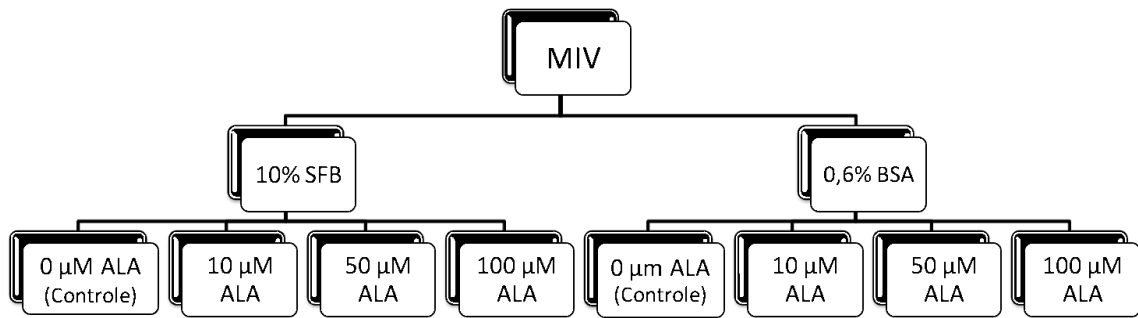


Figura 2. Esquema ilustrativo do delineamento experimental de acordo com a composição dos meios de maturação *in vitro* utilizados no Experimento I.

Desta maneira, o estudo obedeceu a um esquema fatorial 2×4 (2 suplementos proteicos: 10% SFB ou 0,6% BSA; e 4 concentrações diferentes de ALA), em um total de 8 grupos experimentais. Ainda, um grupo de oócitos foi avaliado imediatamente após a aspiração (Controle 0 horas). Assim, após 0 e 22 horas de MIV foram realizadas as seguintes avaliações nos oócitos:

- 1) Avaliação da maturação nuclear, a partir da determinação do estágio da meiose (tempo 0 hora: $n = 158$; 22 horas: $n = 1061$)
- 2) Análise das mitocôndrias: Distribuição citoplasmática e potencial de membrana mitocondrial (tempo 0 hora: $n = 186$; 22 horas; $n = 1155$)
- 3) Mensuração do conteúdo lipídico intracitoplasmático (tempo 0 hora; $n = 232$; 22 horas; $n = 656$)
- 4) Mensuração do conteúdo intracelular de ROS (tempo 0 hora; $n = 107$; 22 horas; $n = 277$)
- 5) Avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro* ($n = 1232$)

Análise Estatística

O experimento foi repetido de 4 a 6 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata foi utilizado um poço da placa de cultivo celular contendo 50 oócitos para cada grupo experimental, sendo este considerado a unidade experimental. A taxa de blastocistos foi calculada no D7 do CIV, a partir do número de oócitos inseminados. Os dados foram analisados pela fração de oócitos ou embriões cultivados atingindo os estágios determinados, reportada em termos de

porcentagem. As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o modelo “General linear model” (GLM) do SAS statistical software package 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) considerando um modelo estatístico fatorial completo que inclui o suplemento de macromolécula do meio de maturação (10% SFB ou 0,6% BSA), o tratamento (diferentes concentrações de ALA) e possíveis interações. Quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey. As médias foram apresentadas na forma de quadrados mínimos \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas. Na ausência de interações significativas, apenas o principal efeito foi apresentado nos resultados.

3. RESULTADOS

Maturação nuclear

Não houve interação entre as diferentes concentrações de ALA e o suplemento proteico ($P > 0,05$) sobre o estágio da meiose. Desta forma, os resultados estão apresentados separadamente, de acordo com os efeitos principais. Dos oócitos imaturos avaliados, 88,90% encontravam-se em estágio de VG, 11,10% em MI e 0,00% em MII (dados não demonstrados nas tabelas).

A suplementação com diferentes concentrações de ALA durante a MIV não afetou ($P > 0,05$) a proporção de oócitos em metáfase II (MII; 70,02 - 75,45%), independente do suplemento proteico utilizado (Tabela 1).

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

Grupo	VG	Int.	MII
0 μ M	6,75 \pm 2,30%	17,78 \pm 3,41%	75,45 \pm 3,51%
10 μ M	3,43 \pm 2,30%	23,20 \pm 3,41%	73,37 \pm 3,51%
50 μ M	2,40 \pm 2,30%	22,42 \pm 3,41%	75,20 \pm 3,51%
100 μ M	6,92 \pm 2,30%	23,07 \pm 3,41%	70,02 \pm 3,51%

Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). VG: oócitos em estágio de vesícula germinativa; Int.: oócitos em fases intermediárias da meiose I; MII: oócitos em metáfase II. Os oócitos foram considerados imaturos quando classificados em VG e Int. e maduros em MII.

De forma semelhante, não houve efeito ($P > 0,05$) dos suplementos proteicos (SFB vs BSA) sobre a taxa de oócitos em MII (72,19 - 74,83%), conforme apresentado na Tabela 2.

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

Grupo	VG	Int.	MII
SFB	6,44 \pm 1,63%	18,74 \pm 2,41%	74,83 \pm 2,48%
BSA	3,31 \pm 1,63%	24,49 \pm 2,41%	72,19 \pm 2,48%

Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). VG: oócitos em estágio de vesícula germinativa; Int.: oócitos em fases intermediárias da meiose I; MII: oócitos em metáfase II. Os oócitos foram considerados imaturos quando classificados em VG e Int. e maduros em MII.

PMM e distribuição citoplasmática das mitocôndrias

O resultado da avaliação do PMM, mensurado em unidades arbitrárias de fluorescência encontra-se apresentado nas Tabelas 3 e 4. Não foi observada interação ($P < 0,05$) entre o suplemento proteico (SFB ou BSA) e as concentrações de ALA utilizadas. Portanto, os resultados estão apresentados separadamente, com os efeitos principais.

As diferentes concentrações de ALA utilizadas durante a MIV alteraram ($P < 0,05$) o PMM dos oócitos tratados (Tabela 3), observando-se sua elevação com 100 μ M (1,20 UAF) e 0 μ M de ALA (1,17 UAF), em relação às concentrações de 10

μM (0,83 UAF) e 50 μM de ALA (0,74 UAF).

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.

Grupo	UAF
0 μM	1,17 \pm 0,08 ^a
10 μM	0,83 \pm 0,08 ^b
50 μM	0,74 \pm 0,08 ^b
100 μM	1,20 \pm 0,08 ^a

Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. ^{abc}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Como apresentado da Tabela 4, o suplemento proteico utilizado não alterou (P>0,05) o potencial de membrana mitocondrial (0,92 – 1,05 UAF).

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).

Grupo	UAF
SFB	1,05 \pm 0,05
BSA	0,92 \pm 0,05

Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados da distribuição mitocondrial encontram-se apresentados separadamente, como efeitos principais, uma vez que não houve interação entre as diferentes concentrações de ALA e os suplementos proteicos (P>0,05). Os oócitos imaturos analisados apresentaram 36,40% de distribuição periférica, 18,30% de distribuição em transição e 45,30% geral pelo citoplasma (dados não apresentados nas tabelas).

As diferentes concentrações de ALA utilizadas durante a MIV não interferiram (P>0,05) na distribuição citoplasmática das mitocôndrias, independente da suplementação com SFB ou BSA (Tabela 5), apresentando classificação predominantemente geral (89,71 - 92,27%).

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

Grupo	Periférica	Transição	Geral
0 μ M	1,31 \pm 0,55%	7,04 \pm 2,85%	91,68 \pm 3,02%
10 μ M	0,88 \pm 0,55%	9,41 \pm 2,85%	89,71 \pm 3,02%
50 μ M	0,40 \pm 0,55%	9,00 \pm 2,85%	90,60 \pm 3,02%
100 μ M	0,54 \pm 0,55%	7,20 \pm 2,85%	92,27 \pm 3,02%

Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O suplemento proteico utilizado não alterou ($P > 0,05$) a maturação citoplasmática, avaliada pela distribuição citoplasmática das mitocôndrias (Tabela 6), classificada predominantemente como geral (90,26 - 91,88%).

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).

Grupos	Periférica	Transição	Geral
SFB	0,95 \pm 0,36%	8,79 \pm 1,87%	90,26 \pm 1,98%
BSA	0,62 \pm 0,42%	7,53 \pm 2,15%	91,88 \pm 2,28%

Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). SFB: 10% e BSA: 0,6%.

Quantificação lipídica intracitoplasmática

O resultado do conteúdo lipídico intracitoplasmático em oócitos, mensurado em pixels encontra-se apresentado na Figura 3. Foi observada interação ($P < 0,05$) entre o suplemento proteico (SFB ou BSA) e as concentrações de ALA utilizadas.

Considerando apenas os grupos suplementados com SFB nota-se que a concentração de 100 μ M de ALA reduziu ($P < 0,05$) o conteúdo lipídico (186,6 pixels), em relação ao grupo Controle (0 μ M de ALA; 218,0 pixels), se igualando ($P > 0,05$) ao conteúdo observado nos oócitos imaturos (178,4 pixels). Entretanto, a suplementação com as diferentes concentrações de ALA na presença de BSA não alterou ($P > 0,05$) o conteúdo lipídico (187,7 – 205,1 pixels).

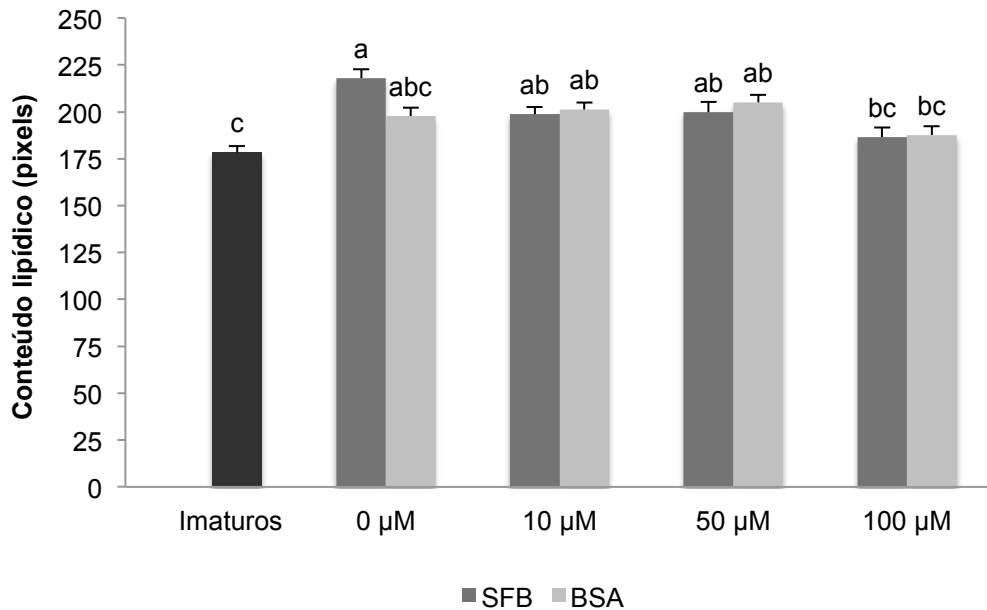


Figura 3. Conteúdo lipídico intracitoplasmático (em pixels) de oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de ácido linolênico na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Dados apresentados como média \pm EPM. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Mensuração do conteúdo intracelular de ROS

O conteúdo intracelular de ROS, mensurado em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) encontra-se apresentado na Figura 4. Houve interação ($P < 0,05$) entre o suplemento proteico e as diferentes concentrações de ALA.

Em meio suplementado com SFB a adição de 100 μM de ALA reduziu ($P < 0,05$) o conteúdo intracelular de ROS em oócitos bovinos (0,80 UAF), em relação ao grupo controle (0 μM de ALA: 1,27 UAF), não diferindo ($P > 0,05$) dos oócitos imaturos (1,00 UAF). Já na presença de BSA, foi detectado um aumento expressivo ($P < 0,05$) no nível intracelular de ROS no grupo Controle (0 μM de ALA: 2,36 UAF), em relação aos demais grupos, os quais não variaram entre si ($P > 0,05$; 0,93 - 1,49 UAF).

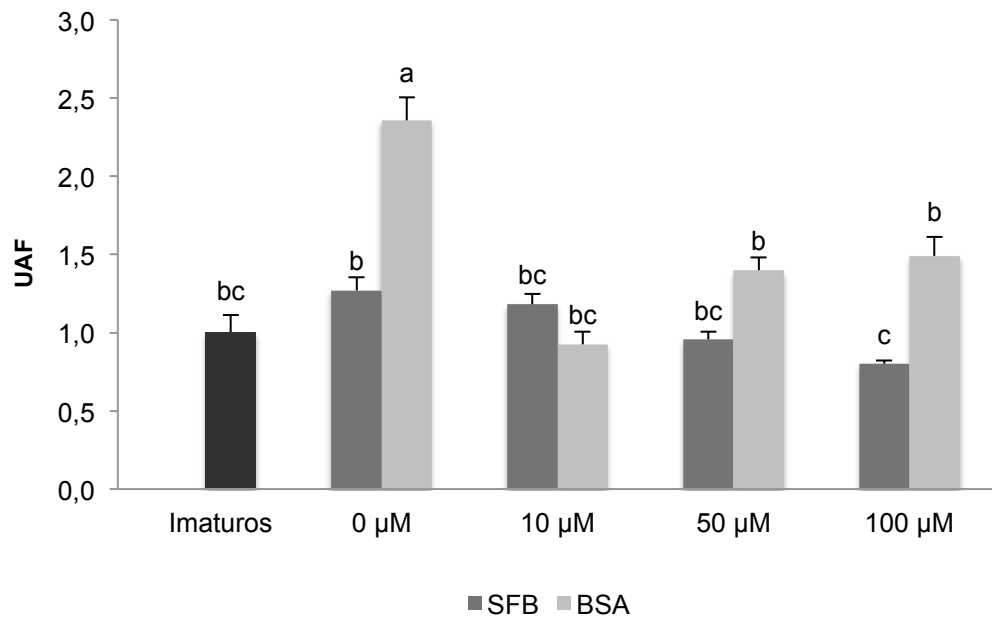


Figura 4. Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) em oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de ácido linolênico na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Dados apresentados como média \pm EPM. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Produção *in vitro* de embriões

Como não houve interação entre as diferentes concentrações de ALA e o suplemento proteico ($P > 0,05$), os resultados do desenvolvimento embrionário encontram-se apresentados separadamente, como efeitos principais. As taxas de clivagem (80,8 - 86,0%) e de blastocistos (32,2 - 39,2%) não foram alteradas ($P > 0,05$) pelas diferentes concentrações de ALA utilizadas na MIV de oócitos (Figura 5).

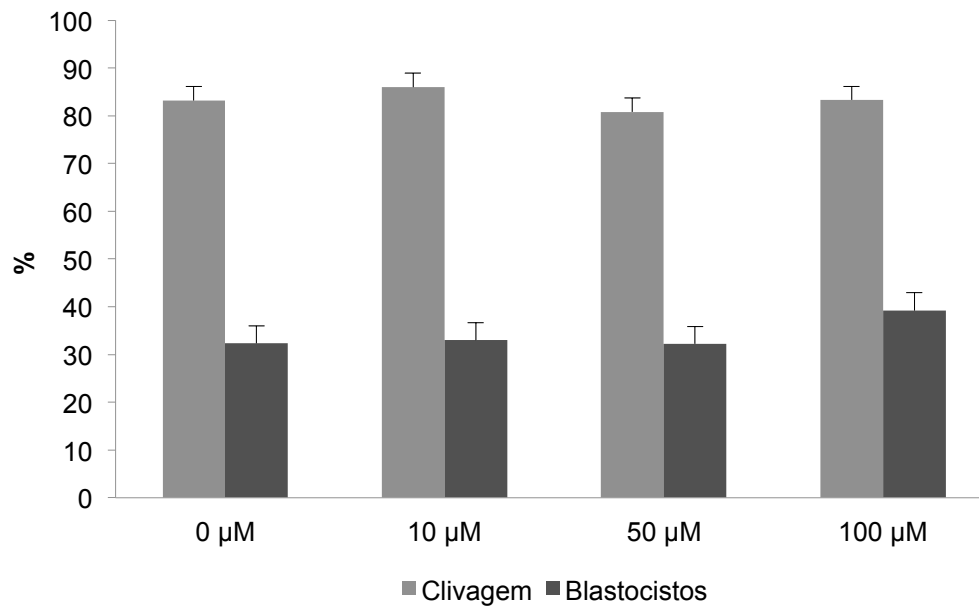


Figura 5. Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido linolênico. Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Clivagem (72 h pós-inseminação (h.p.i.)), desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (168 h.p.i.) de embriões bovinos produzidos a partir de oócitos MIV na presença de 0 a 100 μ M de ALA.

Como apresentado na Figura 6, a produção embrionária foi afetada pelo suplemento proteico utilizado (SFB ou BSA). Houve uma redução significativa ($P < 0,05$) na taxa de blastocistos quando a etapa de MIV foi realizada na presença de BSA (29,0 vs 39,3, respectivamente para os grupos BSA e SFB). Entretanto, as taxas de clivagem não foram alteradas ($P > 0,05$; 82,4 – 84,3%).

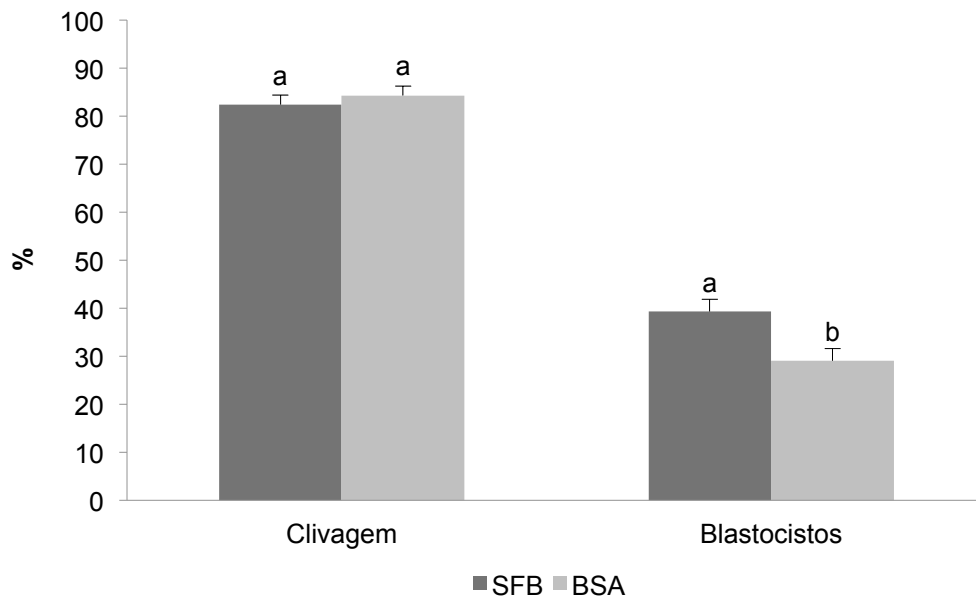


Figura 6. Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Barras com letras distintas dentro da mesma avaliação diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Clivagem (72 h pós-inseminação (h.p.i.)), desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (168 h.p.i.) de blastocistos bovinos produzidos a partir de oócitos MIV na presença de 10% de SFB ou 0,6% de BSA.

4. DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi a redução do conteúdo lipídico intracitoplasmático de oócitos bovinos maturados em meio de cultivo suplementado com ALA, um ácido graxo poliinsaturado da família n-3. Pela primeira vez, estes resultados sugerem um efeito benéfico da suplementação com ALA, na presença de SFB, sobre o metabolismo de lipídios.

Os suplementos proteicos frequentemente utilizados nos sistemas de PIV de embriões bovinos são o SFB e BSA, os quais contribuem para o aumento da produção de blastocistos (LEIVAS *et al.*, 2011). Apesar destes efeitos benéficos, os oócitos absovem os lipídios presentes no SFB utilizado na MIV, os quais são armazenados em gotículas de lipídios citoplasmáticos (KIM *et al.*, 2001), o que pode alterar o metabolismo destas células e comprometer, por exemplo, a criotolerância dos embriões oriundos de oócitos cultivados nestas situações. Neste estudo, a suplementação com 100 μ M de ALA em meio de MIV, mesmo na presença de 10%

de SFB, resultou na redução do acúmulo lipídico intracelular, assemelhando-se ao encontrado nos oócitos imaturos, antes da exposição do soro. Assim, o acúmulo de lipídios no oócito, bem como o metabolismo dessas células, podem ser modificados por influência do ambiente de maturação, particularmente pelo soro e suplementos lipídicos, como os PUFA adicionados à etapa de MIV (DUNNING *et al.*, 2014).

O controle da lipogênese, assim como os eventos fisiológicos que reduzem a expressão de diversas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, podem ser influenciados pela presença de PUFA n-3 no sistema de cultivo (AL DARWICH *et al.*, 2010). Já foi demonstrado, por exemplo, que os PUFA n-3 reprimem a transcrição das esteroil-CoA dessaturases (SCD do inglês, “stearoyl-CoA desaturase”) (CHOI *et al.*, 2000; PARIZA *et al.*, 2001) e da enzima sintetizadora de ácidos graxos (FASN do inglês, “fatty acid synthase”), que são enzimas chave envolvidas na síntese de ácidos graxos (SAMPATH e NTAMBI, 2005; AL DARWICH *et al.*, 2010). Também foi recentemente demonstrado que os PUFA podem suprimir a expressão de genes lipogênicos, a partir de pelo menos três receptores nucleares (PPAR, LXR e HNF-4 α) e de fatores de transcrição como o SREBP (“Sterol-regulatory element binding protein”), considerado o fator chave de regulação da síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis (SAMPATH e NTAMBI, 2005; AL DARWICH *et al.*, 2010). Apesar da expressão desses fatores não ter sido avaliada neste estudo, pode-se especular que a redução do acúmulo lipídico em oócitos bovinos tenha sido devido ao efeito do ALA sobre o metabolismo lipídico durante a MIV, seja nas vias de lipogênese ou lipólise, como demonstrado por estes relatos de literatura.

Além dos efeitos sobre o metabolismo lipídico, a suplementação com ALA demonstrou exercer efeitos benéficos sobre a maturação oocitária e aquisição de competência para o desenvolvimento embrionário subsequente, tanto em bovinos (MAREI *et al.*, 2009) quanto em ovinos (GHAFFARILALEH *et al.*, 2015; VESHKINI *et al.*, 2015). Porém, no presente estudo, não foram observados efeitos do ALA sobre as taxas de maturação nuclear dos oócitos, independente da concentração de ALA utilizada, ou da suplementação com SFB ou BSA. Entretanto, em estudos anteriores, a suplementação com BSA durante a etapa de MIV resultou em redução nas taxas de maturação nuclear (ALI e SIRARD, 2002) e de migração de grânulos

corticais, enquanto que a suplementação com SFB promoveu melhora na maturação nuclear e migração de organelas (DEL COLLADO *et al.*, 2015).

Os efeitos positivos da suplementação com ALA sobre a maturação nuclear de oócitos foram associados à mudanças moleculares relacionadas à maturação, tais como o aumento da síntese de PGE2, concentração de cAMPi e fosforilação das MAPK1 e MAPK3 nos COCs (MAREI *et al.*, 2009). De acordo com Marei *et al.* (2009), a suplementação com 50 μ M de ALA, em meio livre de SFB aumentou a taxa de maturação nuclear de oócitos de bovinos e o subsequente desenvolvimento e qualidade embrionários. Entretanto, concentrações mais elevadas de ALA (100 e 200 μ M) foram prejudiciais (MAREI *et al.*, 2009). Neste estudo, a suplementação com 100 μ M de ALA em meio contendo SFB não prejudicou a maturação nuclear e a reorganização citoplasmática mitocondrial.

Alterações ultraestruturais, incluindo a reorganização mitocondrial no citoplasma do oócito, constituem um aspecto importante da maturação citoplasmática e são fortemente correlacionados com o potencial de desenvolvimento embrionário (FERREIRA *et al.* 2009), assim como o nível de respiração mitocondrial (STOJKOVIC *et al.* 2001; WILDING *et al.* 2001). O padrão de distribuição das mitocôndrias em oócitos bovinos de boa qualidade (grau 1) foi descrito como periférico, nos imaturos, e difuso nos oócitos maturados (STOJKOVIC *et al.* 2001; TARAZONA *et al.* 2006; ADONA *et al.*, 2008). Neste estudo, houve uma predominância da distribuição mitocondrial difusa nos oócitos ao final do cultivo de maturação. Todavia, a suplementação com ALA, independente da fonte proteica utilizada (SFB ou BSA), não alterou o parâmetro de reorganização mitocondrial, da mesma forma como observado por MAREI *et al.* (2012).

A mitocôndria desempenha um papel importante na aquisição de competência oocitária (CUMMINS *et al.*, 2004), uma vez que o status metabólico ou atividade mitocondrial, baseado no PMM e conteúdo de ATP, podem ser associados à qualidade oocitária. A β -oxidação é a via pela qual é sintetizada a maior parte da energia fornecida ao oócito (DUMOLLARD *et al.*, 2004), a partir da metabolização de ácidos graxos no interior da mitocôndria. Essa energia é necessária para suportar processos críticos do desenvolvimento associados à maturação nuclear e

citoplasmática, assim como o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (DUNNING *et al.*, 2010).

Independente do suplemento proteico utilizado, a suplementação com 100 μM de ALA não alterou a atividade metabólica mitocondrial (avaliada pelo PMM) em relação ao grupo Controle, porém foi superior em relação as concentrações de 10 e 50 μM de ALA. Acredita-se que a redução do acúmulo lipídico observada após a suplementação com 100 μM de ALA não possa ser relacionada ao aumento da atividade da via de β -oxidação mitocondrial, apesar do ATP produzido não ter sido avaliado.

A atividade mitocondrial resulta na produção de ROS, as quais são derivadas da molécula de oxigênio e formadas como produtos intermediários de metabolismo celular (COMBELLES *et al.*, 2009). A produção de ROS ocorre normalmente durante a maturação oocitária, podendo variar de acordo com as condições de cultivo e influenciar a progressão da meiose (MORADO *et al.*, 2009). A MIV em meio suplementado com 100 μM de ALA, na presença de SFB, reduziu o acúmulo intracelular de ROS em relação ao grupo Controle, se igualando ao detectado nos oócitos imaturos. Interessantemente, houve um aumento significativo e inexplicável do nível de ROS nos oócitos MIV em meio suplementado com BSA e na ausência de ALA.

Apesar dos resultados apontarem efeitos positivos da concentração de 100 μM de ALA em meio suplementado com SFB sobre a redução do conteúdo lipídico e nível de ROS, não houve nenhum efeito sobre as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário, em relação às demais concentrações avaliadas nesse estudo.

5. CONCLUSÃO

A adição de 100 μM de ALA em meio de MIV suplementado com SFB resultou em redução do acúmulo lipídico citoplasmático e do nível intracelular de ROS, assim como aumento do potencial de membrana mitocondrial. No entanto,

nenhum desses efeitos melhorou a maturação oocitária e o subsequente potencial de desenvolvimento embrionário.

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.

ADONA, P.R.; PIRES, P.R.L.; QUETGLAS, M.D.; SCHWARZ, K.R.L.; LEAL, C.L.V. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v.108, p.49–65, 2008.

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 α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v.93, p.30-36, 2010.

ALI, A.; SIRARD, M.A. Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Biol. Reprod.**, v.66, p.901–905, 2002.

CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; WESTHUSIN, M.E.; WATSON, A.J. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E(2)(PGE(2)) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE(2) induces moderate expansion of the bovine cumulus *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.65, p.135–140, 2001.

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.

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.

DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N.Z.; LOPES, F.L.; GASPAR, R.C.; PADILHA, L.C.; COSTA, R.R.; ROSSI, G.F.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.

DEWHURST, R.J.; SCOLLAN, N.D.; LEE, M.R.; OUGHAM, H.J.; HUMPHREYS, M.O. Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. **Proc. Nutr. Soc.**, v.62, p.329–336, 2003.

DUMOLLARD, R.; MARANGOS, P.; FITZHARRIS, G.; SWANN, K.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. Sperm-triggered $[Ca^{2+}]$ oscillations and Ca^{2+} homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. **Development**, v.131, p.3057–3067, 2004.

DUNNING, K.R.; RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L.. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v.148, p.15–27, 2014.

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

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836–848, 2009.

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; VANDE WOUDE, G.F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1261–1270, 1996.

GILBERT, S.F. (2003). 'Developmental Biology, 7th edn.' (Sinauer Associates: Sunderland, MA.)

GHAFFARILALEH, V.; FOULADI-NASHTA, A.; PARAMIO, M.T. Effect of α -linolenic acid on oocyte maturation and embryo development of prepubertal sheep oocytes. **Theriogenology**, v.82, p.686–696, 2014.

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.

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.

LEIVAS, F.G.; BRUMB, D.S.; FIALHOA, S.S.; SALIBAB, W.P.; ALVIMB, M.T.T.; BERNARDIC, M.L.; RUBINA, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology**, v.75, p.429–433, 2011.

LIANG, C.G.; HUO, L.J.; ZHONG, Z.S.; CHEN, D.Y.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. Cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine

cumulus-enclosed oocytes. **Endocrinology**, v.146, p.4437–4444, 2005.

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.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A. Differential effects of linoleic and alpha-linolenic fatty acids on spatial and temporal mitochondrial distribution and activity in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.679–690, 2012.

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.

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.

PLOURDE, D.; VIGNEAULT, C.; LEMAY, A.; BRETON, L.; GAGNE, D.; LAFLAMME, I.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of oocyte source and culture conditions to phenotypic and transcriptomic variation in commercially produced bovine blastocysts. **Theriogenology**, v.78, p.116–131, 2012.

RÄTY, M; KETOJA, E.; PITKÄNEN, T.; AHOLA, V.; KANANEN, K.; PEIPPO, J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. **Cryobiology**, v.63, p.245-255.

ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; NOGUEIRA, É.; ACCORSI, M.F.; MINGOTI, G.Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.26, p.797-805, 2014.

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

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONCALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biol. Reprod.**, v.64, p.904–909, 2001.

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.

TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. **Reprod. Domest. Anim.**, v.41, p.5–11, 2006.

VESHKINI, A.; ASADI, H.; KHADEM, A.A.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; KHAZABI, S.; AMINAFSHAR, M.; DELDAR, H.; SOLEIMANI, M.; CINAR, M.U. Effect of Linolenic acid during *in vitro* maturation of ovine oocytes: embryonic developmental potential and mRNA abundances of genes involved in apoptosis. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.32, p.653–659, 2015.

WILDING, M.; DALE, B.; MARINO, M.; DI MATTEO, L.; ALVIGGI, C.; PISATURO, M.L.; LOMBARDI, L.; DE PLACIDO, G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. **Hum. Reprod.** v.16, p.909–917, 2001.

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*

RESUMO – Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação na etapa de maturação *in vitro* (MIV), com diferentes concentrações de L-car (0, 1, 5 e 10 mM), na presença de soro fetal bovino (SFB) ou de albumina sérica bovina (BSA) sobre o acúmulo lipídico intracitoplasmático e atividade mitocondrial, bem como sobre a maturação oocitária e potencial de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Independente do suplemento proteico utilizado, a suplementação com as diferentes concentrações de L-car durante a MIV não afetou ($P>0,05$) a taxa de maturação nuclear (62,84 – 79,21%) e citoplasmática, avaliada neste estudo pela distribuição citoplasmática das mitocôndrias (87,71 – 92,58% de mitocôndrias dispersas no citoplasma). Foi observado que apenas a concentração de 10 mM de L-car resultou em uma melhora ($P<0,05$) na maturação citoplasmática (92,58%), em relação ao grupo Controle (0 mM L-car; 79,27%). Não houve efeito ($P>0,05$) dos suplementos proteicos (SFB vs BSA) sobre a maturação nuclear (72,19 - 74,83%) e citoplasmática (84,21 – 90,33%) dos oócitos MIV. Na presença de SFB foi observada redução ($P<0,05$) do potencial de membrana mitocondrial (PMM) após suplementação com 10 mM de L-car (0,44 unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) em comparação com oócitos maturados com 1 e 5 mM de L-car (1,08 e 1,04 UAF, respectivamente). Em relação aos grupos suplementados com BSA, foi observada redução geral no PMM nas diferentes concentrações de L-car (0,58 - 0,75 UAF) em comparação com oócitos imaturos. O conteúdo lipídico relativo foi menor ($P<0,05$) nos grupos suplementados com SFB e L-car nas concentrações de 1 (0,96 pixels), 5 (0,95 pixels) e 10 mM (0,96 pixels) em relação ao grupo Controle (0 mM de L-car com SFB; 1,01 pixels) e aos oócitos imaturos (1,00 pixels). Oócitos do grupo Controle, maturados com BSA (0 mM de L-car com BSA; 0,94 pixels) apresentaram menor conteúdo lipídico ($P<0,05$) em comparação com oócitos imaturos (1,00 pixels) e com aqueles maturados com 5mM

de L-car e BSA (1,01 pixels). Como esperado, o conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos oócitos imaturos foi menor ($P < 0,05$) que o observado nos oócitos ao final do cultivo de maturação. Houve um aumento pronunciado ($P < 0,05$) no nível de ROS nos oócitos MIV com 10 mM de L-car na presença de SFB (2,3 UAF). Todavia, na presença de BSA houve redução ($P < 0,05$) no nível de ROS utilizando a concentração de 1 mM (1,3 UAF) e de 10 mM de L-car (1,7 UAF), em comparação com oócitos maturados com estas mesmas concentrações de L-car e na presença de SFB (1,9 e 2,3 UAF, respectivamente para 1 e 10 mM L-car e SFB). As taxas de clivagem (76,4 - 80,5%) e de blastocistos (21,1 - 27,8%) não foram alteradas ($P > 0,05$) pelas diferentes concentrações de L-car utilizadas na MIV de oócitos. Entretanto, na concentração de 10 mM foi observada uma tendência ($P = 0,08$) de redução da taxa de blastocistos em relação aos demais tratamentos. Quando a etapa de MIV foi realizada na presença de BSA, houve uma redução significativa ($P < 0,05$) nas taxas de clivagem (74,2 vs 83,0%, respectivamente para os grupos BSA e SFB) e de blastocistos (19,0 vs 33,0%, respectivamente para os grupos BSA e SFB). Em conclusão, a suplementação do meio de MIV com L-car resultou em redução 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 do PMM e elevação do conteúdo de ROS, e do efeito negativo 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.

Palavras-chave: L-carnitina, maturação *in vitro*, acúmulo lipídico, oócito, bovino

1. INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos é a etapa inicial e determinante para o sucesso da produção *in vitro* (PIV) de embriões e é sabido que, além da qualidade dos oócitos, as condições de cultivo são os principais fatores que afetam sua eficiência (PHONGNIMITR *et al.*, 2013).

Durante a MIV de oócitos bovinos ocorre um aumento significativo no acúmulo lipídico intracitoplasmático em relação ao encontrado em oócitos imaturos (AARDEMA *et al.*, 2011). O conteúdo lipídico dos oócitos pode ser alterado por influência do ambiente no qual essas células sofrem maturação, particularmente pela presença de soro ou outros suplementos adicionados ao meio na etapa de MIV (DUNNING *et al.*, 2014), tais como o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA – “bovine seric albumin”), que são os suplementos protéicos mais frequentemente utilizados para melhorar a PIV de embriões bovinos (LEIVAS *et al.*, 2011).

Oócitos bovinos maturados na presença de 10% de SFB acumulam mais triacilgliceróis e colesterol do que aqueles maturados em condições livres de soro. Isso porque os oócitos absorvem os lipídios presentes no SFB, os quais são armazenados em gotas de lipídios citoplasmáticas (KIM *et al.*, 2001). A formação excessiva de gotas de lipídios vem sendo associada à variações na função mitocondrial, o que afeta o metabolismo lipídico e compromete a viabilidade oocitária (PLOURDE *et al.*, 2012).

Apesar deste possível efeito deletério do SFB sobre o acúmulo lipídico, sugere-se que os elementos presentes neste suplemento promovam, além da melhora da taxa de maturação nuclear, a migração de organelas durante a etapa de MIV (DEL COLLADO *et al.*, 2015). Por esta razão, tem sido difícil evitar ou encontrar um substituto adequado para o soro em formulações de meios de cultivo, particularmente para laboratórios com fins comerciais.

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 produzidos *in vitro* (TAKAHASHI *et al.*, 2013; BALDOCEDA *et al.*, 2015) e

em oócitos suínos maturados *in vitro* (SOMFAI *et al.*, 2011). Esse regulador metabólico desempenha um papel crucial na via de β -oxidação por catalizar o transporte de ácidos graxos até a matriz mitocondrial para a geração de ATP (KERNER e HOPPEL, 2000), aumentando assim o metabolismo lipídico nesta organela (BALDOCEDA *et al.*, 2015).

A energia produzida pela via da β -oxidação mitocondrial é responsável por suportar processos críticos da maturação nuclear (retomada da meiose) e citoplasmática do oócito, bem como o desenvolvimento embrionário (DUNNING *et al.*, 2010). O aumento da atividade mitocondrial promovido pela suplementação *in vitro* com L-car demonstrou estar relacionado com a melhora da maturação oocitária e com o aumento do potencial de desenvolvimento embrionário em ratos (ABDELRAZIK *et al.*, 2009; DUNNING *et al.*, 2010), suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011) e bovinos (PHONGNIMITR *et al.*, 2013).

Além disso, a L-car demonstrou possuir um efeito antioxidante, por reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – “reactive oxygen species”) durante a MIV de oócitos suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011). Este efeito é importante, uma vez que a produção de ROS é evidente durante a maturação oocitária (DALVIT *et al.*, 2005), mas pode flutuar dependendo das condições de cultivo, podendo influenciar a progressão meiótica (MORADO *et al.*, 2009). As ROS são moléculas derivadas do oxigênio e formadas pelas mitocôndrias como produtos intermediários de metabolismo celular (COMBELLES *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos sobre o metabolismo de oócitos tem dado maior enfoque aos carboidratos e pouco se sabe sobre o metabolismo de lipídios. Baseado no exposto, este estudo foi delineado para testar a hipótese de que a suplementação do meio de MIV com L-car aumenta a regulação da via da β -oxidação, promovendo aumento do consumo das reservas de lipídios intracelulares na forma de triacilgliceróis, com conseqüente redução do acúmulo lipídico nos oócitos. Como resultado, espera-se que haja o aumento da criotolerância, sem prejudicar o desenvolvimento embrionário. Portanto, oócitos bovinos submetidos ao sistema de PIV de embriões serão alvo deste estudo, que tem como propósito avaliar os efeitos da suplementação com diferentes concentrações de L-car, na presença de SFB ou BSA sobre o acúmulo lipídico intracitoplasmático e atividade mitocondrial, bem como

sobre a maturação e potencial de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes químicos

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Caso contrário, encontram-se especificados no texto. Todos os reagentes são testados para o cultivo celular ou embrionário. A L-carnitina (C0283) foi diluída em água ultrapura, para o preparo da solução estoque de 100 mM, a qual foi aliqüotada e armazenada a - 20°C. No momento da utilização, a solução estoque de L-car foi diluída em meio de maturação (B-199) para obtenção das concentrações finais de 1, 5 e 10 mM.

O meio de lavagem H-199 foi constituído de TCM-199 (Tissue Culture Medium 199 (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 20 mM de HEPES, 5mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de amicacina. O meio de maturação (B-199) foi constituído de TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 100 UI/mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de SFB (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) ou 6 mg/mL (0,6%) de BSA. O meio de fertilização foi TALP-FIV, suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 6 mg/mL de BSA "FA-free" fração V, 25 mM de bicarbonato de sódio, 13 mM de lactate de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 40 µL/mL de solução de PHE (concentrações finais de 20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina e 2 µM epinefrina), e 10 µg/mL de heparina. O meio de cultivo utilizado foi SOFaa, suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BEM aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB.

Obtenção e seleção dos oócitos

Os COCs foram obtidos a partir de ovários de vacas abatidas em frigoríficos na região de Araçatuba-SP e transportados até o laboratório em garrafas contendo solução salina (30-35 °C). Folículos ovarianos entre 3-8 mm de diâmetro foram puncionados com seringa acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL, que permaneceram em repouso por 15 minutos para decantação do conteúdo, posteriormente inspecionado para a seleção dos COCs. Somente COCs circundados por pelo menos quatro camadas de células do cumulus compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação. O tempo médio da seleção até o início do cultivo foi de aproximadamente 1 hora.

Maturação *in vitro* dos oócitos

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 e uma vez em meio de maturação B-199. Foram transferidas 50 estruturas para cada poço da placa de cultivo (NUNC, Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), contendo 500 µL de meio B-199, sem óleo mineral. O meio de maturação foi suplementado com concentrações crescentes de L-car (0, 1, 5 e 10 mM), associadas à suplementação com 10% de SFB ou 0,6% de BSA. O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar, a 38,5°C e com máxima umidade, durante 22 horas.

Avaliação da maturação nuclear

Os COCs imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora) e após a MIV (22 horas) foram transferidos para microtubos contendo 200 µL de solução de hialuronidase 0,2%, diluída em PBS acrescido de 1% PVP (PBS-PVP), e foram desnudados com pipetagens sucessivas. Então foram fixados em solução de paraformaldeído (4%) à temperatura ambiente, por 1 hora. Posteriormente, os oócitos foram permeabilizados com Triton X-100 (0,5%, v/v) em solução de citrato de sódio (0,1%), por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os oócitos foram incubados em solução de Hoechst 33342 (1 µg/mL de PBS-PVP) por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Após serem lavados duas vezes em PBS-PVP,

os oócitos corados foram avaliados imediatamente em microscópio equipado com epifluorescência (IX51, Olympus, Tóquio, Japão), sob excitação de 404 nm e emissão de 526 nm para determinação do estágio da meiose. Os oócitos foram classificados em imaturos (configuração nuclear em vesícula germinativa - VG), maduros (metáfase II - MII) ou nos estágios intermediários da meiose (quebra da vesícula germinativa - GVBD, metáfase I - MI, anáfase I – AI ou telófase I - TI).

Avaliação da maturação citoplasmática

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM) e da distribuição citoplasmática das mitocôndrias

A distribuição citoplasmática das mitocôndrias e o potencial de membrana mitocondrial foram avaliados pela coloração com MitoTracker Red (CMXRos, Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. COCs imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora) e após a MIV (22 horas) foram desnudados (como descrito no item anterior) e lavados duas vezes em PBS-PVP. Os oócitos foram incubados no escuro por 30 minutos em solução de PBS-PVP acrescido de 500 nM de MitoTracker Red, em temperatura de 37°C. Posteriormente foram lavados duas vezes em PBS-PVP e avaliados imediatamente em microscópio equipado com epifluorescência (IX51, Olympus, Tóquio, Japão), sob excitação de 543 nm e emissão de 575 nm. Os oócitos avaliados após 0 e 22 horas de maturação foram classificados pela distribuição citoplasmática de mitocôndrias (distribuição periférica: oócitos imaturos; distribuição geral: oócitos maduros; transição: oócitos parcialmente maduros) e fotografados. As imagens obtidas foram armazenadas e posteriormente analisadas pelo software Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Versão 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida, após conversão em escala de cinza. Foi realizada a delimitação dos oócitos para determinação da área e da intensidade do sinal de fluorescência (pixels) pela área. A intensidade do sinal de background foi subtraída dos valores obtidos nas fotos dos tratamentos. O grupo de oócitos imaturos foi escolhido como calibrador e o valor de cada tratamento foi dividido pela

média do calibrador para gerar o nível de expressão relativa (unidades arbitrárias de fluorescência). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o PMM.

Quantificação lipídica intracitoplasmática

Para avaliação do acúmulo lipídico intracitoplasmático, os COCs imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora) e após a MIV (22 horas) foram desnudados, como descrito anteriormente, e lavados duas vezes em PBS-PVP. Os oócitos foram fixados em solução de paraformaldeído (4%) à temperatura ambiente, por 2 horas. Após a fixação, os mesmos foram lavados em PBS e imersos em solução de etanol 50% em água destilada, durante 2 minutos. Em seguida foram corados com Sudan Black B 1% (corante lipofílico) diluído em etanol 70%, por 2 minutos. Posteriormente, foram imersos 3 vezes, por 5 minutos cada, em solução de etanol 50% e, em sequência, em água destilada acrescida de 1% PVP. Então, os oócitos foram colocados em lâminas com glicerol para serem analisados no microscópio de luz (IX51, Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) após conversão em escala de cinza e delimitação dos oócitos, para determinação da área e da intensidade média (pixels) pela área. O grupo de oócitos imaturos foi escolhido como calibrador e o valor de cada tratamento foi dividido pela média do calibrador para gerar o nível de expressão relativa.

Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína

Os níveis intracelulares de ROS (peróxido de hidrogênio: H_2O_2 , radical hidroxila: $HO\cdot$, radical peroxila: $ROO\cdot$) foram quantificados por meio da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA ; Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) de acordo com ROCHA-FRIGONI *et al.* (2014). COCs imediatamente removidos dos folículos (tempo 0 hora) e após a MIV (22 horas) foram desnudados, como descrito anteriormente e lavados duas vezes em PBS-PVP. Em seguida foram incubados em 5 μM de H_2DCFDA durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% CO_2 em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS-PVP e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado

com epifluorescência (IX51, Olympus, Tóquio, Japão), sob excitação de 495 nm e emissão de 520 nm. As imagens obtidas foram posteriormente analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) após conversão em escala de cinza, para quantificação da intensidade de fluorescência emitida. Foi realizada a delimitação dos oócitos para determinação da área e da intensidade do sinal de fluorescência (pixels) pela área. A intensidade do sinal de background foi subtraída dos valores obtidos nas fotos dos tratamentos. O grupo de oócitos imaturos foi escolhido como calibrador e o valor de cada tratamento foi dividido pela média do calibrador para gerar o nível de expressão relativa (unidades arbitrárias de fluorescência). Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o conteúdo intracelular de ROS.

Produção *in vitro* dos embriões

Ao término da etapa de MIV (descrita no item Maturação *in vitro* dos oócitos), os COC foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV). Para o preparo do sêmen, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36°C, durante 40 segundos e seu conteúdo centrifugado em gradiente de densidade descontínua de Percoll (250 µL de Percoll 45% sobre 250 µL de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL; Pharmacia, Uppsala, Sweden) durante 7 minutos a 2750 rpm. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. Os espermatozoides foram adicionados à gota de fertilização na concentração de 2×10^6 células/mL. Os COC (25/gota de 90 µL) e os espermatozoides foram coincubados em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5 °C, por até 22 horas. O dia da fertilização foi definido como Dia 0 (D0).

Após a etapa da FIV, os prováveis zigotos foram pipetados sucessivamente para a retirada do excesso de células do cumulus e transferidos para o meio de CIV. O cultivo embrionário foi realizado em poços de placas NUNC contendo 500 µL de meio SOFaa, sem óleo mineral. Esta etapa foi conduzida em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e temperatura de 38,5 °C por até sete dias. Após 72 horas de cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário avaliado às 168 hpi (D7).

Delineamento experimental

Neste estudo foi avaliado o impacto da suplementação do meio de MIV com diferentes concentrações de L-carnitina (L-car) sobre a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos (acúmulo lipídico intracelular, distribuição e PMM, e acúmulo de ROS) e sobre o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Oócitos bovinos foram MIV durante 22 horas em meio B-199 suplementado com 10% SFB ou 0,6% BSA, acrescido de três concentrações crescentes de L-car [baseadas em estudo de SUTTON-MCDOWALL *et al.* (2012)], conforme os grupos experimentais apresentados na Figura 1.

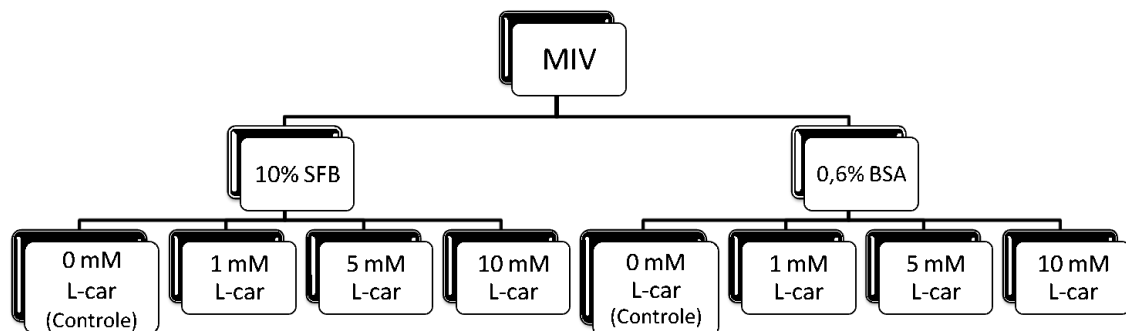


Figura 1. Esquema ilustrativo do delineamento experimental de acordo com a composição dos meios de maturação *in vitro* utilizados no Experimento II.

Desta maneira, o estudo obedeceu a um esquema fatorial 2×4 (2 suplementos proteicos: 10% SFB ou 0,6% BSA; e 4 concentrações diferentes de L-car), em um total de 8 grupos experimentais. Ainda, um grupo de oócitos foi avaliado imediatamente após a aspiração (Controle 0 horas). Assim, após 0 e 22 horas de MIV foram realizadas as seguintes avaliações nos oócitos:

- 1) Avaliação da maturação nuclear, a partir da determinação do estágio da meiose (tempo 0 hora: $n = 112$; 22 horas: $n = 636$)
- 2) Análise das mitocôndrias: distribuição citoplasmática e potencial de membrana mitocondrial (tempo 0 hora: $n = 90$; 22 horas; $n = 205$)
- 3) Mensuração do conteúdo lipídico intracitoplasmático (tempo 0 hora; $n = 90$; 22 horas; $n = 726$)

- 4) Mensuração do conteúdo intracelular de ROS (tempo 0 hora; $n = 90$; 22 horas; $n = 347$)
- 5) Avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro* ($n = 1875$)

Análise Estatística

O experimento foi repetido de 4 a 6 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata foi utilizado um poço da placa de cultivo celular contendo 50 oócitos para cada grupo experimental, sendo este considerado a unidade experimental. A taxa de blastocistos foi calculada no D7 do CIV, a partir do número de oócitos inseminados. Os dados foram analisados pela fração de oócitos ou embriões cultivados atingindo os estágios determinados, reportada em termos de porcentagem. As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o modelo “General linear model” (GLM) do SAS statistical software package 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA) considerando um modelo estatístico fatorial completo que inclui o suplemento de macromolécula do meio de maturação (10% SFB ou 0,6% BSA), o tratamento (diferentes concentrações de L-car) e possíveis interações. Quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey. As médias foram apresentadas na forma de quadrados mínimos \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas. Na ausência de interações significativas, apenas o principal efeito foi apresentado nos resultados.

3. RESULTADOS

Maturação nuclear

Não houve interação entre as diferentes concentrações de L-car e o suplemento proteico ($P > 0,05$) sobre o estágio da meiose. Desta forma, os resultados estão apresentados separadamente, de acordo com os efeitos principais (Tabelas 1

e 2). Dos oócitos imaturos avaliados, 42,50% encontravam-se em estágio de VG, 13,40% em MI e 0,00% em MII (dados não apresentados nas tabelas).

A suplementação com diferentes concentrações de L-car durante a MIV não afetou ($P>0,05$) a proporção de oócitos em metáfase II (MII; 62,84 – 79,21%), independente do suplemento proteico utilizado (Tabela 1).

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

Grupo	VG	Int.	MII
0 mM	0,00 ± 0,46%	20,91 ± 5,81%	74,22 ± 6,41%
1 mM	0,93 ± 0,46%	15,79 ± 5,81%	79,21 ± 6,41%
5 mM	0,00 ± 0,46%	29,22 ± 5,81%	62,84 ± 6,41%
10 mM	0,00 ± 0,46%	16,64 ± 5,81%	77,55 ± 6,41%

Dados apresentados como quadrados mínimos ± EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P>0,05$). VG: oócitos em estágio de vesícula germinativa; Int.: oócitos em fases intermediárias da meiose; MII: oócitos em metáfase II. Os oócitos foram considerados imaturos quando classificados em VG e Int. e maduros em MII.

De forma semelhante, não houve efeito ($P>0,05$) dos suplementos proteicos (SFB vs BSA) sobre a taxa de oócitos em MII (72,19 - 74,83%), conforme apresentado na Tabela 2.

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

Grupo	VG	MI	MII
SFB	0,46 ± 0,33%	18,82 ± 4,11%	71,74 ± 4,53%
BSA	0,00 ± 0,33%	21,46 ± 4,11%	75,17 ± 4,53%

Dados apresentados como quadrados mínimos ± EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P>0,05$). VG: oócitos em estágio de vesícula germinativa; Int.: oócitos em fases intermediárias da meiose; MII: oócitos em metáfase II. Os oócitos foram considerados imaturos quando classificados em VG e Int. e maduros em MII.

PMM e distribuição citoplasmática das mitocôndrias

O resultado da avaliação do PMM, mensurado em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) encontra-se apresentado na Figura 2. Foi observada interação

($P < 0,05$) entre o suplemento proteico e as concentrações de L-car utilizadas. Na presença de SFB foi observada uma redução ($P < 0,05$) do PMM após suplementação com 10 mM de L-car (0,44 UAF) em comparação com oócitos maturados com 1 e 5 mM de L-car (1,08 e 1,04 UAF, respectivamente). Ainda, esse grupo apresentou também PMM inferior àquele observado nos oócitos imaturos (1,00 UAF). Todavia, nenhum dos tratamentos diferiu ($P > 0,05$) do Controle (0 mM de L-car com SFB; 0,78 UAF). Em relação aos grupos suplementados com BSA, foi observada uma redução geral no PMM nas diferentes concentrações de L-car (0,58 - 0,75 UAF) em comparação com oócitos imaturos, todavia não diferiram ($P > 0,05$) do grupo Controle (0 mM de L-car com BSA; 0,69 UAF). Além disso, a suplementação de 5 mM de L-car na presença de BSA resultou na redução ($P < 0,05$) no potencial mitocondrial (0,65 UAF), em relação à presença do SFB (1,04 UAF).

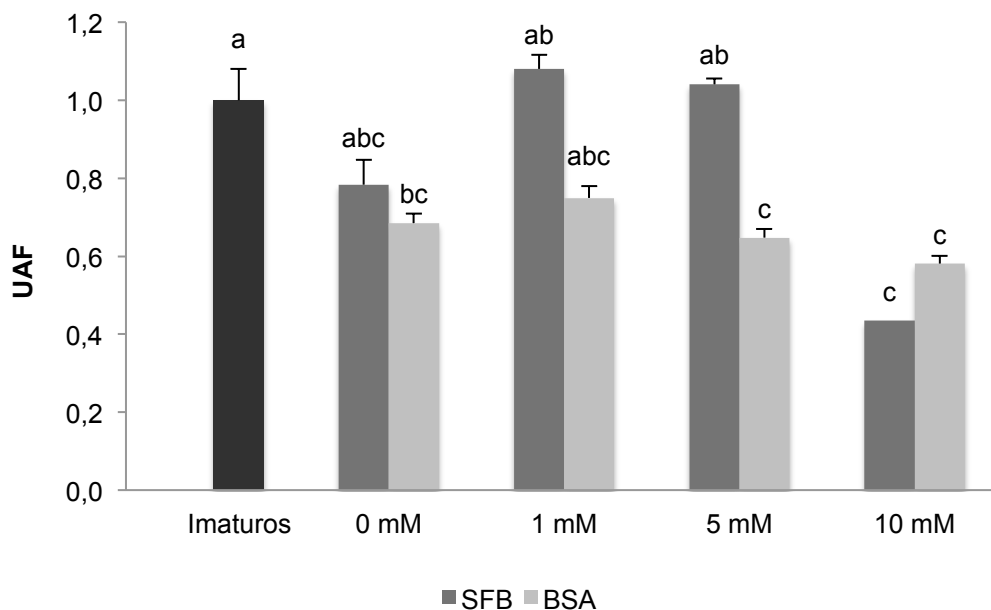


Figura 2. Potencial de membrana mitocondrial (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de L-carnitina na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Dados apresentados como média \pm EPM. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados da distribuição mitocondrial encontram-se apresentados separadamente, como efeitos principais nas Tabelas 3 e 4, uma vez que não houve interação ($P > 0,05$) entre as diferentes concentrações de L-car e os suplementos

proteicos. Os oócitos imaturos analisados apresentaram 32,00% de distribuição periférica, 33,30% de distribuição em transição e 34,60% dispersa pelo citoplasma (dados não apresentados nas tabelas).

As concentrações de 1 a 10 mM de L-car utilizadas durante a MIV interferiram entre si na distribuição citoplasmática mitocondrial do tipo geral (87,71 – 92,58%), tendo sido observado que a suplementação com 10 mM de L-car resultou em um aumento ($P < 0,05$) na proporção de oócitos com mitocôndrias dispersas (distribuição geral) pelo citoplasma (92,58%) em relação ao grupo Controle (0 mM L-car; 79,27%), como apresentado na Tabela 3.

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

Grupo	Periférica	Transição	Geral
0 mM	5,03 ± 1,36%	15,70 ± 2,83%	79,27 ± 3,15% ^a
1 mM	4,25 ± 1,36%	8,04 ± 2,83%	87,71 ± 3,15% ^{ab}
5 mM	1,31 ± 1,36%	9,17 ± 2,83%	89,52 ± 3,15% ^{ab}
10 mM	1,22 ± 1,36%	6,21 ± 2,83%	92,58 ± 3,15% ^b

Dados apresentados como quadrados mínimos ± EPM. ^{abc}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Entretanto, o suplemento proteico utilizado não alterou ($P > 0,05$) a maturação citoplasmática, avaliada pela distribuição citoplasmática das mitocôndrias (Tabela 4), classificada predominantemente como geral (84,21 – 90,33%).

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).

Grupos	Periférica	Transição	Geral
SFB	2,44 ± 0,96%	7,23 ± 2,00%	90,33 ± 2,23%
BSA	3,46 ± 0,96%	12,33 ± 2,00%	84,21 ± 2,23%

Dados apresentados como quadrados mínimos ± EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). SFB: 10% e BSA: 0,6%.

Quantificação lipídica intracitoplasmática

O resultado do conteúdo lipídico intracitoplasmático em oócitos, mensurado em pixels, encontra-se apresentado na Figura 3. Foi observada interação ($P < 0,05$) entre o suplemento proteico e as concentrações de L-car utilizadas.

O conteúdo lipídico relativo foi menor ($P < 0,05$) nos grupos suplementados com SFB e L-car nas concentrações de 1 (0,96 pixels), 5 (0,95 pixels) e 10 mM (0,96 pixels) em relação ao grupo Controle (0 mM de L-car com SFB; 1,01 pixels) e aos oócitos imaturos (1,00 pixels). Oócitos do grupo Controle, maturados com BSA (0 mM de L-car com BSA; 0,94 pixels) apresentaram menor conteúdo lipídico ($P < 0,05$) em comparação com oócitos imaturos (1,00 pixels) e com aqueles maturados com 5mM de L-car e BSA (1,01 pixels).

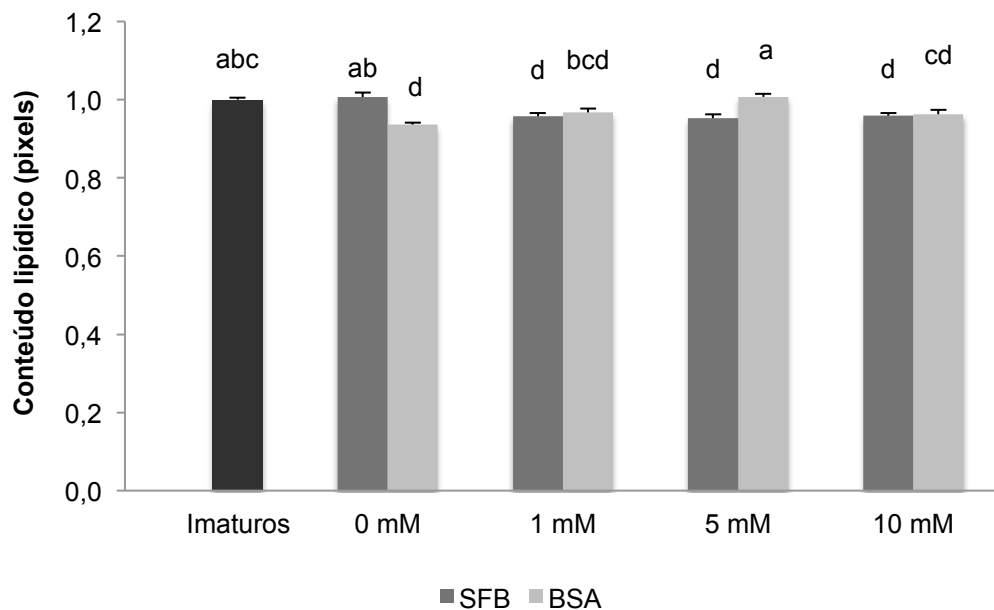


Figura 3. Conteúdo lipídico intracitoplasmático (em pixels) de oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de L-carnitina na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Dados apresentados como média \pm EPM. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Mensuração do conteúdo intracelular de ROS

O conteúdo intracelular de ROS, mensurado em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) encontra-se apresentado na Figura 4. Houve interação ($P < 0,05$) entre o suplemento proteico e as diferentes concentrações de L-car.

Como esperado, o conteúdo intracelular de ROS nos oócitos imaturos foi

menor ($P < 0,05$) do que o observado nos oócitos ao final do cultivo de maturação. Houve um aumento pronunciado ($P < 0,05$) no nível de ROS nos oócitos MIV com 10 mM de L-car na presença de SFB (2,3 UAF), o qual superou os níveis detectados nos demais grupos experimentais (1,3 – 2,0 UAF). Todavia, na presença de BSA houve uma redução ($P < 0,05$) no nível de ROS utilizando a concentração de 1 mM (1,3 UAF) e de 10 mM de L-car (1,7 UAF), em comparação com oócitos maturados com estas mesmas concentrações de L-car e na presença de SFB (1,9 e 2,3 UAF, respectivamente para 1 e 10 mM L-car e SFB).

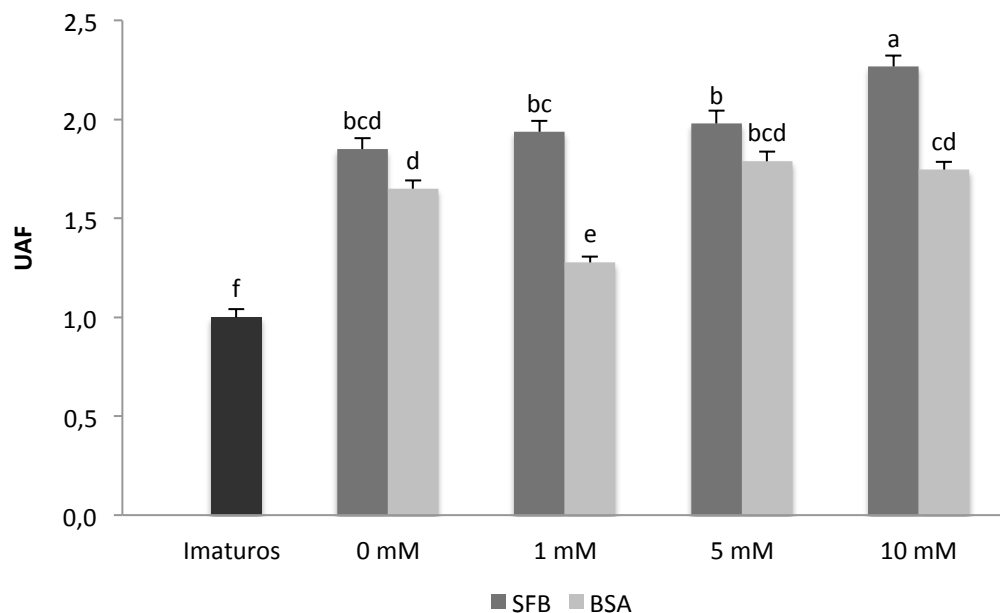


Figura 4. Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) em oócitos bovinos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de L-carnitina na presença de soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Dados apresentados como média \pm EPM. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Produção *in vitro* de embriões

Como não houve interação ($P > 0,05$) entre as diferentes concentrações de L-car e o suplemento proteico, os resultados do desenvolvimento embrionário encontram-se apresentados separadamente, nas Figuras 5 e 6.

As taxas de clivagem (76,4 - 80,5%) e de blastocistos (21,1 - 27,8%) não foram alteradas ($P > 0,05$) pelas diferentes concentrações de L-car utilizadas na MIV de oócitos. Entretanto, na concentração de 10 mM foi observada uma tendência

($P=0.08$) de redução da taxa de blastocistos em relação aos demais tratamentos (Figura 5).

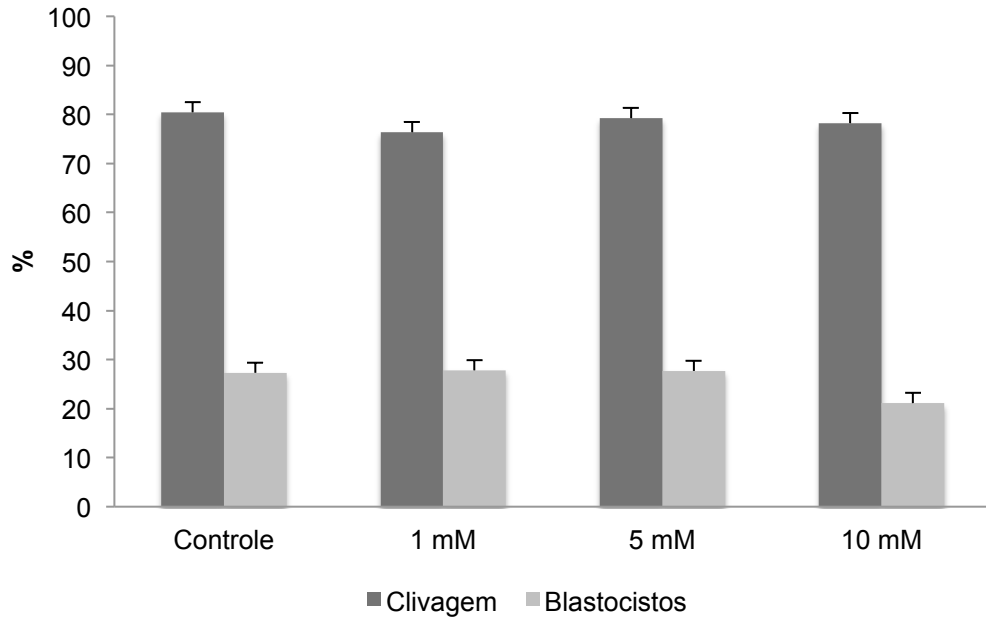


Figura 5. Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com diferentes concentrações de L-Carnitina. Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($P>0,05$). Clivagem (72 h pós-inseminação (h.p.i.)), desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (168 h.p.i.) de embriões bovinos produzidos a partir de oócitos MIV na presença de 0 a 10 mM de L-carnitina.

Como apresentado na Figura 6, a produção embrionária foi afetada pelo suplemento proteico utilizado (SFB ou BSA). Quando a etapa de MIV foi realizada na presença de BSA, houve uma redução significativa ($P<0,05$) nas taxas de clivagem (74,2 vs 83,0%, respectivamente para os grupos BSA e SFB) e de blastocistos (19,0 vs 33,0%, respectivamente para os grupos BSA e SFB).

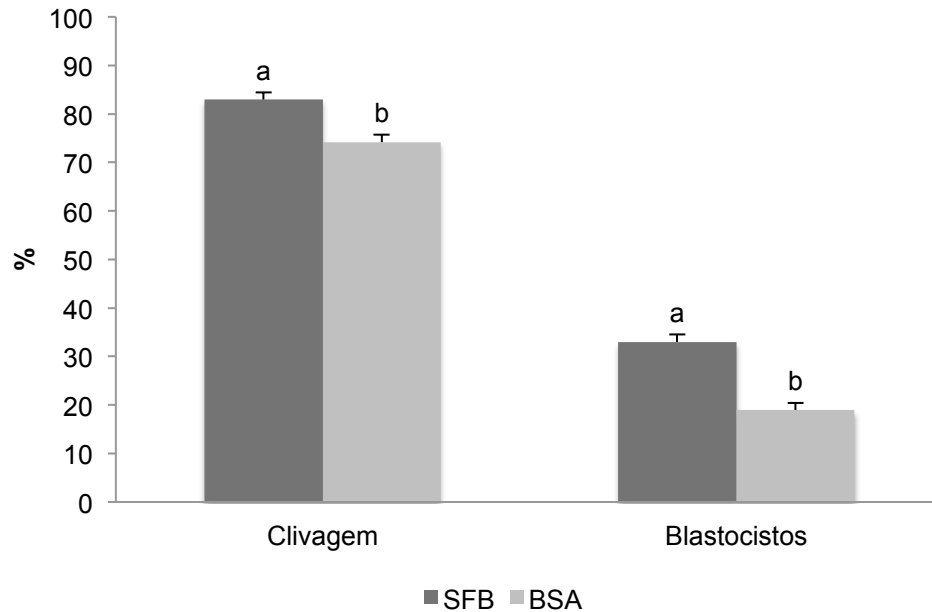


Figura 6. Taxas de clivagem e de blastocistos obtidas a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA). Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Barras com letras distintas dentro da mesma avaliação diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Clivagem (72 h pós-inseminação (h.p.i.)), desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (168 h.p.i.) de blastocistos bovinos produzidos a partir de oócitos MIV na presença de 10% de SFB ou 0,6% de BSA.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a suplementação do meio de MIV com L-car (1, 5 e 10 mM), na presença de SFB, resultou em redução no conteúdo lipídico intracitoplasmático de oócitos bovinos, se assemelhando ao encontrado nos oócitos imaturos, antes da exposição ao soro. A L-car é um regulador metabólico que participa como catalizador no transporte de ácidos graxos até a matriz mitocondrial, para a geração de ATP na via de β -oxidação (KERNER e HOPPEL, 2000), aumentando assim o metabolismo lipídico nesta organela.

Em um estudo recente realizado por BALDOCEDA *et al.* (2015) foi confirmado que a suplementação do meio de cultivo embrionário com L-car aumenta o metabolismo lipídico mitocondrial. Essa observação foi confirmada a partir da redução do número de gotas de lipídios citoplasmáticas e aumento do PMM nos blastômeros. Entretanto neste estudo, a redução do conteúdo lipídico induzida pela L-car na presença de SFB não pode ser relacionada ao aumento da atividade

mitocondrial, uma vez que não houve efeito positivo da L-car sobre o PMM nos mesmos grupos experimentais. Pelo contrário, a suplementação com 10 mM de L-car na presença de SFB resultou em uma redução significativa no PMM, a qual foi acompanhada do aumento da produção de ROS e uma tendência de redução do desenvolvimento embrionário subsequente.

Além do efeito regulador do metabolismo, a L-car atua como antioxidante para as células animais, reduzindo a peroxidação lipídica e apoptose induzida pelo estresse oxidativo (YE *et al.* 2010). A suplementação com L-car durante a etapa de MIV demonstrou reduzir o acúmulo de ROS em oócitos suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011). Todavia, quando na presença de SFB, não exerceu nenhum efeito sobre o acúmulo de ROS nesse estudo, com exceção da concentração de 10 mM. Acredita-se que a elevação do acúmulo de ROS neste grupo experimental seja em decorrência da redução do PMM e/ou um efeito antioxidante da L-car, uma vez que SOMFAI *et al.* (2011) observaram que a atividade mitocondrial elevada em oócitos tratados com L-car foi associada com uma redução no nível intracelular de ROS, indicando um efeito antioxidante. É possível que na presença da concentração mais elevada de L-car a produção aumentada de ROS anule os efeitos benéficos do aumento do metabolismo mitocondrial (SOMFAI *et al.*, 2011). Níveis intracelulares elevados de ROS gerados pela atividade metabólica anormalmente elevada, podem reduzir a competência de desenvolvimento de embrionário (GUERIN *et al.* 2001; LEESE *et al.* 2008).

A redução de ROS ocorreu apenas no grupo suplementado com 1 mM de L-car na presença de BSA. Pode-se especular que as condições de incubação, como a adição de SFB ou BSA ao meio, bem como a presença das células do cumulus, possam ter mascarado o efeito antioxidante (THOMPSON *et al.*, 1990) do suplemento adicionado, ou mesmo que o sistema de cultivo não resulte em qualquer estresse oxidativo (ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2004).

A energia produzida pela via da β -oxidação mitocondrial é responsável suportar processos críticos do desenvolvimento associados à maturação nuclear (retomada da meiose) e citoplasmática, bem como o desenvolvimento embrionário subsequente (DUNNING *et al.*, 2010).

Sabe-se que a migração das mitocôndrias durante a maturação está relacionada ao potencial de desenvolvimento do oócito até embrião (HYTTEL *et al.*, 1997) e compreende um dos parâmetros de avaliação de maturação citoplasmática. No oócito imaturo (VG) as mitocôndrias se concentram na periferia do citoplasma, enquanto que, nos oócitos maturados (M II), essas estruturas migram para o centro (SUN *et al.*, 2001). Um padrão similar de distribuição mitocondrial foi observado nos grupos experimentais neste estudo. Todavia, o aumento da proporção de oócitos com distribuição do tipo dispersa (geral) no grupo suplementado com 10 mM de L-car, independente do suplemento proteico utilizado, não pôde ser correlacionado à uma maior competência para o desenvolvimento embrionário. O padrão de migração observado pode indicar uma maturação citoplasmática mais adequada nesse grupo experimental, porém não foi acompanhada por um aumento na taxa de blastocistos.

Neste estudo não houve efeito da suplementação com as diferentes concentrações de L-car sobre a maturação nuclear e sobre a aquisição da competência para o desenvolvimento dos oócitos até o estágio de blastocisto. Salvo uma tendência de redução da taxa de blastocistos com a concentração de 10 mM de L-car, a qual pode ser relacionada com a redução da atividade mitocondrial e aumento de ROS, possivelmente por um efeito tóxico da concentração elevada de L-car. Apesar de ter sido demonstrado um efeito benéfico da suplementação do meio de MIV com L-car sobre a maturação oocitária e no aumento do potencial de desenvolvimento embrionário em ratos (ABDELRAZIK *et al.*, 2009; DUNNING *et al.*, 2010), suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011) e bovinos (PHONGNIMITR *et al.*, 2013), neste estudo o mesmo não foi observado, independente do suplemento proteico utilizado.

O SFB e BSA são os suplementos proteicos frequentemente utilizados para melhorar a PIV de embriões bovinos (LEIVAS *et al.*, 2011). Especialmente o SFB, uma vez que, durante a MIV, os oócitos absorvem lipídios que serão armazenados em gotas de lipídios citoplasmáticas (KIM *et al.*, 2001). Neste trabalho, o acúmulo lipídico após a MIV na presença de BSA foi menor, em relação ao SFB no grupo Controle, em conformidade com relatos prévios (DEL COLLADO *et al.*, 2015).

Apesar possíveis efeitos deletérios do SFB sobre o acúmulo lipídico, sugere-se que os elementos presentes neste suplemento promovam além da melhora da

taxa de maturação nuclear, a migração de organelas durante a etapa de MIV (DEL COLLADO *et al.*, 2015). Por esta razão, tem sido difícil evitar ou encontrar um substituto adequado para o soro em formulações de meios para a PIV.

A utilização do BSA neste estudo, como uma alternativa ao SFB, não interferiu no acúmulo lipídico dos oócitos MIV em meio suplementado com L-car, em relação aos oócitos imaturos. Em geral, foi observada uma redução no acúmulo intracelular de ROS, acompanhado pela redução da atividade mitocondrial. Sugere-se que a L-car na presença do BSA não induza o aumento do metabolismo lipídico, observado quando se utilizou a suplementação com SFB, o qual resultou em redução do conteúdo lipídico associado ao aumento da atividade mitocondrial.

Além disso, a suplementação com BSA na etapa de MIV, independente da adição de L-car reduziu a produção embrionária (taxas de clivagem e blastocistos), as quais não foram correlacionadas com modificações nas taxas de maturação nuclear e citoplasmática, esta última avaliada pela distribuição mitocondrial no citoplasma oocitário.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação do meio de MIV com L-car resultou em redução 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 do PMM e elevação do conteúdo de ROS e, do efeito negativo 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, sendo por isso utilizada no trabalho subsequente (Experimento III).

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.
- BALDOCEDA, L.; GAGNÉ, D.; FERREIRA, C.R.; ROBERT, C. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by L-carnitine. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.
- 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.
- 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.
- DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N.Z.; LOPES, F.L.; GASPAR, R.C.; PADILHA, L.C.; COSTA, R.R.; ROSSI, G.F.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.
- DUNNING, K.R.; RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L.. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v.148, p.15–27, 2014.
- 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.
- GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.E.L.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum. Reprod. Update**, v.7, p.175–189, 2001.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23–32, 1997.
- 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.

LEESE, H.J.; BAUMANN, C.G.; BRISON, D.R.; MCEVOY, T.G.; STURMEY, R.G. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol. Hum. Reprod.*, v.14, p.667–672, 2008.

LEIVAS, F.G.; BRUMB, D.S.; FIALHOA, S.S.; SALIBAB, W.P.; ALVIMB, M.T.T.; BERNARDIC, M.L.; RUBINA, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology*, v.75, p.429-433, 2011.

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.

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

PLOURDE, D.; VIGNEAULT, C.; LEMAY, A.; BRETON, L.; GAGNE, D.; LAFLAMME, I.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of oocyte source and culture conditions to phenotypic and transcriptomic variation in commercially produced bovine blastocysts. *Theriogenology*, v.78, p.116–131, 2012.

ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; NOGUEIRA, É.; ACCORSI, M.F.; MINGOTI, G.Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.26, p.797-805, 2014.

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.

SUN, Q.Y.; WU, G.M.; LAI, L.; PARK, K.W.; CABOT, R.; CHEONG, H.T.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S.; SCHATEN, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*, v.122, p.155–63, 2001.

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.

THOMPSON, J.G.E.; SIMPON, A.C.; PUGH, P.A.; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v.89, p.573–578, 1990.

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.

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.

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

RESUMO – Este estudo foi realizado com o objetivo avaliar os efeitos da suplementação do meio de maturação *in vitro* (MIV) com 100 µM de ALA, 5 mM de L-car e da associação de ambos tratamentos (ALA + L-car) na presença de soro fetal bovino (SFB), sobre o potencial de desenvolvimento oocitário e criotolerância embrionária. Ainda, foi avaliada a expressão de genes envolvidos com o metabolismo lipídico (regulação da lipogênese: SCD1, FASN e SREBP1; regulação da via metabólica de β-oxidação: CPT1B e CPT2) em oócitos tratados e nos embriões produzidos. Não houve efeito ($P>0,05$) dos suplementos sobre as taxas de clivagem (79,54 – 82,16%) e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (29,03 – 30,46%). Os tratamentos não alteraram ($P>0,05$) o conteúdo lipídico intracelular dos blastocistos produzidos (1,03 – 1,15 pixels) e, conseqüentemente, a criotolerância embrionária avaliada pelas taxas de re-expansão após 24h de cultivo pós aquecimento (67,3 – 78,3%) e de eclosão após 48h (11,5 – 25,5%). Entretanto, os diferentes suplementos utilizados resultaram em uma redução ($P<0,05$) na concentração de ROS nos blastocistos produzidos (0,82 - 0,85 unidades arbitrárias de fluorescência - UAF), em comparação ao grupo Controle (1,00 UAF). De forma semelhante, foi observada redução ($P<0,05$) da porcentagem de blastômeros apoptóticos (6,94 – 7,50%) nos grupos tratados, em relação ao grupo Controle (11,97%). O número de células totais dos blastocistos resultantes (73,56 – 87,26 blastômeros) não foi alterado ($P>0,05$). Em conclusão, 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. Todavia, 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 realizado na MIV com os suplementos. Porém, para os genes relacionados à lipólise,

um possível efeito positivo foi perdido e, talvez seja necessário o tratamento na etapa de CIV.

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

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços que ocorreram com o aperfeiçoamento dos métodos de cultivo e novos conhecimentos sobre a fisiologia, ultra-estrutura e morfologia embrionária (GARDNER, 2008), os sistemas de produção *in vitro* (PIV) ainda resultam em embriões menos criotolerantes do que aqueles obtidos *in vivo* (SEIDEL, 2006). A reduzida criotolerância destes embriões se deve, principalmente, ao seu excessivo conteúdo lipídico (SEIDEL, 2006; HORVATH *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007; LAPA *et al.*, 2011). Até o momento, não está muito claro o porquê e como ocorre esse acúmulo excessivo de lipídios em oócitos cultivados *in vitro*, todavia acredita-se que possa ser influenciado pelos suplementos utilizados no meio de cultivo indefinido, especialmente o soro fetal bovino (SFB) utilizado durante a maturação *in vitro* (MIV). Na presença de SFB, os oócitos absorvem maiores quantidades de lipídios, os quais são esterificados em triacilgliceróis e ésteres de colesterol para serem, então, armazenados em gotas de lipídios citoplasmáticas (KIM *et al.*, 2001).

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). Sabe-se que a qualidade oocitária determina a proporção de oócitos que irão se desenvolver até o estágio de blastocisto, enquanto que as condições de cultivo tem um maior impacto sobre a qualidade dos embriões obtidos (KORHONEN *et al.*, 2010). Todavia, evidências sugerem que as condições de maturação também influenciam a qualidade embrionária (RÄTY *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”) aos 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 atuam de maneira a reduzir a expressão gênica de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios (AL DARWICH *et al.*, 2010). O ácido linolênico (ALA) é um PUFA n-3 naturalmente encontrado no plasma e fluido follicular em bovinos. Estudos anteriores demonstraram que a suplementação do meio de MIV com ALA resultou em efeito benéfico sobre eventos associados à maturação oocitária, o que resultou em melhor aquisição do potencial de desenvolvimento e qualidade embrionária (MAREI *et al.*, 2009). Apesar disso, sobre os efeitos do ALA sobre o metabolismo lipídico e a atividade mitocondrial em oócitos não estão claramente elucidados.

A L-carnitina (L-car) aumenta o metabolismo lipídico na mitocôndria (BALDOCEDA *et al.*, 2015). É um regulador metabólico que desempenha um papel crucial na via de β -oxidação por catalizar o transporte de ácidos graxos até a matriz mitocondrial para a geração de ATP (KERNER e HOPPEL, 2000). A energia produzida pela via da β -oxidação mitocondrial é responsável por suportar processos críticos do desenvolvimento associados à maturação nuclear (retomada da meiose) e citoplasmática, bem como o desenvolvimento embrionário (DUNNING *et al.*, 2010). O aumento da atividade mitocondrial promovida pela suplementação *in vitro* com L-car demonstrou estar relacionado à melhora da maturação oocitária e no aumento do potencial de desenvolvimento embrionário em ratos (ABDELRAZIK *et al.*, 2009; DUNNING *et al.*, 2010), suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011), bovinos (PHONGNIMITR *et al.*, 2013). Adicionalmente, estudos recentes relataram que a suplementação com L-car nos meios de cultivo promoveu a redução do conteúdo lipídico intracelular em embriões bovinos produzidos *in vitro* (TAKAHASHI *et al.*, 2013; BALDOCEDA *et al.*, 2015) e em oócitos suínos maturados *in vitro* (SOMFAI *et al.*, 2011), podendo ser utilizada como um tratamento visando aumentar a criotolerância (BALDOCEDA *et al.*, 2015).

Baseado no conhecimento sobre o mecanismo de ação da L-car sobre o metabolismo lipídico, e nos efeitos dos PUFA n-3 na regulação de genes de metabolismo lipídico, acredita-se que a suplementação do meio de MIV com a associação destes componentes possa resultar no aumento do consumo da reserva de ácidos graxos intracelulares em oócitos, a partir da β -oxidação, além da redução

da síntese e acúmulo de triacilgliceróis. O aumento da criotolerância embrionária poderia ser a consequência da alteração/redução do conteúdo lipídico do oócito e, subsequentemente, do embrião. Até o momento, poucos trabalhos avaliaram os efeitos da adição de PUFA n-3 no sistema de PIV convencional sobre a criotolerância embrionária (AL DARWICH *et al.*, 2010; LEÃO, 2012) e, até onde se conhece, a associação de ALA e L-car ainda não foi estudada.

Portanto, oócitos bovinos submetidos ao sistema de PIV de embriões foram alvo deste estudo, que tem como objetivo avaliar os efeitos da suplementação com ALA, L-car e da associação de ambos tratamentos (ALA + L-car) durante a etapa de MIV sobre o metabolismo celular, potencial de desenvolvimento oocitário e criotolerância embrionária. Ainda, foi avaliada a expressão de genes envolvidos com o metabolismo lipídico (regulação da lipogênese: SCD1, FASN e SREBP1; e regulação da via metabólica de β -oxidação: CPT1B e CPT2) em oócitos tratados e nos embriões produzidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes químicos

Todos os reagentes utilizados são testados para o cultivo celular ou embrionário e foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Caso contrário, encontram-se especificados no texto.

O ALA foi diluído em DMSO (concentração final de DMSO < 0,1%), para obtenção de uma solução estoque (90 mM), a qual foi alíquotada e armazenada a -20°C. No momento da utilização, a solução estoque de ALA foi diluída em meio de maturação (B-199) para obter a concentração final de 100 μ M. A L-carnitina (L-car) foi diluída em água ultrapura, para obtenção de uma solução estoque (100 mM), a qual foi alíquotada e armazenada a -20°C. No momento da utilização, a solução estoque de L-car foi diluída em meio de maturação (B-199) para obter a concentração final de 5 mM. A associação de ALA com L-car (ALA + L-car) foi preparada a partir da solução final com 100 μ M de ALA, adicionando-se o estoque de L-car afim de obter a concentração de 5 mM.

O meio de lavagem H-199 foi constituído de TCM-199 (Tissue Culture Medium 199 (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 20 mM de HEPES, 5mM de bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de amicacina. O meio de maturação (B-199) foi constituído de TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 25 mM de bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 100 UI/mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de SFB (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA). O meio de fertilização foi TALP-FIV, suplementado com 0,2 mM de piruvato de sódio, 6 mg/mL de BSA “FA-free” fração V, 25 mM de bicarbonato de sódio, 13 mM de lactate de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 40 µL/mL de solução de PHE (concentrações finais de 20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina e 2 µM epinefrina), e 10 µg/mL de heparina. O meio de cultivo utilizado foi SOFaa, suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BEM aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB.

Obtenção e seleção dos oócitos

Os complexos cumulus-oócito (COCs) foram obtidos a partir de ovários de vacas abatidas em frigoríficos na região de Araçatuba-SP e transportados até o laboratório em garrafas contendo solução salina (30-35 °C), não excedendo o limite de 4 horas desde o abate até o início das aspirações. Folículos ovarianos entre 3-8 mm de diâmetro foram puncionados com seringa acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL, que permaneceram em repouso por 15 minutos para decantação do conteúdo, posteriormente inspecionado para a seleção dos COCs. Somente COCs circundados por pelo menos quatro camadas de células do cumulus compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação. O tempo médio da seleção até o início do cultivo foi de aproximadamente 1 hora.

Produção *in vitro* dos embriões

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 e uma vez em meio de maturação B-199. Foram transferidas 50 estruturas para cada poço da placa de cultivo (NUNC, Thermo Scientific, Rochester, NY, USA), contendo 500 µL de meio B-199, sem óleo mineral. O meio de maturação foi suplementado com 100 µM de ALA, 5 mM de L-car ou 100 µM de ALA + 5 mM de L-car. O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar, a 38,5°C e com máxima umidade, durante 22 horas.

Em seguida, os COCs foram submetidos à fecundação *in vitro* (FIV). Para o preparo do sêmen, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36°C, durante 40 segundos e seu conteúdo centrifugado em gradiente de densidade descontínua de Percoll (250 µL de Percoll 45% sobre 250 µL de Percoll 90%, em microtubo de 1,5 mL; Pharmacia, Uppsala, Sweden) durante 7 minutos a 2750 rpm. O sedimento recuperado foi avaliado quando ao volume, concentração e motilidade espermática. Os espermatozoides foram adicionados à gota de fertilização na concentração de 2×10^6 células/mL. Os COCs (25/gota de 90 µL) e os espermatozoides foram coincubados em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5 °C, por até 22 horas. O dia da fertilização foi definido como Dia 0 (D0).

Após a etapa da FIV, os prováveis zigotos foram pipetados sucessivamente para a retirada do excesso de células do cumulus e transferidos para o meio de CIV. O cultivo embrionário foi realizado em poços de placas NUNC contendo 500 µL de meio SOFaa, sem óleo mineral. Esta etapa foi conduzida em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e temperatura de 38,5 °C por até sete dias. Após 72 horas de cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 72 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário avaliado às 168 hpi (D7).

Quantificação lipídica intracitoplasmática

A avaliação do acúmulo lipídico intracitoplasmático foi realizada em blastocistos e blastocistos iniciais produzidos como descrito anteriormente. Os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído (4%) à temperatura ambiente, por 2 horas. Após a fixação, os mesmos foram lavados em PBS e imersos em solução de etanol

50% em água destilada, durante 2 minutos. Em seguida foram corados com Sudan Black B 1% (corante lipofílico) diluído em etanol 70%, por 2 minutos. Posteriormente, foram imersos 3 vezes, por 5 minutos cada em solução de etanol 50% e, em sequência, em água destilada acrescida de 1% PVP. Então, os embriões foram colocados em lâminas com glicerol para serem analisados no microscópio de luz (IX51, Olympus, Tóquio, Japão). As imagens foram fotografadas e analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) após conversão em escala de cinza e delimitação dos embriões, para determinação da área e da intensidade média (pixels) pela área.

Mensuração do conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo ensaio com diclorofluoresceína

Os níveis intracelulares de ROS (H_2O_2 , $HO\bullet$, $ROO\bullet$) foram quantificados por meio da sonda fluorescente diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA ; Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) de acordo com Rocha-Frigoni *et al.* (2014). Blastocistos e blastocistos iniciais produzidos como descrito anteriormente foram lavados duas vezes em PBS-PVP. Em seguida foram incubados em 5 μM de H_2DCFDA durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% CO_2 em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS-PVP e avaliados imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (IX51, Olympus, Tóquio, Japão), sob excitação de 495 nm e emissão de 520 nm. As imagens obtidas foram posteriormente analisadas pelo programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc., Version 5.0.1.26) após conversão em escala de cinza, para quantificação da intensidade de fluorescência emitida. Foi realizada a delimitação dos embriões para determinação da área e da intensidade do sinal de fluorescência (unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) pela área. A intensidade do sinal de background foi subtraída dos valores obtidos nas fotos dos tratamentos. Quanto maior a intensidade de fluorescência, maior o conteúdo intracelular de ROS.

Detecção da fragmentação nuclear através da coloração com “Terminal Transferase Assay” – TUNEL

As células em apoptose dos embriões foram marcadas pela coloração “in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP, Nick and labeling assay” (TUNEL), descrita por Paula Lopes e Hansen (2002). Blastocistos obtidos no D7 foram lavados por quatro vezes em 100 µL de PBS acrescido de 1% PVP (PBS-PVP) e posteriormente fixados, com a zona pelúcida intacta, em 100 µL de solução de paraformaldeído (4%) à temperatura ambiente, por 1 hora. Os embriões foram permeabilizados em solução de Triton X-100 (0,5%, v/v) em solução de citrato de sódio (0,1%), por 30 minutos à temperatura ambiente.

Os embriões reservados para o controle positivo foram incubados com DNase I (50 UI/mL de água Milli-Q) (RNase free) a 37°C, por 1 hora, enquanto os embriões dos tratamentos permaneceram, pelo mesmo período, em gotas de 100 µL de PBS-PVP. Posteriormente, todos os embriões foram lavados em PBS-PVP e incubados, em câmara úmida, com 15 µL da mistura (1:9 da enzima – tubo 1 e do tampão da enzima – tubo 2, respectivamente) para a coloração de TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Germany), por 1 hora a 37°C no escuro. Os embriões reservados para o controle negativo foram incubados na ausência da enzima “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) (tubo 1, contida no kit). Posteriormente, os embriões foram incubados em solução Hoechst 33342 (1 µg/mL de PBS-PVP) por 30 minutos, em temperatura ambiente.

Por fim, os embriões foram lavados em PBS-PVP e colocados entre lâmina e lamínula com glicerina tamponada (9:1). Estes foram avaliados em microscópio equipado com epifluorescência (excitação de 510-550 nm e emissão de 590 nm) quanto ao número de células com fragmentação de DNA (TUNEL positivas = fluorescência verde ou amarelada pontual dentro no núcleo) em relação ao número total de células (determinado pelos núcleos corados em azul pelo corante Hoechst).

Vitrificação e avaliação da re-expansão embrionária pós-desvitrificação

Foi utilizado o protocolo Vitri-Ingá (INGÁMED - Produtos Médicos Hospitalares, Perobal, PR, Brasil) para vitrificação e desvitrificação (aquecimento) dos embriões. Todos os meios e materiais utilizados foram adquiridos da empresa.

Os embriões obtidos no dia 7 de desenvolvimento foram retirados da placa de CIV e transferidos para gotas de meio mSOF. Então, foram classificados morfológicamente de acordo com o Manual da IETS (WRIGHT *et al.*, 2009) e apenas os blastocistos expandidos de graus 1 e 2 foram selecionados para vitrificação. Em seguida, foram transferidos para uma gota de solução de vitrificação 1 (VI – 1), e posteriormente, foram lavados três vezes em gotas da solução de vitrificação 2 (VI – 2). No decorrer do tempo determinado no protocolo, todos os embriões foram retirados com auxílio de uma pipeta, em menos de 2 µL da solução VI - 2, sendo depositados na porção final de uma haste de polipropileno de 0,7 mm de espessura. Ao completar o tempo estabelecido no protocolo, a porção final das hastes foi mergulhada em nitrogênio líquido e seus protetores foram acoplados. Finalmente, as hastes foram introduzidas em raques previamente identificadas com os grupos experimentais e armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para desvitrificação dos embriões, as hastes foram retiradas do botijão de nitrogênio onde estavam armazenadas, e seus protetores foram desacoplados. A porção final das hastes foi imersa na solução de desvitrificação 1 (DV – 1), até que a microgota fosse desfeita. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução 2 (DV – 2), e por fim, na solução 3 (DV – 3). Após esse procedimento, os embriões foram lavados em meio SOFaa e transferidos para placas de poços contendo 500 µL de meio SOFaa suplementado com 0,5% de BSA e 20% de SFB. Os embriões foram cultivados *in vitro*, à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% CO₂ em ar, por até 48h. Foram avaliadas as taxas de sobrevivência *in vitro* (expressa pela taxa de re-expansão as 24h após reaquecimento) e de eclosão (expressa pela taxa de embriões eclodidos as 48h após reaquecimento).

Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Oócitos e embriões foram lavados em PBS acrescido 0,1% PVA e 1 U/µL de inibidor de RNase, transferidos para microtubos contendo 1 µL desta solução e mergulhados em nitrogênio líquido para posterior avaliação da expressão dos genes: CPT1B, CPT2, SCD1, FASN, SREBP1. O número de estruturas utilizadas em cada "pool" foi determinado de acordo com a eficiência da técnica, tendo sido determinado

o “pool” de 30 oócitos e de 15 blastocistos expandidos (os resultados dos testes realizados não foram apresentados). A validação dos primers incluiu a utilização de uma curva padrão com 7 pontos de fator de diluição de 1:5 entre cada ponto. Os “slopes” das curvas foram padronizados para estarem entre -3.02 e -3.2 e o valor de R superior a 99%.

Para a extração do RNA foi utilizado o kit Rneasy Micro Kit (Qiagen, Maryland, USA), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA total foi submetido à transcrição reversa, utilizando-se a enzima Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) (Invitrogen, CA, USA), segundo protocolo do fabricante. Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado o QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen), no Mx3005P QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Os primers para cada gene e controle endógeno foram obtidos a partir do genoma bovino publicado no “genome browser” da UCSC (KENT *et al.*, 2002), utilizando o programa Primer3 (Primer3web, version 4.0.0: <http://primer3.ut.ee>), e foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich. As sequências dos primers utilizados nesse estudo encontram-se apresentadas na Tabela 1. Foram utilizados os genes GAPDH, SDHA e β -actin como controles endógenos.

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

Gene	Número de acesso	“Primers”	
		Senso (5'- 3')	Anti-senso (5'- 3')
CPT1B	NM_001034349	GGTCAACAGCAACTACTACG	TGAACATCCTCTCCATCTGG
CPT2	NM_001045889	TGACCAGAGAAGCAGCAATG	CTGGTGGACAGGATGTTGTG
SCD1	NM_173959	CTGGCTGGTGAATAGTGCTG	AAGGTGTGGTGGTAGTTGTGG
FASN	AY343889	CACTCCATCCTCGCTCTCC	GCCTGTCATCATCTGTCACC
SREBP1	NM_001113302	CCGTTTCTTCGTGGATGG	ATGCTGGAGCTGATGGAG
GAPDH	NM_001034034.2	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	CAACAGACACGTTGGGAGTG
SDHA	NM_174178	GCAGAACCTGATGCTTTGTG	CGTAGGAGAGCGTGTGCTT
β -actin	NM_173979	CCAACCGTGAGAAGATGACC	AGGGCGTACCCCTCATAGAT

As amostras foram amplificadas após um período de pré-incubação a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos de amplificação (15 seg a 94°C, 33 seg at 58°C, 33 seg at 72 °C). Todas as reações apresentaram um único produto, determinado pela análise da “melting curve”. As reações de PCR foram conduzidas em triplicatas para

cada amostra e a expressão foi determinada pela quantificação relativa do gene selecionado ajustado pelos genes controle endógenos (“cycle threshold” ou valores ct obtidos através do uso de standard específico para cada gene utilizado). Os valores obtidos para cada gene de interesse foram normalizados pela média geométrica do gene de referência e utilizados para a análise estatística. A escolha do gene endógeno foi realizada utilizando-se o programa RefFinder (XIE *et al.*, 2012), sendo considerados o GAPDH e β -actin como genes de referência mais estáveis para a expressão gênica de oócitos e embriões, respectivamente.

Delineamento experimental

Com base nos resultados obtidos nos estudos anteriores, (Capítulos 2 e 3) foram determinadas as concentrações de ALA (100 μ M) e L-carnitina (5 mM) mais adequadas para a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, as quais foram utilizadas neste estudo. A respeito da suplementação proteica, foi utilizada apenas a suplementação com 10% de SFB na MIV, uma vez que a suplementação com 0,6% de BSA resultou em redução do desenvolvimento embrionário, como observado nos experimentos anteriores. Os grupos experimentais encontram-se apresentados na Figura 1.

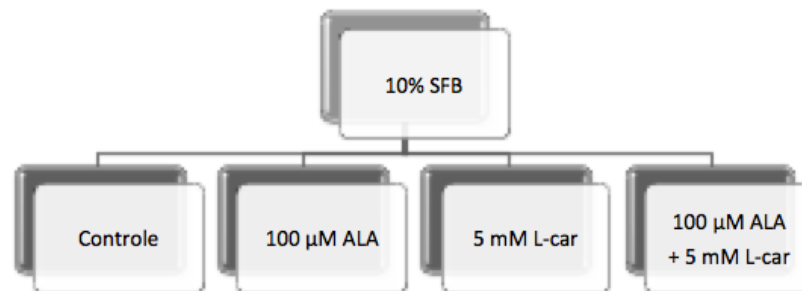


Figura 1. Esquema ilustrativo do delineamento experimental de acordo com a composição dos meios de maturação *in vitro* utilizados no Experimento III.

Para avaliar o impacto da suplementação com as concentrações pré-determinadas de ALA, L-car e da associação de ambos tratamentos (ALA + L-car) sobre o metabolismo lipídico de oócitos bovinos maturados *in vitro*, foram realizadas as seguintes avaliações em oócitos, após 22 horas de MIV:

- 1) Expressão das enzimas carnitina palmitoil transferase I (CPT1B) e II (CPT2), as quais participam ativamente da regulação da β -oxidação de lipídeos em oócitos bovinos;
- 2) Expressão de genes e fator de crescimento relacionados à síntese de lipídeos: estearoil-CoA-dessaturase (SCD1), “fatty acid synthase” (FASN) e “sterol-regulatory element binding protein” (SREBP1);

Outra parte dos oócitos MIV foi destinada à produção de embriões para avaliação do potencial de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto. No dia 7 do cultivo, blastocistos de graus 1 e 2 foram destinados às seguintes avaliações:

- 1) Quantificação lipídica intracitoplasmática ($n = 60$);
- 2) Mensuração do conteúdo intracelular de ROS ($n = 115$);
- 3) Qualidade embrionária, a partir da detecção de fragmentação nuclear ($n = 103$);
- 4) Análise de transcritos diferencialmente expressos dos mesmos genes e enzimas listados nos itens 1 e 2 acima ($n = 180$);
- 5) Avaliação da criotolerância embrionária ($n = 260$).

Análise Estatística

O experimento foi repetido de 4 a 6 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Em cada replicata foi utilizado um poço da placa de cultivo celular contendo 50 oócitos para cada grupo experimental, sendo este considerado a unidade experimental. A taxa de blastocistos foi calculada no D7 do CIV, a partir do número de oócitos inseminados. Os dados foram analisados pela fração de oócitos ou embriões cultivados atingindo os estágios determinados, reportada em termos de porcentagem. As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o modelo “General linear model” (GLM) do SAS statistical software package 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey. O estudo comparativo entre variáveis binomiais (reexpansão e eclosão pós-vitrificação) foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). As diferenças na expressão

dos genes entre os grupos foram avaliadas pelo teste de “Duncan’s Multiple Range Test”. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas. As médias estão apresentadas na forma de quadrados mínimos \pm erro padrão da média (EPM).

3. RESULTADOS

Quantificação lipídica intracitoplasmática em blastocistos

A suplementação com 100 μ M de ALA, 5 mM de L-car ou sua associação (ALA + L-car) realizada durante a etapa de MIV não alterou ($P>0,05$) o conteúdo lipídico intracelular dos blastocistos produzidos (1,03 – 1,15 pixels), como apresentado na Figura 2.

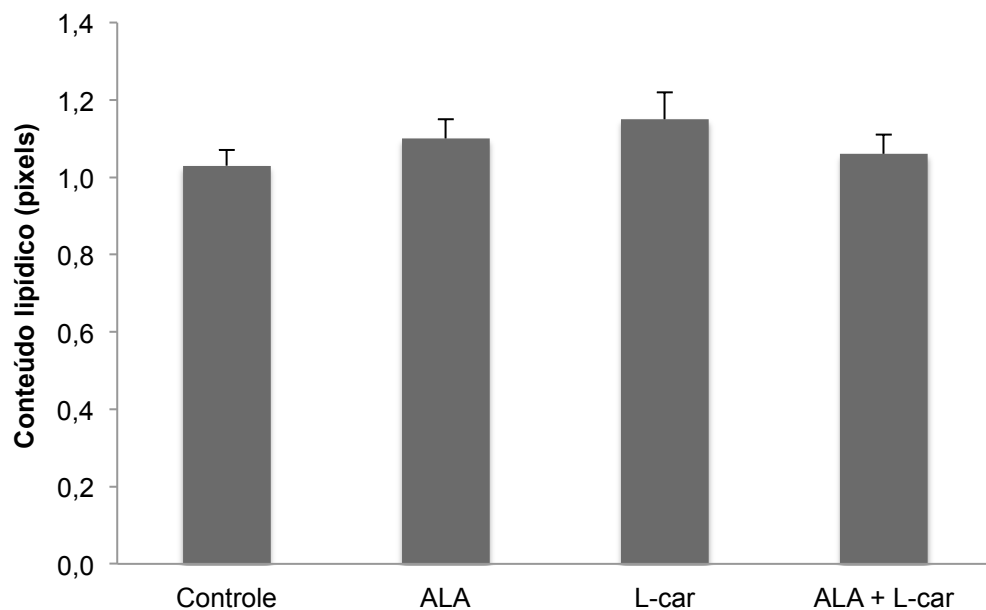


Figura 2. Conteúdo lipídico intracitoplasmático (em pixels) de blastocistos bovinos derivados de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car). Dados apresentados como média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P>0,05$). ALA: 100 μ M; L-car: 5 mM; ALA + L-car: 100 μ M de ALA + 5 mM de L-car.

Mensuração do conteúdo intracelular de ROS em blastocistos

Conforme apresentado na Figura 3, os diferentes suplementos utilizados na MIV de oócitos resultaram em redução ($P<0,05$) na concentração de ROS nos blastocistos produzidos nos grupos ALA (0,84 UAF), L-car (0,85 UAF) e ALA + L-car

(0,82 UAF), em comparação ao grupo Controle (1,00 UAF).

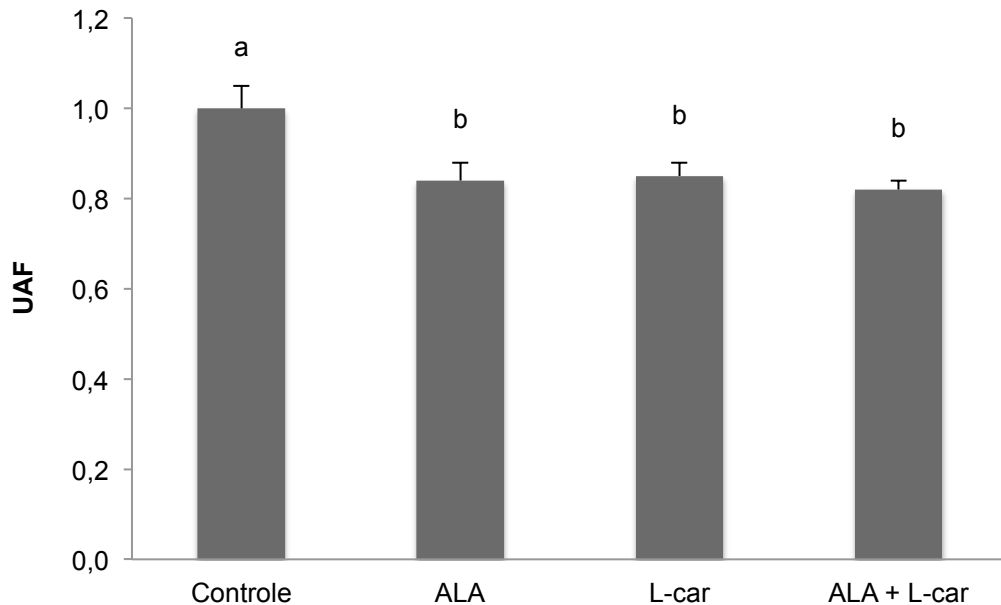


Figura 3. Conteúdo intracelular de espécies reativas de oxigênio (expresso em unidades arbitrárias de fluorescência - UAF) de blastocistos bovinos derivados de oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car). Dados apresentados como média ± EPM. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). ALA: 100 μ M; L-car: 5 mM; ALA + L-car: 100 μ M de ALA + 5 mM de L-car.

Avaliação da fragmentação nuclear em blastocistos

A suplementação com ALA, L-car ou sua associação (ALA + L-car) durante a etapa de MIV não alterou ($P > 0,05$) o número de células totais dos blastocistos resultantes (73,56 – 87,26 blastômeros), conforme apresentado na Tabela 2. Entretanto, todos os tratamentos resultaram em uma redução ($P < 0,05$) da porcentagem de blastômeros apoptóticos (6,94 – 7,50 blastômeros), em relação ao grupo Controle (11,97 blastômeros).

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).

Grupos	Células totais	Células apoptóticas
Controle	73,56 ± 2,57	11,97 ± 1,18 ^a
ALA	85,71 ± 4,44	6,94 ± 0,98 ^b
L-car	87,26 ± 4,35	7,50 ± 1,16 ^b
ALA + L-car	85,69 ± 3,82	4,59 ± 3,63 ^b

Dados apresentados como quadrados mínimos ± EPM. ^{abc}Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). ALA: 100 µM; L-car: 5 mM; ALA + L-car: 100 µM de ALA + 5 mM de L-car.

Avaliação da criotolerância embrionária

Como apresentado na Tabela 3, a suplementação com ALA e/ou L-car durante a MIV, na presença de soro fetal bovino (SFB) não resultou em nenhum efeito (P>0,05) sobre a criotolerância embrionária, avaliada pelas taxas de re-expansão após 24h de re-cultivo (67,3 – 78,3%) e de eclosão após 48h de re-cultivo (11,5 – 25,5%).

Tabela 3. Taxa de re-expansão da blastocelule 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).

Grupos	Desvitrificados	Re-expansão as 24h	Eclosão as 48h
	(n)	n (%)	n (%)
Controle	60	47 (78,3)	15 (25,5)
ALA	68	51 (75,0)	13 (19,1)
L-car	80	56 (70,0)	15 (18,8)
ALA + L-car	52	35 (67,3)	6 (11,5)

Não foram observadas diferenças entre os tratamentos (P>0,05) pelo teste do Qui-quadrado. ALA: 100 µM; L-car: 5 mM; ALA + L-car: 100 µM de ALA + 5 mM de L-car.

Produção *in vitro* de embriões

Não houve efeito (P>0,05) dos suplementos utilizados durante a MIV sobre as taxas de clivagem (79,54 – 82,16%) e de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (29,03 – 30,46%) neste estudo, como apresentado na Figura 4.

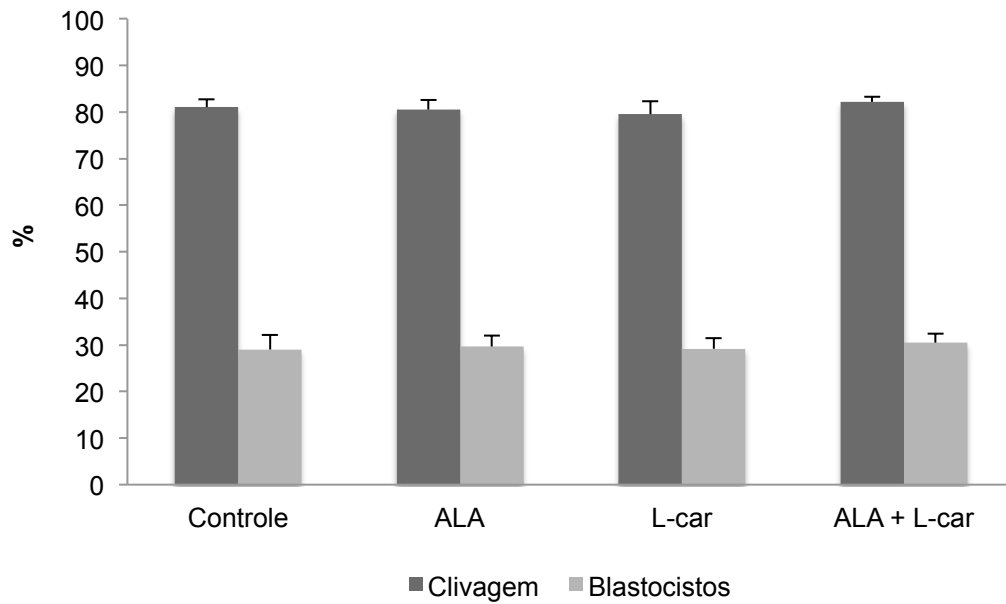


Figura 4. Taxas de clivagem e de blastocistos obtidos a partir de oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car). Dados apresentados como quadrados mínimos \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). Clivagem (72 h pós-inseminação (h.p.i.)), desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (168 h.p.i.) de blastocistos bovinos produzidos a partir de oócitos MIV na presença de ALA: 100 μ M; L-car: 5 mM; ALA + L-car: 100 μ M de ALA + 5 mM de L-car.

Expressão gênica em oócitos bovinos maturados *in vitro*

A suplementação do meio de MIV de oócitos com ALA e/ou L-car não alterou ($P > 0,05$) a expressão das enzimas carnitina palmitoil transferase I (CPT1B) e II (CPT2), as quais participam ativamente da regulação da via da β -oxidação de lipídeos em oócitos bovinos. Além disso, os tratamentos não influenciaram ($P > 0,05$) a expressão de genes e fator de crescimento relacionados à síntese de lipídeos: estearoil-CoA-dessaturase (SCD1), “fatty acid synthase” (FASN) e “sterol-regulatory element binding protein” (SREBP1). Na Figura 5 encontram-se sumarizados os resultados da expressão relativa dos genes avaliados neste estudo em relação à expressão do gene de controle endógeno GAPDH, o qual foi considerado o mais estável para análise da expressão gênica de oócitos.

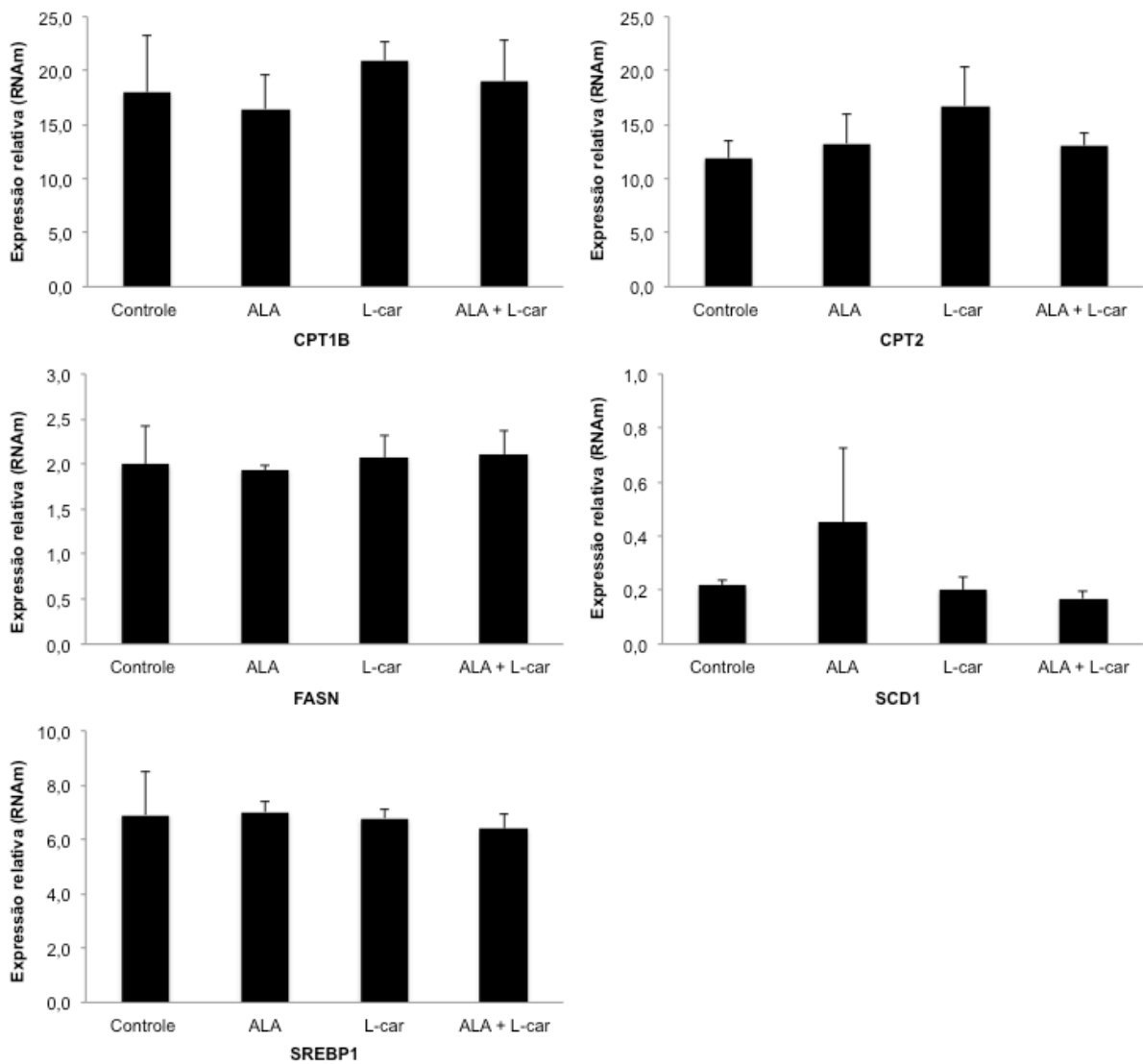


Figura 5. Expressão relativa dos genes carnitina palmitoil transferase I (CPT1B) e II (CPT2), “fatty acid synthase” (FASN), estearoil-CoA-dessaturase (SCD1) e “sterol-regulatory element binding protein” (SREBP1) em oócitos bovinos maturados *in vitro* em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car). Dados apresentados como média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Duncan ($P > 0,05$). ALA: 100 μ M; L-car: 5 mM; ALA + L-car: 100 μ M de ALA + 5 mM de L-car.

Expressão gênica em blastocistos bovinos

A expressão relativa dos mesmos genes avaliados na análise anterior foram realizadas em blastocistos expandidos coletados no dia 7 do cultivo *in vitro*. Esses embriões foram produzidos a partir de oócitos MIV em meio suplementado com ALA e /ou L-carnitina e 10% de SFB, de acordo com os grupos experimentais previamente apresentados. Na Figura 6 encontram-se sumarizados os resultados da

expressão relativa dos genes avaliados neste estudo em relação à expressão do gene de controle endógeno B-actina, o qual foi considerado o mais estável para análise da expressão gênica dos embriões.

Os tratamentos não alteraram ($P > 0,05$) a expressão das enzimas carnitina palmitoil transferase I (CPT1B) e II (CPT2), as quais participam ativamente da regulação da via da β -oxidação de lipídeos em oócitos bovinos. As suplementações com ALA e L-car reduziram ($P < 0,05$) a expressão do gene “fatty acid synthase” (FASN), em relação ao grupo Controle. Entretanto, um efeito sinérgico não foi observado ($P > 0,05$) com a associação de ambos os tratamentos. Todos os tratamentos promoveram redução ($P < 0,05$) na expressão relativa do gene estearoil-CoA-dessaturase (SCD1), em comparação ao grupo Controle. Já em relação ao gene “sterol-regulatory element binding protein” (SREBP1), a suplementação com L-car foi o único tratamento que resultou em redução ($P < 0,05$) na sua expressão relativa.

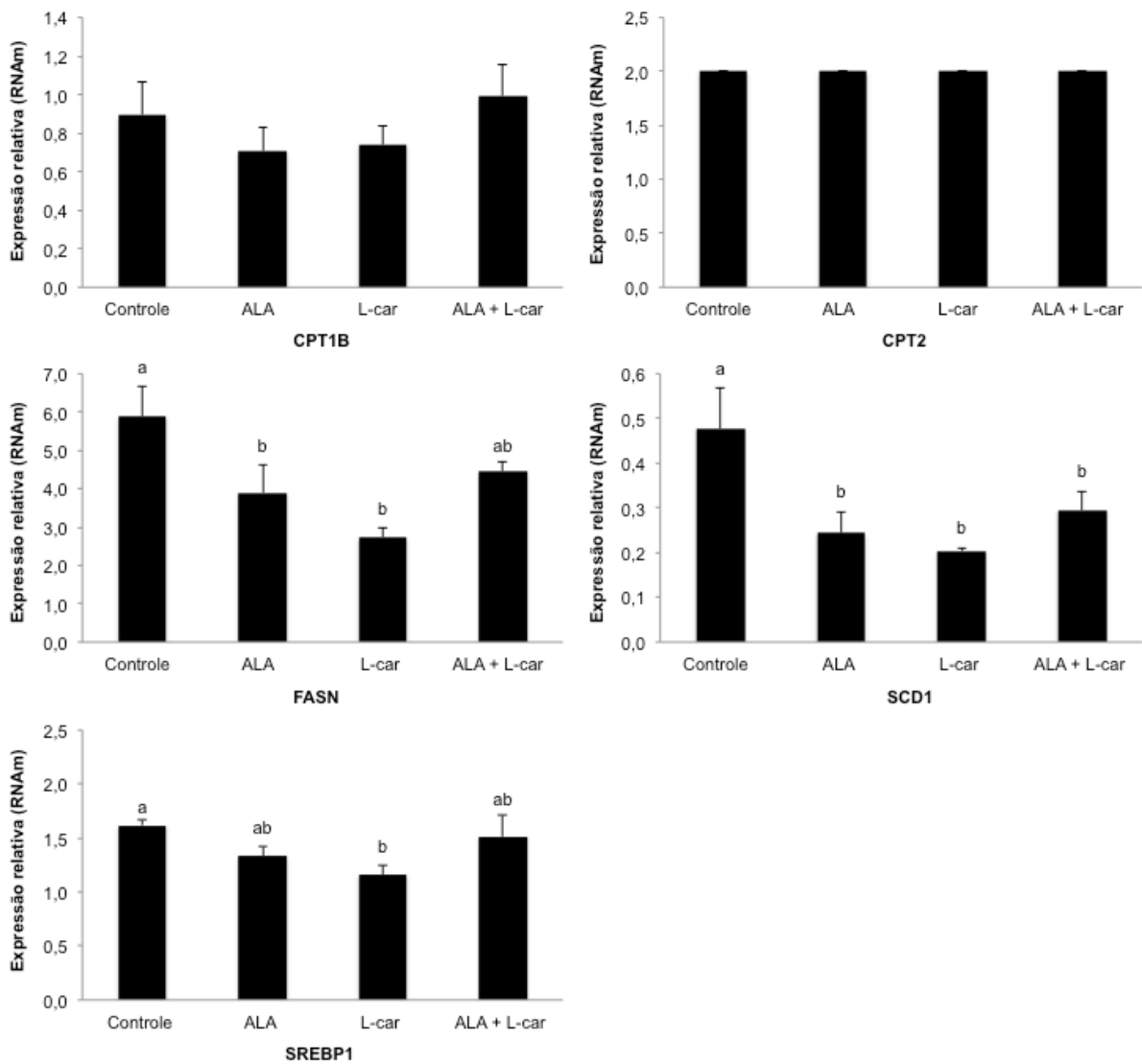


Figura 6. Expressão relativa dos genes carnitina palmitoil transferase I (CPT1B) e II (CPT2), “fatty acid synthase” (FASN), estearoil-CoA-dessaturase (SCD1) e “sterol-regulatory element binding protein” (SREBP1) em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados em meio suplementado com ácido linolênico (ALA), L-carnitina (L-car) ou a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car). Dados apresentados como média \pm EPM. Barras com letras distintas diferem significativamente pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). ALA: 100 μ M; L-car: 5 mM; ALA + L-car: 100 μ M de ALA + 5 mM de L-car.

4. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com ALA e/ou L-car durante o cultivo de MIV sobre o metabolismo celular, potencial de desenvolvimento oocitário e criotolerância embrionária. Baseado nos mecanismos de ação das moléculas, a associação dos tratamentos foi realizada buscando um possível efeito sinérgico sobre o metabolismo lipídico.

As modificações nos sistemas de PIV de embriões bovinos podem ser utilizadas como estratégias para lidar com as baixas taxas de sucesso da criopreservação embrionária, uma vez que podem resultar na produção de embriões de melhor qualidade e mais criotolerantes (SEIDEL, 2006). 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).

O acúmulo de lipídios em oócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser alterados pela adição nos meios de cultivo de moléculas como os PUFA (PEREIRA *et al.*, 2007; LEÃO *et al.*, 2015), particularmente os n-3 (AL DARWICH *et al.*, 2010) e, de reguladores do metabolismo como a L-car (SOMFAI *et al.*, 2011; TAKAHASHI *et al.*, 2013; BALDOCEDA *et al.*, 2015). Todavia, o efeito positivo da suplementação com ALA e L-car na etapa de MIV, observado anteriormente sobre o acúmulo lipídico nos oócitos, não foi continuado nos embriões produzidos, oriundos de sua fertilização. Também, a associação de ambos os tratamentos (ALA + L-car) não resultou em qualquer efeito sobre o conteúdo intracitoplasmático de lipídios.

Diversos estudos demonstraram a relação entre o conteúdo lipídico e a criotolerância embrionária (SEIDEL, 2006; HORVATH *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007; LAPA *et al.*, 2011). Dessa forma, neste estudo pode-se relacionar a ausência de efeitos sobre a criotolerância embrionária com a não alteração do conteúdo lipídico nos embriões, oriundos de oócitos tratados. De fato, os oócitos foram tratados durante a etapa de MIV, fertilizados e os prováveis zigotos cultivados *in vitro* por 7 dias. O meio de CIV utilizado inclui a suplementação com SFB, o qual é

rico em lipídios (KIM *et al.* 2001). Portanto, pode-se pensar que a presença do SFB no ambiente de CIV possa ser um fator que tenha afetado a qualidade embrionária e possa ter mascarado os efeitos positivos dos tratamentos utilizados durante a maturação, sobre a criotolerância e acúmulo lipídico nos blastocistos avaliados.

Com respeito à qualidade embrionária, avaliada a partir do índice apoptótico nos blastocistos produzidos, os tratamentos reduziram a proporção de blastômeros apoptóticos, em relação ao total de células do embrião (o qual permaneceu inalterado). Além disso, a redução da apoptose celular foi acompanhada por uma redução do acúmulo intracelular de ROS, em todos os tratamentos. Esses achados podem ser em decorrência de algum efeito antioxidante desses suplementos nos oócitos e/ou nos embriões produzidos.

A redução no acúmulo de ROS após a suplementação do meio de MIV com ALA, previamente demonstrada em oócitos bovinos (MAREI *et al.*, 2012), foi relacionada ao efeito de supressão da apoptose celular observada por Veshkini *et al.* (2015). Os oócitos ovinos tratados com ALA demonstraram uma redução na expressão do gene Bax e um aumento do gene Bcl-2, os quais são genes pró e anti-apoptóticos, respectivamente (VESHKINI *et al.*, 2015). A L-car já demonstrou possuir um efeito antioxidante, por reduzir a produção de ROS durante a MIV de oócitos suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011). Entretanto, o mesmo efeito ainda não foi avaliado em oócitos bovinos. Pode-se concluir que houve um efeito sinérgico positivo da associação de ALA + L-car na MIV sobre o índice apoptótico e nível de ROS nos embriões produzidos.

O acúmulo de ROS pode resultar em danos ao DNA, em decorrência da ruptura das membranas mitocondriais com a consequente liberação de citocromo c e da ativação da cascata de caspases, culminando em apoptose e falha do desenvolvimento embrionário (TRVDÁ *et al.*, 2011). Assim, o estresse oxidativo pode reduzir a viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* (KITAGAWA *et al.*, 2004). Apesar dos efeitos anti-oxidantes dos suplementos utilizados neste estudo, nenhum efeito foi observado sobre o potencial de desenvolvimento embrionário dos oócitos tratados. Entretanto, a suplementação do meio de MIV com 100 µM de ALA resultou em melhora da competência de oócitos ovinos, devido ao aumento da taxa de blastocistos (VESHKINI *et al.*, 2015) e, a suplementação com L-car também

demonstrou um efeito benéfico sobre a maturação oocitária e no aumento do potencial de desenvolvimento embrionário em ratos (ABDELRAZIK *et al.*, 2009; DUNNING *et al.*, 2010), suínos (SOMFAI *et al.*, 2011; WU *et al.*, 2011) e bovinos (PHONGNIMITR *et al.*, 2013). Todavia a associação ALA + L-car não havia sido testada.

Ainda, neste estudo foi avaliada a expressão de genes envolvidos com o metabolismo lipídico (regulação da lipogênese: SCD1, FASN e SREBP1; regulação da via metabólica de β -oxidação: CPT1B e CPT2), em oócitos tratados e nos embriões produzidos. Nos oócitos tratados, não houve alteração na expressão de nenhum dos genes avaliados. Entretanto, nos embriões produzidos, oriundos dos oócitos tratados foram detectados alguns efeitos. As enzimas CPT1B e CPT2, não foram alteradas pelos tratamentos nos blastocistos bovinos. Todavia, as suplementações com ALA e L-car reduziram a expressão do gene FASN. Todos os tratamentos promoveram uma redução na expressão relativa do gene SCD1 e apenas a suplementação com L-car reduziu a expressão relativa do gene SREBP1.

As moléculas de ácidos graxos presentes no citoplasma celular sofrem uma reação enzimática, mediada pela acil-CoA sintetase, e geram as acil-CoA. Nessa forma são transportadas para dentro das mitocôndrias pela enzima CPT1B, processo esse facilitado pela ligação da molécula de acil-CoA com a L-car (NELSON e COX, 2002). Uma vez no interior das mitocôndrias, a enzima CPT2 desliga a L-car da molécula de acil-CoA, a qual entra para a via da β -oxidação e é convertida em acetil-CoA para ser metabolizada no ciclo do ácido carboxílico e fosforilação oxidativa, gerando de ATP. Portanto, a enzima CPT1B limita a taxa de β -oxidação e requer a L-car como co-fator (SUTTON-MCDOWALL *et al.*, 2012), já que sua ligação com a molécula de acil-CoA torna-se necessária para o transporte do complexo acil-carnitina-CoA até o interior da mitocôndria.

Em desacordo com os resultados deste estudo Dunning *et al.* (2010) demonstraram que a suplementação com L-car durante a MIV de oócitos de camundongos aumentou a expressão do gene CPT1B nos COC durante a maturação. Já a suplementação com ALA não alterou a expressão da enzima CPT2 em embriões bovinos (AL DARWICH *et al.*, 2010). Entretanto, em um estudo recente a suplementação com L-car resultou em aumento da expressão das enzimas CPT1B

e CPT2 em embriões bovinos, porém o tratamento foi realizado durante a etapa de CIV (GHANEM *et al.*, 2014).

Neste caso, não se pode hipotetizar que houve a perda de efeitos sobre a expressão de ambos genes lipolíticos nos embriões em decorrência do tratamento na etapa de MIV, pois a expressão não foi alterada nos próprios oócitos tratados. Os resultados da expressão de ambas as enzimas, somados à não alteração do conteúdo lipídico dos embriões observada neste estudo, sugere que o acúmulo de ácidos graxos e sua oxidação a nível mitocondrial não foram alterados nos embriões bovinos em decorrência dos tratamentos com ALA e/ou L-car, nas concentrações utilizadas.

Neste estudo, a suplementação com ALA e L-car na MIV demonstrou reduzir a transcrição das enzimas SCD1 e FASN nos blastocistos produzidos, as quais são envolvidas na síntese de ácidos graxos (SAMPATH e NTAMBI, 2005; AL DARWICH *et al.*, 2010). Os PUFA n-3 possuem um papel no controle da lipogênese, e especificamente a suplementação com ALA reprimiu a expressão da enzima SCD1 em embriões bovinos (AL DARWICH *et al.*, 2010). Todavia, a expressão da enzima FASN não foi alterada pela suplementação com L-car durante o cultivo embrionário (GHANEM *et al.*, 2014), como aqui demonstrado. Vale ressaltar que a associação dos tratamentos ALA + L-car apresentou um efeito sinérgico positivo apenas sobre a expressão do gene SCD1. A expressão dos demais genes permaneceu inalterada em relação ao grupo Controle.

O SREBP1 é um fator de transcrição considerado chave na regulação da síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis (SAMPATH e NTAMBI, 2005). Em embriões bovinos, a transcrição do gene SREBP1 foi detectada em blastocistos entre o dia 7 e 8 do desenvolvimento, e demonstrou sofrer “down-regulation” devido ao tratamento com PUFA (XU *et al.*, 1999). Porém, neste estudo a suplementação com ALA não alterou a expressão desse fator, e sim a suplementação com L-car na etapa de MIV. Em contraste, Ghanem *et al.* (2014) demonstraram que a suplementação com L-car não alterou em nada a expressão do gene SREBP1 nos embriões tratados na etapa de CIV. Baseado no exposto pode-se supor que os efeitos da L-car sobre a expressão deste fator de transcrição no embrião sejam mediados pelo tratamento nos oócitos e que haja a necessidade de tratamento com

ALA na etapa de CIV para determinar a redução da expressão do SREBP1 em embriões bovinos.

5. CONCLUSÃO

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 conseqüentemente 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 conseqüentemente a criotolerância embrionária.

REFERÊNCIAS

- 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 α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v.93, p.30-36, 2010.
- BALDOCEDA, L.; GAGNÉ, D.; FERREIRA, C.R.; ROBERT, C. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by L-carnitine. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.
- 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.
- 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.
- GHANEM, N.; HA, A.N.; FAKRUZZAMAN, MD.; BANG, J.I.; LEEC, S.C.; KONG, I.K. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. **Theriogenology**, v.82, p.238–250, 2014.
- HORVATH, G.; SEIDEL Jr., G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. **Theriogenology**, v.66, p.1026-1033, 2006.
- KENT, W.J.; SUGNET, C.W.; FUREY, T.S.; ROSKIN, K.M.; PRINGLE, T.H.; ZAHLER, A.M.; HAUSSL, R.D. The human genome browser at UCSC. **Genome Res.**, v.12, p.996-1006, 2002. Disponível em: <<http://genome.ucsc.edu/>>.
- 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.
- KITAGAWA, Y.; SUZUKIB, K.; YONEDAA, A.; WATANABEA, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation on porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, p.1186–1283, 2004.

KORHONEN, K.; KANANEN, K.; KETOJA, E.; MATOMÄKI, J.; HALMEKYTÖ, M.; PEIPPO, J. Effects of serum-free in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo development and cell allocation in two developmental stages of day 7 blastocysts. **Reprod. Domest. Anim.**, v.45, p.42-49, 2010.

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.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULADI-NASHTA, A.A. Differential effects of linoleic and alpha-linolenic fatty acids on spatial and temporal mitochondrial distribution and activity in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.679–690, 2012.

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.

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

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shok induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1169-1177, 2002.

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.

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.

RÄTY, M.; KETOJA, E.; PITKÄNEN, T.; AHOLA, V.; KANANEN, K.; PEIPPO, J. In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. **Cryobiology**, v.63, p.245-255.

ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; NOGUEIRA, É.; ACCORSI, M.F.; MINGOTI, G.Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.26, p.797-805, 2014.

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

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.

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.

TVRDÁ, E.; KNAZICKÁ, Z.; BÁRDOS, L.; MASSÁNYI, P.; LUKÁČ, N. Impact of oxidative stress on male fertility – a review. **Acta Vet. Hung.**, v.59, p.465-484, 2011.

VESHKINI, A.; ASADI, H.; KHADEM, A.A.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; KHAZABI, S.; AMINAFSHAR, M.; DELDAR, H.; SOLEIMANI, M.; CINAR, M.U. Effect of Linolenic acid during in vitro maturation of ovine oocytes: embryonic developmental potential and mRNA abundances of genes involved in apoptosis. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.32, p.653–659, 2015.

WRIGHT, J.M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 4a Edição, p. 165-168, 2009.

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.

XIE, F.; XIAO, P.; CHEN, D.; XU, L.; ZHANG, B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v.80, p.75-84, 2012.

XU, J.; NAKAMURA, M.T.; CHO, H.P.; CLARKE, S.D. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.23577-83, 1999.

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 conseqüentemente a criotolerância embrionária.