

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

LUCIANA SIMÕES RAFAGNIN MARINHO

**ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO NA CRIOTOLERÂNCIA DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

LAGES - SC

2010

LUCIANA SIMÕES RAFAGNIN MARINHO

**ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO NA CRIOTOLERÂNCIA DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Alceu Mezzalira

LAGES - SC

2010


LUCIANA SIMÕES RAFAGNIN MARINHO

**Ácido linoleico conjugado na criotolerância de embriões bovinos
produzidos *in vitro***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV – UDESC), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

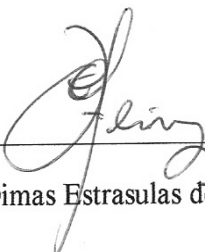
Banca Examinadora:

Orientador:

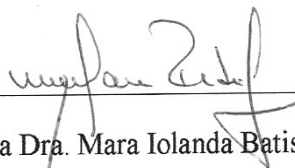


Professor Dr. Alceu Mezzalana
CAV/UDESC


Membros:



Professor Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira
UDESC



Professora Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
UFSM



Professor Dr. Valério Valdetar Marques Portela Junior
UFSC

AGRADECIMENTOS:

Ao meu maravilhoso Deus, por estar sempre ao meu lado, me renovando e animando a continuar, mesmo em meio a tantas dificuldades encontradas na execução deste experimento. Sei que houve momentos em que as coisas fugiram do meu controle, mas nunca do Dele. A Ele todo o meu amor e a minha eterna gratidão.

Ao grande amor da minha vida e melhor amigo, meu marido Matheus, por tão grande cumplicidade e compreensão. Por todos os momentos que me fortaleceu, me trouxe paz e mostrou estar ao meu lado, entendendo o quanto o mestrado era importante pra mim, mesmo que tivéssemos que morar a 680 km de distância por um bom tempo.

À minha maravilhosa mãe e amiga Gilmara, por todo o apoio, todo o amor e por tudo o que investiu em mim. Por tantas orações e por ser o meu grande exemplo de perseverança e eficiência em tudo o que faz.

Ao meu orientador, amigo e muitas vezes conselheiro Alceu Mezzalira, que muito me impressionou por seu caráter admirável e por sua profunda consideração pelos seus orientados. À Joana, minha co-orientadora e amiga, por todo o seu empenho em me ajudar nesse projeto. Pelas manhãs, tardes e noites que trabalhou em meu favor, pelas risadas, pelas broncas, pelos muitos embriões.

À minha irmã Dani, aos meus tios Gio, Sandra e Tata e meus primos Andréia, Digo, Fê, Pati e Gu, pela incessante torcida por mim e pelos divertidíssimos momentos proporcionados nos feriados em Foz.

Aos meus queridos sogros Jairo e Neuza, por tantas vezes me acolherem e por tanto me ajudarem no decorrer do mestrado. Aos meus cunhados e cunhadas pelo incentivo e pelo carinho.

Ao meu sempre companheirinho Joey, por tantos dias que passou sozinho em casa enquanto eu trabalhava nesse projeto. Por me receber sempre alegre e de bom humor, mesmo quando eu saía cedo e só chegava à noite.

Aos colegas de laboratório e também amigos Zago, Urso, Monica, Luís Fernando, Léo, Renato, Lain, LH, James, Nerissa, Jéssica, Mauricio, Pedro, Gustavo, Alysson, Camila, Jú, Murilo, Quaiada, Matheus e Fabi, por me ensinarem praticamente tudo o que sei hoje, e por se juntarem a mim nos “brados de júbilo” em cada rotina que andava bem. Também aos mestres, amigos e encorajadores Marcelo, Dimas, Valério, Lúcio e Bira.

Ao mestre e grande amigo Marcelo Seneda, por despertar em mim o interesse pela pesquisa e por ter me ajudado em todas as etapas da minha vida profissional até aqui.

Ao Marcos Barreta, pela realização das análises referentes à expressão de RNAm das enzimas. Aos professores Paulo Bayard e João Francisco Coelho de Oliveira pela disponibilização do laboratório.

Aos amigos das igrejas de Londrina e de Lages, por tantas orações e por tornarem tudo mais fácil pra mim.

Aos frigoríficos Verdi, El’Golli, Fox e Pamplona, pela disposição em fornecer os ovários.

À UDESC, PROCAD, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária

Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14^a Região

(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Marinho, Luciana Simões Rafagnin

Ácido linoleico conjugado na criotolerância em embriões bovinos produzidos *in vitro*. / Luciana Simões Rafagnin Marinho – Lages, 2010.

61 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências

Agroveterinárias / UDESC.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Taxas de clivagem e blastocisto de embriões cultivados com diferentes concentrações (0 – controle, 50, 100 e 200µM) de <i>t10</i> , <i>c12</i> CLA.....	28
Tabela 2: Taxas de clivagem e blastocisto de embriões cultivados com 100µM dos isômeros <i>t10</i> , <i>c12</i> CLA e <i>c9</i> , <i>t11</i> CLA, ou com uma mistura de ambos (50 µM + 50 µM).....	28
Tabela 3: Taxas de re-expansão e eclosão de embriões cultivados com os isômeros <i>t10</i> , <i>c12</i> CLA, <i>c9</i> , <i>t11</i> CLA, ou com uma mistura de ambos, vitrificados no estágio de Bx.....	29
Tabela 4: Taxas de re-expansão e eclosão de embriões cultivados com os isômeros <i>t10</i> , <i>c12</i> CLA, <i>c9</i> , <i>t11</i> CLA, ou com uma mistura de ambos, vitrificados no estágio de Bl.....	29
Tabela 5: Taxas de re-expansão e eclosão de embriões cultivados com <i>t10</i> , <i>c12</i> CLA e sem a adição de CLA, vitrificados ou submetidos ao congelamento convencional, no estágio de Bx.....	30
Tabela 6: Taxas de re-expansão e eclosão de embriões cultivados na presença de <i>t10</i> , <i>c12</i> CLA e sem a adição de CLA, vitrificados ou submetidos ao congelamento convencional, no estágio de Bl.....	31
Figura 1 - Quantidade de RNAm referente às enzimas ACC, SCD e FAS em embriões bovinos PIV, tratados ou não com <i>trans-10</i> , <i>cis-12</i> CLA	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACC – Acetil-CoA carboxilase
- AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados
- AGPAT – Acilglicerol fosfato aciltransferase
- AGS – Ácidos graxos saturados
- Be – Blastocisto eclodido
- Bi – Blastocisto inicial
- Bl – Blastocisto
- Bx – Blastocisto expandido
- CCOs – Complexo *cumulus* oócitos
- CLA – Ácido linoleico conjugado
- CPT – Carnitina palmitoil transferase
- EG – Etileno glicol
- FAS – Ácido graxo sintase
- FSH – Hormônio folículo estimulante
- GPAT – Glicerol fosfato acil transferase
- IETS – *International Embryo Technology Society*
- LH – Hormônio luteinizante
- LPL – Lipase lipoprotéica
- PBS – *Phosphate buffered saline*
- PIV – Produção/produzido *in vitro*
- PR – Propanediol
- RNA_m – RNA mensageiro
- SCD – Estearoil-CoA dessaturase
- SEE – Soro de égua em estro

SFB – Soro fetal bovino

SOFaaci – *Synthetic oviduct fluid with acid amine and sodium citrate*

TAG – Triacilglicerol

TALP - Tyrode/albumin/sodium lactate/ sodium pyruvate

TCM – *Tissue culture medium*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Funções dos lipídeos.....	4
2.2 Os efeitos do soro no acúmulo lipídico	4
2.3 O acúmulo lipídico e a criotolerância	7
2.4 Delipidação mecânica	10
2.5 Ácido linoleico conjugado	11
2.6 Efeito do CLA no metabolismo lipídico	12
2.7 Ação do CLA nas enzimas envolvidas no metabolismo lipídico	14
2.8 Efeito do CLA na lipólise e oxidação de ácidos graxos	16
2.9 Efeito do CLA na criotolerância embrionária	17
3. ARTIGO Ácido Linoleico Conjugado não altera a Criotolerância de Embriões Bovinos Produzidos <i>In Vitro</i>	18
3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.2.1 Delineamento experimental.....	22
3.2.2 Obtenção dos oócitos.....	23
3.2.3 Maturação <i>in vitro</i>	23
3.2.4 Seleção espermática e fecundação <i>in vitro</i>	24
3.2.5 Cultivo <i>in vitro</i>	24
3.2.6 Avaliações dos embriões.....	24

3.2.7 Vitriificação dos embriões.....	25
3.2.8 Congelamento dos embriões.....	25
3.2.9 Extração de RNA e Real-Time PCR	26
3.2.10 Análise estatística dos dados.....	27
3.3 RESULTADOS.....	28
3.3.1 Experimento 1.....	28
3.3.2 Experimento 2.....	28
3.3.3 Experimento 3.....	30
3.3.4 Estimativa do número de células dos blastocistos.....	31
3.3.5 Expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN.....	32
3.4 DISCUSSÃO.....	33
3.5 CONCLUSÕES.....	37
3.6 REFERÊNCIAS.....	38
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	44

RESUMO

A criopreservação de embriões é uma importante ferramenta que permite o armazenamento de material genético por período prolongado, sem causar perda de atividade funcional ou alterações genéticas nessas estruturas. A criopreservação de embriões gerados *in vivo* está bem estabelecida e proporciona resultados muito próximos aos obtidos após a transferência de embriões frescos. Já os embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV) são extremamente sensíveis aos métodos convencionais de criopreservação, apresentando reduzidas taxas de sobrevivência após o reaquecimento. Essa sensibilidade parece estar relacionada ao acúmulo excessivo de lipídeos no citoplasma dos embriões durante o desenvolvimento *in vitro*, principalmente quando o cultivo é realizado em meios adicionados de soro. Estudos realizados com embriões em estágios iniciais de desenvolvimento evidenciaram que a remoção física das gotas lipídicas é capaz de aumentar a tolerância destes embriões à criopreservação. Contudo, o método de delipidação é demasiadamente trabalhoso e demorado, além de alterar o potencial de desenvolvimento dos embriões após a transferência para as receptoras. Dessa forma, os estudos têm buscado métodos não invasivos e menos trabalhosos, que reduzam a quantidade de lipídeos no citoplasma dos embriões bovinos PIV, melhorando assim a sua criotolerância. O *trans-10, cis-12* CLA, um isômero conjugado do ácido linoleico, é capaz de inibir a síntese de ácidos graxos, diminuindo o teor lipídico em diversos tecidos de animais e humanos. Sabe-se que um dos mecanismos pelos quais este isômero exerce esse efeito é através da diminuição da expressão de RNAm de enzimas responsáveis pela síntese de lipídeos. Estudos mostraram que a adição do *t10, c12* CLA ao meio de cultivo pode reduzir o acúmulo lipídico de embriões bovinos PIV, aumentando a sua criotolerância. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito dos dois principais isômeros do CLA na criotolerância de embriões bovinos PIV e adicionalmente a expressão de RNAm das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACCa), estearoil-CoA dessaturase (SCD1) e ácido graxo sintase (FASN) desses embriões. No Experimento 1, embriões foram cultivados em meio com concentrações crescentes do isômero *t10, c12* CLA: grupo controle (0 μ M), grupo 50CLA (50 μ M), grupo 100CLA (100 μ M) e grupo 200CLA (200 μ M), buscando a maior concentração que não afete o posterior desenvolvimento embrionário. No Experimento 2, os zigotos foram cultivados em meio com 100 μ M, (concentração apontada no Experimento 1) de diferentes isômeros de CLA, sendo: grupo controle, sem adição de CLA, grupo *t10, c12* CLA, grupo *c9, t11* CLA e grupo Mistura, com 50% de cada isômero. No Experimento 3, os zigotos foram distribuídos em 2 grupos: grupo CLA, contendo 100 μ M do isômero *t10, c12* CLA (determinado no Experimento 2) e grupo controle, sem CLA. Os blastocistos obtidos foram separados em função do estágio (Bx ou B1) e submetidos ao processo de vitrificação ou congelamento. Como critérios de viabilidade foram avaliados as taxas de clivagem e de blastocistos após o cultivo, e de re-expansão e eclosão após o reaquecimento. Ainda, foi determinada a densidade celular e a expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN destes embriões. A maior concentração de *t10, c12* CLA que não reduziu a taxa de blastocistos foi a de 100 μ M. No Experimento 2, a maior taxa de eclosão após o reaquecimento foi a do grupo *c9, t11* vitrificado no estágio de Bx

(68,6%), que não diferiu dos demais tratamentos vitrificados neste estágio. A menor taxa de eclosão foi a do grupo Mistura (*c9, t11 + t10, c12*, no estágio de B1 (8,0%), que não diferiu dos grupos *t10, c12* e *c9, t11*, vitrificados no mesmo estágio. Em todos os tratamentos, embriões em estágio de Bx apresentaram taxas superiores aos B1, com exceção do grupo Controle, cujas taxas foram similares. No Experimento 3, a maior taxa de eclosão foi observada no grupo Controle com Bx vitrificados (67,4%), que não diferiu do grupo CLA, com Bx vitrificados. A menor taxa de eclosão foi a do grupo CLA com B1 congelados (10,3%), que não diferiu dos demais tratamentos criopreservados neste estágio. Nos grupos submetidos ao congelamento, as taxas de desenvolvimento foram semelhantes, independente da exposição ao CLA. Não houve diferença na densidade celular entre os embriões expostos ou não ao *t10, c12* CLA, e nem na expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN. Conclui-se que nas condições deste estudo a adição dos isômeros do CLA *t10, c12* e *c9, t11* ao meio de cultivo não melhora a criotolerância de embriões bovinos PIV, bem como que o isômero *t10, c12* CLA, não interfere na densidade celular e na expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN destes embriões.

Palavras-chave: Vitrificação. Congelamento. CLA. Expressão de RNAm.

ABSTRACT

Embryo cryopreservation is an important tool that allows the storage of genetic material for long time, without loss of functional activity or genetic damage. Cryopreservation of *in vivo*-produced embryos is well established and provides similar results than those obtained after fresh embryos transfer. However, *in vitro*-produced (IVP) bovine embryos are easily damaged by conventional methods of cryopreservation, resulting in low survival rates after re-warming. Such sensitivity seems to be related to an excessive amount of lipid in the embryos cytoplasm during *in vitro* development. This might occur due to serum containing medium cultured embryos. Mechanical removal of lipid droplets can improve survival of early developmental stages embryos after cryopreservation. Nevertheless, delipidation method are laborious and time-consuming, besides altering embryo development after transfer to the recipients. Therefore, studies have searched for non invasive and less laborious techniques to reduce the amount of cytoplasmic lipids of bovine IVP embryos, thus improving their cryotolerance. *Trans-10, cis-12* CLA, a conjugated isomer of linoleic can inhibit the fatty acid synthesis, thus decreasing the amount of lipid in several human and animal cells. It is known that lipid synthesis reduction involve down-regulation of mRNA expression of lipogenic enzymes associated with fat synthesis. Studies showed that addition of *t10, c12* CLA to culture media, can reduce lipid content of bovine IVP embryos, improving their cryotolerance. Therefore, this study evaluated two CLA isomers on cryotolerance of IVP bovine embryos, as well as the enzymes acetyl-CoA carboxylase (ACCa), stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and fatty acid synthase (FASN) mRNA expression of these embryos. In Experiment 1, embryos were cultured in media with increasing concentrations of *trans-10, cis-12* CLA isomer: control group (0 μ M), 50CLA group (50 μ M), 100CLA group (100 μ M) and 200CLA group (200 μ M), looking for the higher concentration that does not negatively affect embryo development. In Experiment 2, zygotes were cultured in medium containing 100 μ M (determined in Experiment 1) of different CLA isomers: control (CLA free) group, *t10, c12* CLA group, *c9, t11* CLA group and Mixture (50% *c9, t11* CLA + 50% *t10, c12*) group. In Experiment 3, zygotes were allocated in 2 groups: CLA group, containing 100 μ M of *t10, c12* CLA isomer (determined in Experiment 2) and control (CLA free) group. Blastocysts were separated according to their stage (Bx or Bl) and subjected to vitrification or freezing. As viability criteria, cleavage and blastocyst rates were assessed after IVC and re-expanding and hatching rates were assessed after re-warming. Cell counting and mRNA expression of the ACCa, SCD1 and FASN enzymes were also assessed. The highest concentration of *t10, c12* CLA that did not impair blastocyst rates was 100 μ M. In Experiment 2, the highest hatching rate after re-warming was obtained in *c9, t11* group, vitrified at Bx stage (68.6%), not differing from the other treatments vitrified at this stage. The lowest hatching rate was obtained in Mixture group, vitrified at Bl stage (8.0%), not differing from the groups *t10, c12* and *c9, t11*, vitrified at the same stage. In all treatments, Bx stage embryos showed higher viability than Bl stage embryos, except for the Control group, in whose the viability was similar. In Experiment 3, the highest hatching rate was obtained in Bx stage Control vitrified group (67.4%), which was similar to the Bx stage vitrified CLA group. The

lowest hatching rate was observed in B1 stage frozen CLA group (10.3%), not differing from the other cryopreserved treatments at the same stage. In all frozen groups, despite CLA addition, hatching rates were all similar. There was also no difference in cell counting or mRNA expression of the enzymes ACCa, SCD1 and FASN, among embryos. Under the conditions of this study, the addition of CLA isomers *t10*, *c12* and *c9*, *t11* to culture media does not improve cryotolerance of IVP bovine embryos, and the isomer *t10*, *c12* CLA does not influence the cell number and mRNA expression of enzymes ACCa, SCD1 and FASN.

Key-words: Vitrification. Freezing. CLA. mRNA expression.

1- INTRODUÇÃO

Já está bem estabelecido que embriões produzidos *in vitro* (PIV) são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo* (LEIBO e LOSKUTOFF, 1993; POLLARD e LEIBO, 1994). Embriões PIV são diferentes em muitos aspectos importantes, incluindo menor densidade (POLLARD e LEIBO, 1993), compactação incompleta (VAN SOOM et al., 1997), menor densidade de junções celulares (BONI et al., 1999), citoplasma mais escuro (NAGASHIMA et al., 1994; DIEZ et al., 2001), zona pelúcida mais frágil (DUBY et al., 1997), densidade reduzida de mitocôndrias maduras (CROSIER et al., 2000) e maior quantidade de lipídeos (CROSIER et al., 2000; FAIR et al., 2001). Apesar de todos estes fatores, existem evidências de que a grande susceptibilidade dos embriões PIV a danos causados no processo de criopreservação se deve principalmente à grande quantidade de grânulos lipídicos no citoplasma (USHIJIMA et al., 1999; McEVOY et al., 2000; ABE et al., 2002). Sabe-se que embriões bovinos contêm grande número de gotas lipídicas no período das primeiras clivagens (MOHR e TROUNSON, 1981), que declinam no estágio de blastocisto, coincidindo com a diminuição da sensibilidade à criopreservação (TROUNSON et al., 1976).

Gotas lipídicas no citoplasma podem exercer um efeito direto na sobrevivência dos embriões durante o congelamento, já que elas podem sofrer mudanças irreversíveis no momento da criopreservação e comprometer a capacidade de desenvolvimento embrionário. Análises lipídicas em oócitos e embriões revelaram a presença de ampla variedade de ácidos graxos, com diferentes comprimentos de cadeia e graus de insaturação. Conseqüentemente, as fases de transição podem ocorrer a diferentes temperaturas e várias fases podem coexistir, resultando em danos severos às células (WOLFE e BRYANT, 1999). Quando os embriões são expostos a baixas temperaturas, as gotas lipídicas sofrem mudanças estruturais e tendem a

coalescer, formando gotas maiores (EDIDIN e PETIT, 1977; MOHR e TROUNSON, 1981). Como as gotas lipídicas são ao menos parcialmente cercadas pelo retículo endoplasmático (EDIDIN e PETIT, 1977), a resultante perda de organização citoplasmática pode resultar em danos irreversíveis ao embrião (MOHR e TROUNSON, 1981). Da mesma forma, a interação entre a porção lipídica das células e os elementos do citoesqueleto é complexa, de modo que a solidificação destes lipídeos pode causar a deformação e até a ruptura do citoesqueleto (ISACHENKO et al., 1998), afetando a mobilidade e o transporte de nutrientes no embrião.

Ainda que todos os embriões PIV acumulem excessivamente lipídeos no citoplasma, sabe-se que a adição de soro ao meio de cultivo aumenta a ocorrência de gotas lipídicas (ABE et al., 1999; SATA et al., 1999; ABE et al., 2002; REIS et al., 2003), o que contribui para a maior sensibilidade à criopreservação (YAMASHITA et al., 1999; MUCCI et al., 2006; GÓMEZ et al., 2008). Apesar dos efeitos negativos na criotolerância embrionária e da sua natureza indefinida e variável, o soro é comumente adicionado aos meios de cultivo embrionários, já que ele aumenta o índice de zigotos que se desenvolvem até o estágio de blastocisto (FERGUSON e LEESE, 1999; ECKERT e NIEMANN, 1995; GUTIERREZ-ADAN et al., 2001; CHO et al., 2002).

A remoção mecânica do excesso de lipídeos intracelulares de embriões bovinos (USHIJIMA et al., 1999; DIEZ et al., 2001) e suínos (NAGASHIMA et al., 1994, 1995, 1996) em estágios iniciais de desenvolvimento pode aumentar sua resistência à criopreservação, sugerindo que as gotas lipídicas presentes no citoplasma não são essenciais para o desenvolvimento tanto de embriões bovinos quanto suínos em estágios iniciais de desenvolvimento. Entretanto, essa técnica é demasiadamente demorada e trabalhosa para que possa ser executada na rotina laboratorial.

Sabe-se que o *trans-10, cis-12* octadecadienoico (*t10, c12* CLA), isômero conjugado do ácido linoleico, é capaz de reduzir a quantidade de lipídeos em diferentes tipos celulares de animais e humanos, atuando principalmente na redução da captação e da síntese de ácidos graxos (LOOR e HERBEIN, 1998; BAUMGARD et al., 2000; BROWN et al., 2001a; PARIZA et al., 2001). Os mecanismos moleculares para a redução da síntese lipídica envolvem uma diminuição coordenada na expressão de RNAm de importantes enzimas lipogênicas associadas a rotas de síntese de gordura (LEE et al., 1998; BAUMGARD et al., 2002; GERVAIS et al., 2009). Em busca de um método não invasivo para a remoção de lipídeos dos embriões PIV, Pereira et al. (2007, 2008) adicionaram *t10, c12* CLA ao meio de cultivo e observaram uma redução no conteúdo lipídico e um aumento na criotolerância de embriões bovinos. De forma contraditória, Darwich et al. (2010) não observaram aumento na sobrevivência embrionária após a criopreservação, demonstrando a necessidade de mais estudos para avaliar o efeito do *t10, c12* CLA na criotolerância de embriões PIV. Os isômeros do CLA, principalmente o *trans-10, cis-12* CLA, quando adicionados ao meio de cultivo em doses adequadas, podem diminuir a produção de lipídeos pelas células embrionárias, diminuindo assim a sensibilidade desses embriões à criopreservação. Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito da suplementação com concentrações crescentes de ácido linoleico conjugado no desenvolvimento e sobrevivência embrionária após congelamento ou vitrificação. Adicionalmente, avaliar o efeito do CLA na expressão de RNAm das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACCa) e estearoil-CoA dessaturase (SCD1), e do complexo enzimático ácido graxo sintase (FASN).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNÇÕES DOS LIPÍDEOS

As funções dos lipídeos no metabolismo embrionário ainda não estão bem estabelecidas. Sabe-se que além de servir como fonte de nutrientes para a célula, exerce importante papel na regulação das propriedades físicas e funcionais das membranas biológicas, auxiliando nas interações intercelulares, proliferação e transporte celular (STUBBS e SMITH, 1984). A composição lipídica, principalmente de fosfolipídios e colesterol, exerce efeito na fluidez da bicamada lipídica (LEE, 1975).

Dos lipídeos presentes, os triacilgliceróis (TAG) são os mais abundantes em embriões suínos e oócitos bovinos e suínos (YOUNGS et al., 1994; McEVOY et al., 2000), e sua principal função é servir como reserva de energia metabólica. Como embriões em estágio de pré-implantação utilizam como fonte de energia outros compostos como lactato, piruvato e glicose, é possível que os TAG sejam sintetizados e armazenados para um posterior período de desenvolvimento embrionário, quando eles podem não ser capazes de utilizar substratos exógenos (TSUJII et al., 2001). No entanto, como observado por Bavister (1995) e Abe et al. (1999), as informações sobre ácidos graxos como substratos para embriões são bastante escassas na literatura, já que a maior parte dos estudos sobre lipídeos em oócitos ou embriões de animais de produção diz respeito ao acúmulo durante o cultivo ou destacam os danos por eles causados durante a criopreservação, ao invés de sua composição ou contribuição para a estrutura ou metabolismo celular (McEVOY et al., 2000).

2.2 OS EFEITOS DO SORO NO ACÚMULO LIPÍDICO

Apesar de sua composição indefinida e variável, o soro é comumente utilizado como constituinte de meios de cultivo para a produção *in vitro* (PIV) de embriões. Mesmo com a afirmação de que o acúmulo lipídico ocorre independentemente da presença do soro

(CROSIER et al., 2000), grande quantidade de trabalhos mostram que os embriões cultivados com soro acumulam excessivamente lipídeos no citoplasma (ABE et al., 1999; SATA et al., 1999; ABE et al., 2002; REIS et al., 2003).

Em experimento com meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino (SFB), Abe et al. (1999) demonstraram que as características morfológicas dos embriões bovinos suplementados com soro e dos que se desenvolvem em meio livre de soro são similares até o estágio de 8 células, ambos com grande número de gotas lipídicas no citoplasma. Já nos estágios de mórula e blastocisto, os embriões expostos ao soro mantêm esse excesso de lipídeos, principalmente nas células do trofoblasto, enquanto nos embriões cultivados na ausência de soro a quantidade de gotas lipídicas é bastante reduzida, além de apresentarem muitas vesículas semelhantes a lisossomos. Essas vesículas, também existentes nos embriões gerados *in vivo*, aparecem no citoplasma, frequentemente unidas às gotas lipídicas, o que sugere que os lipídeos podem ser degradados por essas estruturas, explicando em parte a diminuição das gotas lipídicas no citoplasma dos embriões cultivados sem soro. Adicionalmente, Plante e King (1994) demonstraram que gotas lipídicas intracitoplasmáticas são numerosas em embriões provenientes de oócitos maturados e fecundados *in vitro*, bem como em embriões produzidos *in vivo* antes do estágio de blastocisto, mas menos abundantes em blastocistos produzidos *in vivo*. De acordo com Ferguson e Leese (1999), as concentrações de TAG, em embriões bovinos gerados *in vivo*, permanecem estáveis desde o estágio de duas células até o estágio de blastocisto, enquanto em embriões PIV na presença de soro essas reservas podem dobrar desde o estágio de 4 células até o de blastocisto. O alto conteúdo lipídico se manifesta através de uma coloração mais escura dos embriões (THOMPSON, 1997).

Estudos realizados com embriões bovinos relatam que mórulas PIV na presença de soro possuem mitocôndrias imaturas, de menor volume e formato esférico ou ovóide, similares às de embriões em estágios anteriores ao de 8 células (ABE et al., 1999, 2002; CROSIER et al., 2000). Embriões ovinos PIV também sofrem acúmulo lipídico quando cultivados na presença de soro, tendo sido descritos efeitos adversos do soro na estrutura das mitocôndrias nos embriões dessa espécie (THOMPSON et al., 1995; DORLAND et al., 1994). Dorland et al. (1994) sugeriram que o acúmulo de gotas lipídicas pode ser causado pelo deficiente funcionamento dessas mitocôndrias, já que os lipídeos intracelulares são fisiologicamente metabolizados por essas organelas.

Além dos efeitos relacionados ao acúmulo lipídico e às mitocôndrias, outras alterações têm sido atribuídas à presença do soro no meio de cultivo, como o prolongamento da gestação e o nascimento de cordeiros com peso excessivo (THOMPSON, et al., 1995; SINCLAIR et al., 1998), bem como diferentes alterações morfológicas embrionárias (GARDNER et al., 1994; ABE et al., 1999; FAIR et al., 2001).

Pouco se sabe sobre a captação e a metabolização de lipídeos em embriões, portanto, os mecanismos pelos quais os embriões cultivados na presença de soro acumulam lipídeos ainda necessitam de esclarecimento. Todavia, foi sugerido que esses lipídeos podem resultar da captação dos TAG contidos nas lipoproteínas do soro (FERGUSON e LEESE, 1999; THOMPSON et al., 1995), pois se sabe que células em cultivo podem perfeitamente captar ácidos graxos, fosfolipídios e TAG de meios suplementados com soro (SPECTOR, 1973). Sata et al. (1999) demonstraram que o perfil de ácidos graxos de embriões cultivados na presença de soro é bastante diferente do de embriões cultivados em meios livres de soro. Enquanto blastocistos cultivados na ausência de soro têm como maior componente lipídico o ácido mirístico (35,7%), que é saturado e tem cadeia com 14 carbonos, os cultivados na

presença de soro possuem baixos níveis de ácido mirístico e altos níveis de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa, com 30,5% de ácido palmítico (C16:0), 24,2% de ácido esteárico (C18:0), 16,3% de ácido palmitoleico (C16:1) e 12,1% de ácido oleico (C18:1). É interessante notar que o perfil de ácidos graxos dos embriões cultivados na presença de soro assemelha-se muito ao do SFB, mostrando altos níveis de ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia longa. Esses dados sugerem que o acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa em embriões expostos ao soro seja proveniente do próprio soro. Foi sugerido ainda que os lipídeos acumulados em embriões PIV sejam provenientes do rompimento de membranas em resposta a um ambiente de cultivo não fisiológico, e não da captação do meio de cultivo (CROSIER et al., 2000).

Apesar de todos os efeitos adversos que o soro exerce sobre os embriões, principalmente na sua criotolerância, ele é muito utilizado em meios de cultivo *in vitro* pelo fato de proporcionar taxas significativamente mais altas de blastocistos (FERGUSON e LEESE, 1999; GUTIERREZ-ADAN et al., 2001; CHO et al., 2002). Rizos et al. (2003) ainda observaram aceleração no desenvolvimento embrionário com o uso do soro, resultando em uma maior taxa de blastocistos no dia 6 que, todavia, desapareceu no dia 7. Embriões cultivados na ausência de soro apresentam características morfológicas semelhantes às dos embriões produzidos *in vivo* (ABE et al., 1999), e criotolerância em um nível intermediário entre embriões produzidos na presença de soro e embriões gerados *in vivo* (RIZOS et al., 2003).

2.3. O ACÚMULO LIPÍDICO E A CRIOTOLERÂNCIA

As pesquisas demonstraram que embriões que contêm excesso de lipídeos no citoplasma são mais sensíveis à criopreservação (MOHR e TROUNSON, 1981; LEIBO e

LOSKUTOFF, 1993; NAGASHIMA et al., 1994; McEVOY et al., 2000). Entre os animais domésticos, oócitos e embriões suínos são menos criotolerantes do que bovinos e ovinos, pois possuem níveis mais elevados de TAG (NAGASHIMA et al., 1994; McEVOY et al., 2000). Embriões suínos em estágio inicial de desenvolvimento têm alto conteúdo lipídico no citoplasma (NIIMURA e ISHIDA, 1980). Ao longo do desenvolvimento embrionário, o conteúdo lipídico começa a diminuir, coincidindo com um aumento na criotolerância (TROUNSON et al., 1976). Mórulas suínas são extremamente sensíveis à criopreservação devido à grande quantidade de lipídeos (NAGASHIMA et al., 1989), enquanto blastocistos são menos sensíveis ao resfriamento e tem menor número de gotas lipídicas, bem como gotas de menor tamanho (NIIMURA e ISHIDA, 1980; NAGASHIMA et al., 1994). De forma semelhante, embriões bovinos contêm grande número de gotas lipídicas no período das primeiras clivagens (MOHR e TROUNSON, 1981), que declinam no estágio de blastocisto, coincidindo com a diminuição da sensibilidade à criopreservação (TROUNSON et al., 1976). Entretanto, embriões murinos, que possuem pequena quantidade de gotas lipídicas, podem ser criopreservados com sucesso em todos os estágios de desenvolvimento (WHITTINGHAM et al., 1972).

O processo convencional de criopreservação envolve a exposição das estruturas a temperaturas muito baixas, antes mesmo que ocorra o congelamento, o que produz alterações na organização lipídica bidimensional das membranas (DROBNIS et al., 1993). As alterações causadas pela transição das fases lipídicas podem ocorrer em membranas plasmáticas, membranas internas como mitocôndrias ou retículo endoplasmático e também em lipídeos inseridos em inclusões. Ainda que as mudanças de fase sejam reversíveis para os lipídeos, elas podem resultar em interações irreversíveis com proteínas ou outras moléculas que interagem com os lipídeos (MOHR e TROUNSON, 1981). A susceptibilidade das membranas

aos danos decorrentes dos processos de congelamento é dependente da espécie e do método de produção, bem como do estágio de desenvolvimento do embrião a ser criopreservado (PUGH et al., 1998). Por exemplo, embriões suínos gerados *in vivo* e embriões bovinos produzidos *in vitro* são extremamente sensíveis ao resfriamento abaixo de + 14 °C, enquanto embriões bovinos e ovinos gerados *in vivo* não são (POLLARD e LEIBO, 1994).

Na criopreservação pela técnica de congelamento convencional, parte da solução extracelular congela primeiro e deixa uma pequena porção ainda não congelada, mas altamente concentrada. Com isso, ocorre uma contração osmótica do embrião, devido à passagem da água do citoplasma para a solução externa, mais concentrada. Quando os embriões se contraem, as membranas tornam-se flácidas e alguns blastômeros podem perder material de membrana. Essas alterações combinadas à fase de transição dos lipídeos podem causar danos físicos à membrana, tais como a perda da fluidez ou até mesmo ruptura (WOLFE e BRYANT, 1999). Sabe-se, porém, que o choque causado pelo resfriamento, fenômeno pelo qual a crioinjúria é induzida por diminuição repentina da temperatura sem o congelamento, é mais severo quando as concentrações de esteróides na membrana estão baixas e as de ácidos graxos poli-insaturados estão altas (DARIN-BENNET et al., 1973). McEvoy et al. (2000) sugeriram que a quantidade de ácidos graxos insaturados sequestrados *in vivo* ou acumulados *in vitro* pode ser mais prejudicial para a criotolerância de oócitos e embriões do que o conteúdo total de lipídeos, já que eles tornam o embrião mais susceptível aos radicais livres ou a outras injúrias oxidativas.

Embriões possuem ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia e graus de insaturação, o que faz com que as fases de transição lipídica ocorram em diferentes temperaturas, podendo mais de uma fase coexistir, o que resulta em danos estruturais severos ao embrião. A presença de gotas lipídicas no citoplasma pode ter efeito direto na

sobrevivência embrionária durante o resfriamento, pois o resfriamento de embriões suínos a 15 °C evidenciou uma tendência das gotas a coalescer e formar gotas maiores (EDIDIN e PETIT, 1977; HYTTEL e NIEMANN, 1990). Como as gotas lipídicas são ao menos parcialmente cercadas pelo retículo endoplasmático (EDIDIN e PETIT, 1977), a resultante perda da organização citoplasmática pode resultar em danos irreversíveis aos embriões (MOHR E TROUNSON, 1981). Adicionalmente, em embriões suínos, a grande quantidade de lipídeos em estágios anteriores ao de blastocisto pode sofrer alterações irreversíveis, fazendo com que os mesmos percam a função metabólica, tornando-se inúteis para o embrião. Durante a reidratação, a ruptura da membrana plasmática pode liberar lipídeos vitais ao embrião, causando uma deficiência lipídica (DOBRINSKY, 1996). Outras estruturas ligadas a membranas, como lisozimas, podem liberar seus conteúdos para o citoplasma, ou ainda perderem a função. Ainda, danos aos microtúbulos durante a criopreservação podem afetar a mobilidade e o transporte de nutrientes, impedindo o suprimento de substratos necessários para a formação da blastocelule no embrião (DOBRINSKY, 1996).

2.4. DELIPIDAÇÃO MECÂNICA

Estudos realizados com embriões bovinos em estágio inicial de desenvolvimento mostram que a remoção física das gotas lipídicas é compatível com o desenvolvimento embrionário e tem efeitos benéficos na tolerância desses embriões à criopreservação (USHIJIMA et al., 1999; DIEZ et al., 2001). Os embriões são previamente submetidos à centrifugação, que promove o deslocamento dos lipídeos intracelulares, fazendo com que eles se acumulem em uma região. Em seguida, o conteúdo lipídico é retirado com o auxílio de um micromanipulador.

De forma semelhante, embriões suínos em estágio inicial de desenvolvimento e submetidos à delipidação mecânica tiveram sua criotolerância aumentada (NAGASHIMA et al., 1994, 1995, 1996). Inicialmente, acreditava-se que a remoção total dos lipídeos era altamente prejudicial aos embriões, e apenas a remoção parcial era realizada. Entretanto, maiores taxas de desenvolvimento e sobrevivência após a criopreservação foram obtidas com embriões completamente delipidados (NAGASHIMA et al., 1994). A delipidação deve ser realizada no estágio inicial de desenvolvimento embrionário (de 2 a 8 células), para evitar que ocorram danos ao citoesqueleto. Quando ocorre a compactação e a formação da blastocle, há diferenciação celular e a organização do citoesqueleto se torna mais complexa, tornando-o mais susceptível a danos (DOBRINSKY, 1996). Apesar das funções atribuídas aos lipídeos intracelulares, os resultados destes experimentos indicam que as gotas lipídicas citoplasmáticas não são essenciais ao desenvolvimento de embriões bovinos e suínos, o que implica na necessidade de mais investigações quanto à importância da presença de lipídeos no citoplasma de embriões de mamíferos (USHIJIMA, 1999).

A delipidação mecânica, entretanto, apesar de apresentar bons resultados, é um procedimento demorado e trabalhoso, que pode alterar o potencial de desenvolvimento dos blastocistos após a transferência (DIEZ et al., 2001). O desenvolvimento de meios não invasivos de remoção dos lipídeos embrionários pode estabelecer um método adequado para superar as atuais limitações na criopreservação de embriões suínos e de embriões bovinos PIV.

2.5. ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

O termo ácido linoleico conjugado (CLA) refere-se a uma classe de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico, ou *cis-9, cis-12* octadecadienoico. O ácido

linoleico é um ácido graxo de 18 carbonos com duas insaturações, convertido em CLA pela ação dos microrganismos ruminais, que deslocam as ligações duplas de forma a alterná-las com ligações simples, daí o termo conjugado. Essas ligações duplas podem estar localizadas em diferentes posições ao longo da cadeia de 18 carbonos, e ambas podem adotar a forma *trans*. Formas naturais de CLA podem ser encontradas em produtos lácteos e em carnes de ruminantes, e a produção artificial pode ser realizada através da isomerização alcalina do ácido linoleico. Embora existam dezenas de isômeros do ácido linoleico, os mais estudados são o *cis-9, trans-11* (*c9, t11* CLA) e o *trans-10, cis-12* (*t10, c12* CLA), sendo o primeiro encontrado em maior quantidade na dieta humana (KEPLER et al., 1966; PARODI, 1977).

Inicialmente, o interesse científico no CLA limitava-se a microbiologistas que estudavam a bio-hidrogenação do ácido linoleico no rúmen. Em 1987, porém, Ha et al. observaram que o CLA era capaz de inibir neoplasia epitelial em camundongos. Desde então, inúmeros efeitos benéficos têm sido atribuídos ao CLA, incluindo a inibição da carcinogênese (IP et al., 1991; BOCCA et al., 2010), modulação do sistema imune (MILLER et al., 1994; YANG e COOK, 2003), inibição da aterosclerose (KRITCHEVSKY et al., 2000; MITCHELL e McLEOD, 2008), da diabetes (HOUSEKNECHT et al., 1998; RYDER et al., 2001), aumento do crescimento (CHIN et al., 1994; BEE, 2000) e da eficiência reprodutiva (DE VETH et al., 2009).

2.6. EFEITO DO CLA NO METABOLISMO LIPÍDICO

Estudos mostraram que o isômero *t10, c12* CLA é capaz de exercer um efeito inibitório na captação e na produção de lipídeos pelas células (PARK et al., 1997; BROWN et al., 2001a). Este efeito confere ao CLA propriedades antiadipogênicas, diminuindo a gordura corporal e aumentando a massa magra em diversas espécies animais (PARK et al., 1997;

OSTROWSKA et al., 1999; DeLANY et al., 1999; AZAIN et al., 2000). O *t10, c12* CLA também se mostrou capaz de reduzir a quantidade de gordura no leite em diversas espécies animais, em até 49,3% (LOOR et al., 2003; HAYASHI et al., 2007; SINCLAIR et al., 2007; GERVAIS et al., 2009; SHINGFIELD et al., 2009), bem como em humanos (MASTERS et al., 2002). Os efeitos antiadipogênicos do CLA em humanos, entretanto, são inconsistentes e menos significativos do que os observados em animais (BLANKSON et al., 2000; THOM et al., 2001; LARSEN et al., 2003; MALPUECH-BRUGÈRE et al., 2004). Essa diferença pode ser explicada, ao menos parcialmente, pelo fato das doses de CLA utilizadas em humanos serem mais baixas das que as utilizadas em animais.

Embora os exatos mecanismos pelos quais o *t10, c12* CLA atua na redução de gordura não sejam todos conhecidos, alguns têm sido elucidados ou sugeridos, como aumento do consumo de energia (WEST et al., 2000; TERPSTRA et al., 2002), inibição da síntese *de novo* (LOOR e HERBEIN, 1998; BAUMGARD et al., 2000), aumento da oxidação de ácidos graxos (OHNUKI et al., 2001; EVANS et al., 2002) e da lipólise (PARK et al., 1997; WEST et al., 1998), bem como atuação específica nos adipócitos, diminuindo o tamanho (AZAIN et al., 2000; TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2000), inibindo a diferenciação (BRODIE et al., 1999) e induzindo a apoptose dessas células (EVANS et al., 2000; TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2000). O isômero *c9, t11* CLA, entretanto, não apresentou propriedades antiadipogênicas (PARK et al., 1999, BAUMGARD et al., 2000; CHOI et al., 2000; BROWN et al., 2001a).

2.7. AÇÃO DO CLA NAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO LIPÍDICO

Uma das enzimas chave no metabolismo de lipídeos é a lipase lipoprotéica (LPL), localizada na parede dos capilares, que hidrolisa os triacilgliceróis extracelulares e libera ácidos graxos, possibilitando que estes sejam então captados pelas células. O *t10, c12* CLA é capaz de reduzir a expressão de RNAm da LPL em diferentes tecidos e em diferentes espécies (PARK et al., 1997; BAUMGARD et al., 2002; BROWN et al., 2003), reduzindo a expressão de RNAm em até 66% (PARK et al., 1997) e a quantidade de TAG em até 55% (PARK et al., 1999), enquanto o *c9, t11* CLA não demonstrou efeito algum (PARK et al., 1999).

A esteroil-CoA dessaturase (SCD), também conhecida como delta 9-dessaturase, é uma enzima envolvida na síntese de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), bem como na regulação desse processo. Ela é responsável pela introdução de uma ligação dupla em ácidos graxos saturados (AGS), como o ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0), transformando-os em AGMI, necessários para a síntese de TAG. Estudos *in vivo* e *in vitro* em diferentes espécies mostraram que o *t10, c12* CLA pode diminuir a expressão de RNAm da SCD em até 75% (LEE et al., 1998; CHOI et al., 2000; BAUMGARD et al., 2002), além de inibir diretamente a atividade dessa enzima (BRETILLON et al., 1999; PARK et al., 2000), enquanto o *c9, t11* CLA não exerceu nenhum efeito (BAUMGARD et al., 2000; CHOI et al., 2000; PARK et al., 2000). Dessa forma, células expostas ao *t10, c12* CLA têm o perfil de ácidos graxos alterado, havendo aumento na proporção AGS:AGMI (LEE et al., 1998; CHOUINARD et al., 1999; BROWN et al., 2003). De forma contraditória, Herrmann et al. (2009) descreveram um aumento na expressão de RNAm da SCD em pré-adipócitos humanos cultivados com *t10, c12* CLA.

Outro alvo da ação do CLA é a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), que catalisa a síntese do malonil-CoA em uma reação irreversível que dá início à biossíntese de ácidos graxos. Estudos mostram que a expressão de RNAm da ACC pode ser reduzida pelo *t10*, *c12* CLA em células de camundongos (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2000; HOUSE et al., 2005), bovinos (BAUMGARD et al., 2002; PETERSON et al., 2003), suínos (CORL et al., 2008) e hamsters (ZABALA et al., 2006), com redução de até 72% (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2000).

O complexo ácido graxo sintase (FAS) é um dímero, composto por dois monômeros idênticos, cada um contendo sete atividades enzimáticas. A FAS é imprescindível na síntese *de novo* de ácidos graxos, pois catalisa múltiplas reações que culminam com a incorporação de uma unidade de dois carbonos na cadeia de ácidos graxos em formação, até que se forme o ácido palmítico (16:0). O CLA mostrou ser capaz de reduzir a expressão de RNAm deste complexo em até 88% em diferentes espécies e tecidos (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2000; BAUMGARD et al., 2002; DONNELLY et al., 2009; KADEGOWDA et al., 2010). Entretanto, Bee (2000), Azain et al. (2000) e House et al. (2005) não observaram alterações na quantidade de RNAm em tecido adiposo de leitões, ratos e camundongos, respectivamente.

Outro mecanismo pelo qual o CLA age no metabolismo lipídico é através da diminuição da expressão dos genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese de TAG. A enzima glicerol fosfato aciltransferase (GPAT) atua na transferência de um grupo acil para a posição 1 do glicerol 3-fosfato. Na sequência, a acilglicerol fosfato aciltransferase (AGPAT) transfere outro grupo acil para a posição 2 do então monoacilglicerol 3-fosfato. Tanto a GPAT quanto a AGPAT tiveram sua expressão de RNAm reduzida pela ação do *t10*, *c12* CLA em glândula mamária de vacas (BAUMGARD et al., 2002; PETERSON et al., 2003) e em células intestinais humanas (MURPHY et al., 2009). A enzima AGPAT teve

ainda a expressão de RNAm reduzida em glândula mamária de camundongos (KADEGOWDA et al., 2010).

2.8. EFEITO DO CLA NA LIPÓLISE E OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Uma série de estudos sugere que o CLA altera o metabolismo lipídico induzindo lipólise. Park et al. (1997) demonstraram que adipócitos murinos tratados com CLA tiveram 22% mais liberação de glicerol quando comparados ao grupo controle. Baumgard et al. (2000) relataram que taxas de ácidos graxos não esterificados foram aumentadas no plasma de vacas tratadas com CLA. Outros estudos evidenciaram que o CLA induz lipólise (BRETILLON et al., 1999; PARK et al., 1999; CHOI et al., 2000; EVANS et al., 2002), porém, os efeitos do CLA na lipólise são contraditórios. Estudos *in vivo* em camundongos (XU et al., 2003; HOUSE et al., 2005) e *in vitro* com adipócitos humanos evidenciaram que o CLA não exerceu efeito algum na lipólise (BROWN et al., 2001b), atribuindo a principal ação delipidativa do CLA à inibição da lipogênese, ao invés do aumento da lipólise.

Além do possível efeito do CLA na lipólise, existem indícios de que este estimula também a β -oxidação de ácidos graxos (PARK et al., 1997; SAKANO et al., 1999; GUDBRANDSEN et al., 2009). Evans et al. (2002) observaram aumento de 55% na oxidação do ácido oleico em pré-adipócitos tratados com *t10, c12* CLA. Adicionalmente, foi demonstrado que o *t10, c12* CLA estimula a atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT), enzima mitocondrial que promove o transporte dos ácidos graxos de cadeia longa através da membrana, para serem então oxidados (PARK et al., 1997; RAHMAN et al., 2001; HOUSE et al., 2005). Entretanto, Corl et al. (2008) não observaram nenhuma influência do CLA na β -oxidação do palmitato *in vitro*.

2.9. EFEITO DO CLA NA CRIOTOLERÂNCIA EMBRIONÁRIA

Pereira et al. (2007, 2008) relataram que a suplementação do meio de cultivo contendo soro com o *t10, c12* CLA diminuiu significativamente a quantidade de lipídeos acumulados no citoplasma de blastocistos, aumentando, conseqüentemente, a sobrevivência destes após a criopreservação. Adicionalmente, Hochi et al. (1999) produziram mórulas bovinas mais resistentes à criopreservação adicionando ácido linoleico conjugado à albumina ao meio de cultivo *in vitro*. No entanto, Darwich et al. (2010) não observaram aumento da sobrevivência embrionária após a criopreservação e nem diminuição da expressão de RNAm de algumas das principais enzimas relacionadas à síntese de lipídeos, demonstrando a necessidade de mais estudos para avaliar o efeito do *t10, c12* CLA na criotolerância de embriões PIV.

Em vista disso, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação com ácido linoleico conjugado no desenvolvimento embrionário, sobrevivência embrionária após a criopreservação e expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN.

3- ARTIGO A SER SUBMETIDO A UM PERIÓDICO

Ácido Linoleico Conjugado na Criotolerância de Embriões Bovinos

Produzidos *In Vitro*

RESUMO

O ácido linoleico conjugado (CLA) pode reduzir o teor lipídico de embriões produzidos *in vitro* (PIV), o que pode melhorar a sua criotolerância. Este estudo avaliou o efeito de concentrações crescentes de CLA na criotolerância de embriões bovinos PIV. No Experimento 1, embriões foram cultivados em meio com concentrações crescentes do isômero *trans-10, cis-12* CLA: grupo controle (0 μ M), grupo 50CLA (50 μ M), grupo 100CLA (100 μ M) e grupo 200CLA (200 μ M). No Experimento 2, os zigotos foram cultivados em meio com 100 μ M (apontada no Experimento 1) de diferentes isômeros de CLA, sendo: grupo controle, sem adição de CLA, grupo *t10, c12* CLA, grupo *c9, t11* CLA e grupo Mistura, com 50% de cada. No Experimento 3, os zigotos foram distribuídos em 2 grupos: grupo CLA, contendo 100 μ M do isômero *t10, c12* CLA (determinado no Experimento 2) e grupo controle, sem CLA. Dos blastocistos obtidos, parte foi vitrificada e parte congelada, de acordo com o estágio (Bx ou Bl). Foram avaliadas as taxas de clivagem e de blastocistos após o cultivo, e de re-expansão e eclosão após o reaquecimento. Também foi determinada a densidade celular e a expressão de RNAm das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACCa), estearoil-CoA dessaturase (SCD1) e ácido graxo sintase (FASN) destes embriões. A maior concentração de *t10, c12* CLA que não reduziu a taxa de blastocistos foi a de 100 μ M. No Experimento 2, a maior taxa de eclosão após o reaquecimento foi a do grupo *c9, t11* no estágio de Bx (68,6%), que não diferiu dos demais tratamentos vitrificados neste estágio. A menor taxa de eclosão foi a do grupo Mistura, no estágio de Bl (8,0%), que não diferiu dos grupos *t10, c12* e *c9, t11*, no mesmo estágio. Em todos os tratamentos, embriões em estágio de Bx apresentaram taxas superiores aos Bl, exceto no grupo Controle, em que foram similares. No Experimento 3, a maior taxa de eclosão foi a do grupo Controle com Bx vitrificados (67,4%), que foi semelhante à do grupo CLA com Bx vitrificados. A menor taxa de eclosão foi a do grupo CLA com Bl congelados (10,3%), que não diferiu dos demais tratamentos. Nos grupos vitrificados, expostos ou não ao CLA, as taxas de eclosão foram superiores nos Bx. Nos grupos congelados, expostos ou não ao CLA, as taxas foram semelhantes. Não houve diferença na densidade celular entre os embriões expostos ou não ao CLA, e nem na expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN. Conclui-se que a adição dos isômeros do CLA *t10, c12* e *c9, t11* ao meio de cultivo não melhora a criotolerância de embriões bovinos PIV e que o isômero *t10, c12* CLA não afeta o número de células e não altera a expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN destes embriões.

Palavras-chave: Vitrificação. Congelamento. CLA. Expressão de RNAm.

ABSTRACT

Linoleic conjugated acid (CLA) can reduce lipid content of *in vitro* produced (IVP) embryos, and improve their cryotolerance. This study evaluated the effect of increasing CLA concentrations on IVP bovine embryos cryotolerance. In Experiment 1, embryos were cultured in medium containing increasing concentrations of *trans-10*, *cis-12* CLA isomer: control group (0 μ M), 50CLA group (50 μ M), 100CLA group (100 μ M) and 200CLA group (200 μ M). In Experiment 2, zygotes were cultured in medium containing 100 μ M (pointed by Experiment 1) of distinct CLA isomers: control (CLA free) group, *t10*, *c12* CLA group, *c9*, *t11* CLA group, and mixture of both isomers group, with 50% of each. In Experiment 3, zygotes were allocated to 2 groups: CLA group, containing 100 μ M of *t10*, *c12* CLA isomer (determined in Experiment 2) and control (CLA free) group. The blastocysts obtained were either vitrified or frozen, according to their stage (Bx or B1). Cleavage and blastocyst rates were assessed after IVC, and re-expansion and hatching rates were assessed after re-warming. Cell counting and mRNA expression of the acetyl-CoA carboxylase (ACCa), stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and fatty acid synthase (FASN) enzymes were also assessed. The highest concentration of *t10*, *c12* CLA that did not impair blastocyst rate was 100 μ M. In Experiment 2, the highest hatching rate after re-warming was obtained in group *c9*, *t11* at Bx stage (68.6%), not differing from other treatments vitrified at this stage. The lowest hatching rate was obtained in Mixture group, vitrified at B1 stage (8.0%), not differing from groups *t10*, *c12* and *c9*, *t11*, at the same stage. In all treatments, Bx stage embryos showed higher rates than the B1 stage embryos, except for the Control group, whose rates were similar. In Experiment 3, the highest hatching rate was obtained in Control (CLA free) group, for Bx stage vitrified embryos (67.4%), which was similar to the CLA group, for Bx stage vitrified embryos. The lowest hatching rate was observed in CLA group with B1 frozen embryos (10.3%), not differing from the other treatments. In all vitrified groups, despite the CLA addition, hatching rates were higher for Bx stage embryos. In all frozen groups, despite the CLA addition, hatching rates were also similar. There was also no difference in cell counting or mRNA expression of the enzymes ACCa, SCD1 and FASN. Under the conditions of this study, the addition of CLA isomers *t10*, *c12* and *c9*, *t11* to culture media does not improve cryotolerance of IVP bovine embryos. The isomer *t10*, *c12* CLA does not affect cell number and mRNA expression of the enzymes ACCa, SCD1 and FASN.

Key-words: Vitrification. Freezing. CLA. Gene expression.

3.1 INTRODUÇÃO

Já está bem estabelecido que embriões produzidos *in vitro* (PIV) são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo* (LEIBO e LOSKUTOFF, 1993; POLLARD e LEIBO, 1994). Embriões PIV são diferentes em muitos aspectos, mas existem evidências de que a grande susceptibilidade dos mesmos à criopreservação se deve principalmente à grande quantidade de grânulos lipídicos no citoplasma (USHIJIMA et al., 1999; ABE et al., 2002). Os embriões bovinos contêm grande número de gotas lipídicas no citoplasma nas primeiras clivagens (MOHR e TROUNSON, 1981), que declinam no estágio de blastocisto, coincidindo com a diminuição da sensibilidade à criopreservação (TROUNSON et al., 1976). As gotas lipídicas podem exercer um efeito direto na sobrevivência dos embriões durante o congelamento, já que a solidificação dos lipídeos durante o resfriamento pode causar alterações estruturais no momento da criopreservação e resultar em danos irreversíveis ao embrião (MOHR e TROUNSON, 1981).

Ainda que todos os embriões PIV acumulem excessivamente lipídeos no citoplasma, a adição de soro ao meio de cultivo aumenta a ocorrência de gotas lipídicas (ABE et al., 1999; ABE et al., 2002), contribuindo para a sua maior sensibilidade à criopreservação (YAMASHITA et al., 1999; GÓMEZ et al., 2008). Apesar dos efeitos negativos na criotolerância e da sua natureza indefinida e variável, o soro é comumente adicionado aos meios de cultivo embrionários, já que aumenta o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (GUTIERREZ-ADAN et al., 2001; CHO et al., 2002).

A remoção mecânica do excesso de lipídeos intracelulares de embriões bovinos (USHIJIMA et al., 1999; DIEZ et al., 2001) e suínos (NAGASHIMA et al., 1994, 1995, 1996), em estágios iniciais de desenvolvimento aumenta sua resistência à criopreservação.

Entretanto, é demasiadamente demorada e trabalhosa para ser executada na rotina laboratorial, demandando a busca por um método não invasivo e menos trabalhoso e que reduza o teor lipídico do citoplasma embrionário.

Um isômero conjugado do ácido linoleico, o *trans-10, cis-12* octadecadienoico (*t10, c12* CLA), é capaz de reduzir a quantidade de lipídeos em diferentes tipos celulares de animais e humanos. O *t10, c12* CLA atua principalmente na redução da captação e da síntese de ácidos graxos (LOOR e HERBEIN, 1998; PARIZA et al., 2001), diminuindo a expressão de RNAm de importantes enzimas lipogênicas associadas a rotas de síntese de gordura (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2000; BAUMGARD et al., 2002). Pereira et al. (2007, 2008) adicionaram *t10, c12* CLA ao meio de cultivo embrionário e observaram uma redução no conteúdo lipídico e aumento na criotolerância de embriões bovinos. De forma contraditória, Darwich et al. (2010) não observaram aumento na sobrevivência embrionária após a criopreservação, demonstrando a necessidade de mais estudos para avaliar o efeito do *t10, c12* CLA na criotolerância de embriões PIV. Os isômeros do CLA, principalmente o *t10, c12* CLA, quando adicionados ao meio de cultivo em doses adequadas, podem diminuir a produção de lipídeos pelas células embrionárias, diminuindo assim a sensibilidade dos embriões à criopreservação. Desta forma, os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo com ácido linoleico conjugado no desenvolvimento e sobrevivência embrionária após a criopreservação. Adicionalmente, avaliar o efeito do CLA na expressão de RNAm das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACCa) e estearoil-CoA dessaturase (SCD1), e do complexo enzimático ácido graxo sintase (FASN).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Delineamento experimental

Experimento 1:

Foi testado o efeito de diferentes concentrações do *t10, c12* CLA metil-éster (Matreya, ref. 001254) suplementado ao meio de cultivo embrionário *in vitro* sobre as taxas de blastocisto. O experimento foi realizado com 11 replicações. Os prováveis zigotos foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: grupo **Controle**, sem a adição de CLA; grupo **50CLA**, suplementado com 50 µM de *t10, c12* CLA; grupo **100CLA**, suplementado com 100 µM de *t10, c12* CLA e grupo **200CLA**, suplementado com 200 µM de *t10, c12* CLA.

Experimento 2:

Nesse experimento utilizou-se a concentração de 100 µM, a maior concentração de *t10, c12* CLA que não reduziu a taxa de blastocistos no Experimento 1. Essa concentração também foi utilizada para o teste do isômero *c9, t11* CLA metil-éster (Matreya, ref. 001255), bem como na mistura dos dois isômeros. O experimento foi conduzido em 5 replicações, sendo os prováveis zigotos aleatoriamente distribuídos em 4 grupos: grupo Controle, sem a adição de CLA; grupo ***t10, c12***, suplementado com 100 µM de *t10, c12* CLA; grupo ***c9, t11***, com 100 µM de *c9, t11* CLA; grupo **Mistura**, com 100 µM de uma mistura contendo 50% de *t10, c12* CLA e 50% de *c9, t11* CLA.

Experimento 3:

Nesse experimento, os prováveis zigotos foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos: grupo **Controle**, sem adição de CLA; grupo **CLA**, com 100 µM de *t10, c12* CLA, apontado no Experimento 2. Em cada um dos grupos os embriões produzidos foram separados

em função do estágio de desenvolvimento (B1 ou Bx) e submetidos ao congelamento convencional (50%) ou à vitrificação (50%).

3.2.2 Obtenção dos oócitos

Ovários bovinos provenientes de frigoríficos foram mantidos a 25 – 35 °C em solução salina tamponada com fosfato (PBS), adicionada de penicilina e estreptomicina, durante o transporte ao laboratório. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos com 2 – 8 mm de diâmetro com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após 10 min de decantação o sedimento do líquido folicular foi depositado em placas de Petri de 90 x 15 mm quadriculadas, sendo a identificação dos CCOs conduzida sob lupa estereomicroscópica. A seleção foi efetuada no próprio líquido folicular, previamente centrifugado por 5 min na velocidade máxima (Centrifuga Fanem Baby), sendo selecionados os CCOs de qualidade boa e excelente (oócitos com citoplasma homogêneo e totalmente envoltos por células compactas do cumulus), de acordo com a classificação da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS).

3.2.3 Maturação *in vitro*

A maturação foi realizada em grupos de 40 CCOs, em placas Nunc de quatro poços (Nunc A/S; Cat. 176740). Em cada poço utilizou-se 400 µL de meio TCM-199 sais de Earle (SIGMA) adicionado de 26,2 mM de NaHCO₃, 25 mM de HEPES, 0,2 mM de piruvato de sódio com 0,01 UI de FSH/mL, 0,5 µg/mL de LH e 10% de soro de égua em estro (SEE). As placas com os oócitos foram mantidas por 22 – 24 h em estufa de cultivo a 39 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada.

3.2.4 Seleção espermática e fecundação *in vitro*

Os espermatozoides foram selecionados através da centrifugação de sêmen descongelado de um touro da raça Flamengo com comprovada capacidade de produção embrionária. O sêmen foi submetido a um gradiente de 45 e 90% de Percoll (Nutricell) e lavado em meio Sperm-TALP.

Após a maturação, os CCOs foram depositados em 400 µL de meio Fert-TALP, adicionado de 30 µg/mL de heparina, 30 µg/mL de penicilinamina, 15 µM de hypotaurina e 1 µM de epinefrina, contendo uma dose inseminante de 1×10^6 espermatozoides/mL. Os oócitos foram incubados com os espermatozoides por 18-22 h, em estufa de cultivo a 39 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada.

3.2.5 Cultivo *in vitro*

Após a fecundação, as células do *Cumulus oophorus* foram removidas por pipetagens sucessivas em meio TCM-HEPES suplementado com 10% de SFB. Logo após, grupos de 40 prováveis zigotos foram transferidos para cada poço das placas, contendo 400 µL de meio SOFaaci suplementado com 5% de SEE. O cultivo foi realizado colocando-se as placas NUNC em sacos impermeáveis contendo uma mistura de 90% de N₂, 5% de O₂ e 5% de CO₂, a 39 °C e com umidade saturada.

3.2.6 Avaliações dos embriões

A avaliação da clivagem foi realizada no dia 2 (D2), considerando a fecundação como dia 0. Ao final do período de cultivo (D7), foi determinada a taxa de desenvolvimento embrionário nos distintos tratamentos.

De cada um dos tratamentos, foram coletados de 13 a 20 embriões nos estágios de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be) para quantificar o número de células. Para esta avaliação, os embriões foram fixados em álcool absoluto com 10 µg/mL de bisbenzimidazina (Hoechst 33342) por aproximadamente 7 minutos e foram submetidos a um microscópio invertido de epifluorescência, para a contagem dos núcleos celulares.

3.2.7 Vitrificação dos embriões

Os embriões dos diferentes tratamentos foram vitrificados separadamente, em micropipetas de vidro, de acordo com estágio de desenvolvimento, Bl ou Bx. Inicialmente os embriões foram expostos a uma solução com 10% etileno glicol (EG) + 10% propanediol (PR), por 1 min, seguida da exposição a 20% EG + 20% PR por 25 seg, quando foram envasados em grupos de 3 a 4 e submersos em nitrogênio líquido.

O reaquecimento foi realizado com 4 seg de exposição ao ar e imersão imediata em soluções aquecidas (35 °C) de TCM-199 adicionado de 10% de soro, contendo concentrações decrescentes de sacarose (0,30 e 0,15 M). O tempo de reidratação em cada solução foi de 5 minutos. Os embriões foram submetidos a 72 h adicionais de cultivo, sendo avaliadas a capacidade de re-expansão e de eclosão às 24, 48 e 72 h.

3.2.8 Congelamento dos embriões

Os embriões nos estágios de Bl e Bx foram transferidos, separadamente, para uma solução crioprotetora, contendo 1,5 M de EG e envasados em palhetas de 0,25 mL. As palhetas foram introduzidas no equipamento de congelamento (Biocom®-Dominium K), previamente estabilizado a -7 °C. Foi induzida a cristalização (*seeding*) e após 10 min iniciou-

se o resfriamento a uma velocidade de 0,5 °C/min, até -35 °C. As palhetas permaneceram nessa temperatura por 10 min e foram então imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijões criogênicos.

Para o descongelamento, as palhetas foram mantidas por 4 seg em ar e a seguir colocadas em banho-maria a 35 °C por 30 seg. Os embriões foram lavados em TCM-HEPES + 10% SEE, cultivados em SOFaaci por 72 h, e tiveram sua capacidade de re-expansão e eclosão *in vitro* avaliadas a cada 24 h.

3.2.9 Extração de RNA e PCR em tempo real

Para a análise de expressão de RNAm foram utilizados 90 embriões de cada tratamento, em D7 ou D8, no estágio de Be. O RNA total foi extraído dos embriões com o uso de Trizol, conforme as recomendações do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada por densidade ótica utilizando espectrofotômetro NanoDrop (Thermo) em um comprimento de onda de 260 nm. O RNA total foi tratado com 1 U DNase (Promega, Madison, WI) a 37 °C por 30 minutos para que ocorresse a digestão de qualquer DNA contaminante, seguido de adição de 1 µl de EDTA stop buffer a 65 °C por 10 minutos. A reação de transcriptase reversa foi realizada com 1 µM oligo (dT) primer, e 4 U Omniscript RTase (Omniscript RT Kit, Qiagen, Mississauga, ON, Canada), 0,25 mM dideoxy- nucleotide triphosphate (dNTP) mix, e 19,33 U inibidor da RNase (GE Healthcare, Baie D'Urfé, QC) em de 20 µl a 42°C por 2 h. A reação foi finalizada com incubação a 93 °C por 5 min. PCR em tempo real foi utilizado para amplificar os genes referentes às enzimas acetil-CoA carboxilase (ACCa) e estearoil-CoA dessaturase (SCD1), e ao complexo enzimático ácido graxo sintase (FASN). O RNAm do gene alvo foi quantificado relativo à quantidade de RNAm da histona H2A (*housekeeping*). A quantidade de RNAm foi mensurada por PCR em tempo real em um

instrumento ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) com Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Parâmetros cíclicos termais (3 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C, e 30 seg a 72 °C) foram utilizados para amplificar cada transcrito. As curvas de *Melting* foram analisadas para verificar a identidade do produto. As amostras foram processadas em duplicatas e foram expressas relativas à histona H2A como gene *housekeeping*. O cálculo da expressão relativa foi realizado conforme preconizado por Pfaffl (2001). Primers específicos para bovinos foram projetados com o uso do Primer Express Software v 3.0 (Applied Biosystems) e sintetizados pela Invitrogen, sendo eles: ACCa forward – 5'-GAGTTCCTCCTCCCATCTACCA-3', ACCa reverse – 5'-AAGGTGCGTGAAGTCTTCCAA-3', SCD1 forward – 5'-TGGGAAGGGCCTTGATGAT-3', SCD1 reverse – 5'-ACACCATGCATGCTGACTCTCT-3', FASN forward – 5'-CGGTCGATTCCTGGAAATTG-3', FASN reverse – 5'-CAGTAGGATCCCGTGGAAAGTC-3'.

3.2.10 Análise estatística dos dados

As taxas de clivagem e de blastocistos foram submetidas à comparação pelo teste χ^2 (planilha Excel, Microsoft®), com nível de significância de 5%. Os valores da contagem celular foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Student (pacote estatístico Minitab®, State College, EUA), também com nível de significância de 5%. Os resultados da expressão de RNAm foram comparados por análise de variância (PROC GLM; General Linear Models Procedure). Foram utilizados como efeito principal os distintos tratamentos e como efeito ao acaso as diferentes replicações. Todas as variáveis contínuas foram testadas para normalidade com o auxílio do teste de Shapiro-Wilk e normalizadas quando necessário.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Experimento 1

A taxa de clivagem (Tabela 1) do grupo 50 CLA foi superior às dos grupos 100 CLA e 200 CLA, e o grupo Controle não diferiu de nenhum dos tratamentos. As taxas de blastocistos observadas em D7 nos grupos Controle, 50 CLA e 100 CLA não diferiram entre si, sendo superiores à do grupo 200 CLA.

Tabela 1. Taxas de clivagem e blastocistos de embriões bovinos PIV cultivados com diferentes concentrações (0 – controle, 50, 100 e 200 µM) de *t10*, *c12* CLA.

Grupo	Cultivados n	Taxa de clivagem		Taxa de blastocistos (D7)	
		n	%	n	%
Controle	983	752	76,5 ^{ab}	256	26,0 ^a
50 CLA	957	756	79,0 ^a	255	26,6 ^a
100 CLA	990	732	73,9 ^b	261	26,4 ^a
200 CLA	987	739	74,9 ^b	199	20,2 ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

3.3.2 Experimento 2

As taxas de clivagem (Tabela 2) foram similares em todos os grupos, variando de 79,7% (*c9*, *t11*) a 81,9% (*t10*, *c12*). As taxas de blastocistos variaram de 19,9% (*c9*, *t11*) a 23,1% (Mistura), não diferindo entre si.

Tabela 2. Taxas de clivagem e blastocistos de embriões bovinos PIV cultivados com 100 µM dos isômeros *t10*, *c12* CLA e *c9*, *t11* CLA, ou com uma mistura de ambos (50 µM + 50 µM).

Grupo	Cultivados n	Taxa de clivagem		Taxa de blastocistos (D7)	
		n	%	n	%
Controle	539	435	80,7	108	20,0
<i>t10</i> , <i>c12</i>	536	439	81,9	112	20,9
<i>c9</i> , <i>t11</i>	498	397	79,7	99	19,9
Mistura	558	447	80,1	129	23,1

$P > 0,05$ pelo teste χ^2 .

Nos embriões vitrificados no estágio de Bx, as taxas de re-expansão (Tabela 3) variaram de 73,1% a 85,4%, não havendo diferença entre elas ($p>0,05$). As taxas de eclosão não diferiram entre os tratamentos e o grupo controle, variando de 52,2% a 68,6%.

Tabela 3. Taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV cultivados com os isômeros *t10*, *c12* CLA, *c9*, *t11* CLA, ou com uma mistura de ambos, vitrificados no estágio de Bx.

Grupo	Embriões vitrificados n	Taxa de re-expansão		Taxa de eclosão	
		n	%	n	%
Controle Bx	48	41	85,4	28	58,3
<i>t10</i> , <i>c12</i> Bx	26	19	73,1	15	57,7
<i>c9</i> , <i>t11</i> Bx	35	28	80,0	24	68,6
Mistura Bx	46	36	78,3	24	52,2

$P > 0,05$ pelo teste χ^2 .

Quanto aos embriões vitrificados no estágio de Bl (Tabela 4), a maior taxa de re-expansão foi observada no grupo *t10*, *c12*, mas que não diferiu dos grupos Controle e *c9*, *t11*. O grupo Mistura apresentou taxa de re-expansão inferior à do grupo *t10*, *c12*, mas que não diferiu dos grupos Controle e *c9*, *t11*. A maior taxa de eclosão foi observada no grupo Controle, que foi superior ao grupo Mistura, mas similar aos grupos *c9*, *t11* e *t10*, *c12*. O grupo Mistura, entretanto, não diferiu dos grupos *c9*, *t11* e *t10*, *c12* ($p>0,05$).

Tabela 4. Taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV cultivados com os isômeros *t10*, *c12* CLA, *c9*, *t11* CLA, ou com uma mistura de ambos, vitrificados no estágio de Bl.

Grupo	Embriões vitrificados n	Taxa de re-expansão		Taxa de eclosão	
		n	%	n	%
Controle Bl	20	11	55,0 ^{ab}	8	40,0 ^a
<i>t10</i> , <i>c12</i> Bl	26	17	65,4 ^a	4	15,4 ^{ab}
<i>c9</i> , <i>t11</i> Bl	19	8	42,1 ^{ab}	4	21,1 ^{ab}
Mistura Bl	25	7	28,0 ^b	2	8,0 ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Na comparação de B1 e Bx em cada tratamento, os grupos Bx tiveram taxas de re-expansão superiores às dos grupos B1, exceto no tratamento *t10*, *c12*, no qual as taxas foram semelhantes. Quanto à taxa de eclosão, os grupos Bx também apresentaram taxas superiores aos B1, exceto no grupo Controle, onde as taxas foram similares.

3.3.3 Experimento 3

Nos embriões criopreservados no estágio de Bx, as taxas de re-expansão (Tabela 5) foram semelhantes nos grupos vitrificados. Foram superiores às taxas dos grupos submetidos ao congelamento, que também foram similares entre si. As taxas de eclosão seguiram o mesmo padrão, sendo os grupos vitrificados superiores e semelhantes, e os grupos congelados inferiores e semelhantes entre si.

Tabela 5. Taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV cultivados com *t10*, *c12* CLA e sem a adição de CLA, vitrificados ou submetidos ao congelamento convencional, no estágio de Bx.

Grupo	Embriões vitrificados		Taxa de re-expansão		Taxa de eclosão	
	n		n	%	n	%
Controle Bx Vitri	46		40	87,0 ^a	31	67,4 ^a
Controle Bx Cong	42		19	45,2 ^b	12	28,6 ^b
CLA Bx Vitri	38		33	86,8 ^a	25	65,8 ^a
CLA Bx Cong	30		11	36,7 ^b	4	13,3 ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Nos embriões submetidos à criopreservação no estágio de B1, os vitrificados apresentaram maior taxa de re-expansão (Tabela 6). As taxas dos grupos Controle B1 Cong e CLA B1 Cong foram inferiores e não diferiram entre si. Nas taxas de eclosão, entretanto, essa diferença desapareceu, e todos os grupos tiveram taxas semelhantes, variando de 10,3% (grupo CLA B1 Cong) a 27,3% (grupo CLA B1 Vitri).

Tabela 6. Taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV cultivados na presença de *t10, c12* CLA e sem a adição de CLA, vitrificados ou submetidos ao congelamento convencional, no estágio de B1.

Grupo	Embriões vitrificados		Taxa de re-expansão		Taxa de eclosão	
	n		n	%	n	%
Controle B1 Vitri	20		11	55,0 ^a	5	25,0 ^a
Controle B1 Cong	25		5	20,0 ^b	5	20,0 ^a
CLA B1 Vitri	22		16	72,7 ^a	6	27,3 ^a
CLA B1 Cong	29		7	24,1 ^b	3	10,3 ^a

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Embriões criopreservados nos estágios de B1 e Bx que receberam o mesmo tratamento foram comparados quanto à taxa de re-expansão. Nos embriões do grupo controle, tanto os vitrificados quanto os congelados, houve diferença significativa, sendo que os Bx apresentaram taxas superiores de re-expansão. Já nos grupos expostos ao CLA, não houve diferença, com B1 e Bx apresentando taxas semelhantes. Quanto às taxas de eclosão, houve diferença somente nos grupos vitrificados, expostos ou não ao CLA, com os Bx apresentando taxas superiores. Nos grupos congelados, expostos ou não ao CLA, as taxas foram similares ($p > 0,05$).

Foram comparadas ainda as taxas dos embriões criopreservados no mesmo estágio de desenvolvimento, submetidos à vitrificação ou ao congelamento convencional. Em todos os tratamentos, os grupos congelados apresentaram taxas de re-expansão inferiores aos grupos vitrificados ($p < 0,05$). Já nas taxas de eclosão, só houve diferença nos grupos criopreservados no estágio de Bx, sendo que os vitrificados apresentaram taxas superiores. Nos grupos criopreservados em B1, as taxas de eclosão foram semelhantes.

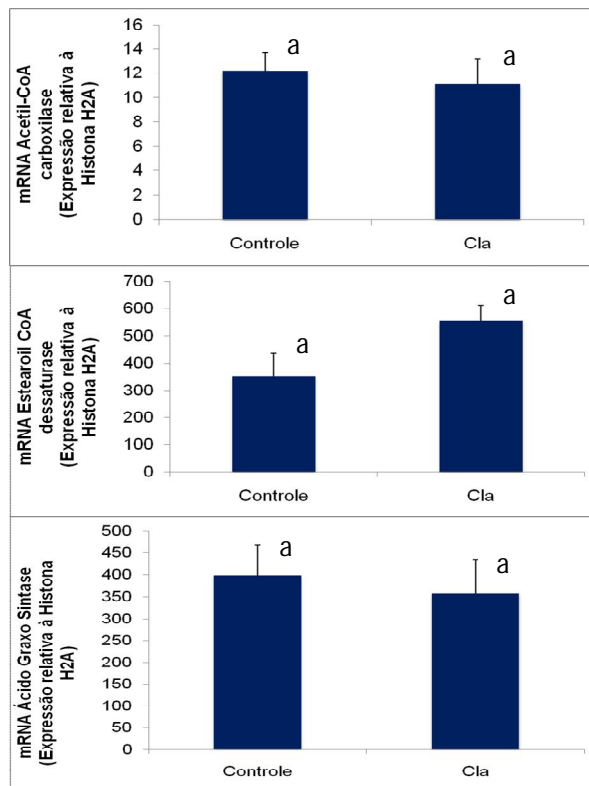
3.3.4 Estimativa do número de células dos blastocistos

O número médio de células dos embriões tratados com *t10, c12* CLA foi $87,4 \pm 27$, não diferindo do grupo controle sem CLA, que apresentou $88,8 \pm 21,9$ células. Foi observado

que o *t10*, *c12* CLA não altera a quantidade de células, mesmo em embriões de diferentes estágios.

3.3.5 Expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN

Foi analisado o efeito do tratamento com CLA sobre a expressão de RNAm de 3 enzimas sabidamente importantes na síntese de ácidos graxos, ACCa, SCD1 e FASN. Não foi observada diferença significativa entre o grupo tratado com *t10*, *c12* CLA e o grupo controle em nenhum dos três genes analisados (Figura 1).



$P > 0,05$ pelo teste χ^2 .

Figura 1. Quantidade de RNAm referente às enzimas ACCa, SCD1 e FASN em embriões bovinos PIV, tratados ou não com *trans-10*, *cis-12* CLA.

3.4 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, as pesquisas têm buscado o aumento das taxas de sobrevivência após a criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, principalmente na espécie bovina. Embora a vitrificação tenha sido a técnica mais estudada para estas estruturas, foi demonstrado que o aumento da velocidade de resfriamento e reaquecimento não melhora a sobrevivência embrionária (WERLICH et al., 2006). Diferentes alternativas, como o uso de nitrogênio super-resfriado (WERLICH et al., 2006), de estabilizadores do citoesqueleto (DOBRINSKY et al., 1995), de diferentes crioprotetores e volumes reduzidos dessas substâncias não proporcionaram incremento significativo da viabilidade embrionária após o reaquecimento. Da mesma forma, foi demonstrado que embriões de diferentes idades apresentam comportamento distinto na vitrificação (MEZZALIRA et al., 2004). Estes fatores, em conjunto, determinaram que nos últimos anos os resultados da criopreservação de embriões PIV tenham permanecido estagnados em patamares que não permitem sua utilização rotineira.

Evidências indicam que para embriões bovinos PIV, ao invés de se buscar a adequação do protocolo de criopreservação, seria mais produtivo a adequação da produção destas estruturas, buscando reduzir as diferenças existentes com os embriões produzidos *in vivo*. Dessas diferenças, amplamente investigadas, o acúmulo excessivo de lipídeos nos embriões PIV é apontado como causa das alterações celulares no processo de criopreservação, o que reduz a taxa de sobrevivência embrionária, após o reaquecimento.

Uma forma de se produzir embriões *in vitro* com maior semelhança aos gerados *in vivo* seria reduzir o seu teor lipídico. O isômero *t10, c12* CLA é capaz de reduzir a quantidade de lipídeos em diferentes tecidos em diversas espécies animais e também em humanos,

diminuindo a expressão de RNAm e a atividade de enzimas que desempenham importante papel no metabolismo lipídico, principalmente na síntese *de novo* de ácidos graxos. A enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) e o complexo ácido graxo sintase (FAS), por exemplo, atuam na composição da cadeia de ácidos graxos, e tiveram a expressão de RNAm intensamente reduzida pelo *t10, c12* CLA em tecido adiposo e de glândula mamária (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2000; BAUMGARD et al., 2002; CORL et al., 2008; KADEGOWDA et al., 2010). A enzima estearoil-CoA dessaturase (SCD) age na síntese de ácidos graxos monoinsaturados, introduzindo uma ligação dupla em ácidos graxos saturados. O *t10, c12* CLA não só diminui a expressão de RNAm da SCD (LEE et al., 1998; CHOI et al., 2000; BAUMGARD et al., 2002) como também inibe diretamente a atividade dessa enzima (BRETILLON et al., 1999; PARK et al., 2000). O *t10, c12* CLA diminui ainda a expressão de RNAm de enzimas relacionadas à síntese de TAG, como a glicerol fosfato aciltransferase (GPAT) e a acilglicerol fosfato aciltransferase (AGPAT), reduzindo em alto grau a quantidade de lipídeos nos tecidos. Desta forma, a adição de *t10, c12* CLA poderia potencialmente reduzir o teor lipídico dos embriões.

Todavia, em função da escassez de estudos relacionados à utilização do CLA em embriões, é necessária a determinação da concentração máxima a ser empregada sem o decréscimo da viabilidade embrionária. O Experimento 1 demonstrou que concentrações de até 100 μM de *t10, c12* CLA não afetam a taxa de blastocistos, em relação ao grupo controle sem CLA. Estes resultados são consistentes com as observações de Pereira et al. (2007, 2008), que suplementaram com 100 μM de *t10, c12* CLA o meio de cultivo de embriões bovinos. Já a concentração de 200 μM determinou uma redução da taxa de blastocistos, em relação ao grupo controle. Darwich et al. (2010) observaram uma diminuição da taxa de blastocistos em D7 do grupo cultivado com 100 μM de *t10, c12* CLA (16,0%) em relação ao grupo controle

(26,4%), que todavia desapareceu na avaliação de D8. Os resultados obtidos no Experimento 1 permitiram considerar a concentração de 100 μM de *t10, c12* CLA como padrão para os demais estudos, sendo extrapolada esta concentração também para o isômero *c9, t11* CLA.

No Experimento 2, os embriões foram cultivados com 100 μM dos isômeros *t10, c12* CLA ou *c9, t11* CLA, ou ainda, com uma mistura de ambos (50 μM + 50 μM). Confirmando os dados obtidos no Experimento 1, não foi observado efeito negativo dos isômeros individuais, nem tampouco da associação dos mesmos (Tabela 2). A idêntica densidade celular verificada nos embriões do grupo controle ($88,8 \pm 21,9$) e dos tratados com *t10, c12* CLA ($87,4 \pm 27$), também evidenciam a ausência de qualquer influência negativa dos isômeros testados. Os embriões no estágio de Bx submetidos ao processo de vitrificação proporcionaram taxas de re-expansão e eclosão semelhantes nos distintos tratamentos, demonstrando não haver aumento da criotolerância em função da adição dos distintos isômeros do CLA. Estes dados estão em desacordo com as observações de Pereira et al. (2008), que observaram um aumento da criotolerância em embriões cultivados com *t10, c12* CLA, submetidos à vitrificação. Darwich et al. (2010) também não observaram diferença significativa na criotolerância de embriões cultivados com ou sem *t10, c12* CLA, tanto em embriões vitrificados em D7 quanto em embriões vitrificados em D8.

Embora não se tenha observado efeito da adição de CLA, cabe ressaltar que foi observado um comportamento distinto entre os estágios de desenvolvimento embrionário Bx e Bl, confirmando as observações de Mezzalana et al. (2004), que também observaram um comportamento distinto na vitrificação com embriões de diferentes idades. Os embriões no estágio de Bl foram menos criotolerantes em relação ao estágio de Bx, fato também observado por Vajta et al (1996) e Morató et al. (2010). Além disso, com os embriões no estágio de Bl foi observado um efeito deletério da adição de 50 μM de cada um dos isômeros, *t10, c12* CLA

ou *c9, t11* CLA, com acentuada redução da taxa de eclosão (8%) em relação ao grupo controle (40%).

Sabe-se que embriões com excesso de lipídeos, principalmente os cultivados com soro, apresentam coloração mais escura quando comparados a embriões produzidos *in vivo* (THOMPSON, 1997; ABE et al., 1999). Desta forma, seria esperado que os embriões cultivados com o isômero *t10, c12* CLA apresentassem menor concentração de lipídeos e, por consequência, uma coloração mais clara do que os embriões do grupo controle. Contudo, os embriões cultivados com ambos os isômeros do CLA se mostraram mais escuros do que os embriões cultivados sem CLA.

Quando submetidos à curva de congelamento, tanto os embriões do grupo controle quanto os expostos ao *t10, c12* CLA apresentaram taxas de eclosão extremamente baixas comparados aos grupos vitrificados. No momento do descongelamento foi frequente a observação de embriões sem zona pelúcida ou com a zona rompida, e até mesmo de embriões partidos ao meio, o que foi raramente observado no momento do reaquecimento dos embriões vitrificados. Estes resultados também estão em discordância com os resultados apresentados por Pereira et al. (2007), que reportaram boas taxas de sobrevivência embrionária após a curva de congelamento em embriões cultivados com o *t10, c12* CLA.

Não foi verificada variação na quantidade de RNAm referente às enzimas ACCa, SCD1 e FASN em embriões bovinos PIV tratados com *trans-10, cis-12* CLA. Estes dados indicam que o cultivo dos embriões com 100 µM do isômero *t10, c12* CLA não foi capaz de alterar o metabolismo lipídico destas estruturas. Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* em diferentes espécies mostram que o *t10, c12* CLA é capaz de diminuir a expressão de RNAm da enzima SCD em vários tecidos, em até 75% (LEE et al., 1998; CHOI et al., 2000;

BAUMGARD et al., 2002). Em experimento com embriões bovinos PIV, Darwich (2010) observou que o *t10, c12* CLA aumentou a expressão da SCD em relação ao grupo controle, cultivado em mSOF e 5% SFB. Os dados destes estudos possibilitam inferir que o *t10, c12* CLA atua de forma distinta nas células embrionárias.

Em estudos com células somáticas, o *t10, c12* CLA foi capaz de diminuir a expressão de RNAm das enzimas ACC (TSUBOYAMA-KASAOKA et al., 2000; ZABALA et al., 2006; CORL et al., 2008) e FAS (BAUMGARD et al., 2002; DONNELLY et al., 2009; KADEGOWDA et al., 2010), em até 72 e 88%, respectivamente.

Desta forma, mais estudos são necessários para determinar se o CLA atua no metabolismo lipídico de células embrionárias e quais seus possíveis mecanismos. Estudos referentes ao efeito do *t10, c12* CLA nas enzimas ACCa, SCD1 e FASN em células embrionárias devem ser estimulados, bem como relativos ao efeito deste isômero em outras enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico em embriões.

3.5 CONCLUSÕES

Com base neste estudo, pode-se concluir que a adição de concentrações de até 100 µM dos isômeros *trans-10, cis-12* e *cis-9, trans-11* CLA ao meio de cultivo de embriões PIV não afeta o posterior desenvolvimento embrionário. Pode-se concluir também que, nas condições deste experimento, a adição destes isômeros não melhora a criotolerância de embriões bovinos PIV, e o isômero *trans-10, cis-12* CLA não altera a expressão de RNAm das enzimas ACCa, SCD1 e FASN destes embriões.

3.6 REFERÊNCIAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 325-335, 1999.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmatic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free medium or in serum-containing medium. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 61, p. 57-66, 2002.

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

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

CHO, S. R.; CHO, S. K.; LEE, S. R. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced *in vitro* in serum-free medium. **J. Assit. Reprod. Genet.**, v. 19, p. 487-492, 2002.

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.

CORL, B. A.; OLIVER, S. A. M.; LIN, X.; OLIVER, W. T.; MA, Y.; HARRELL, R. J.; ODLE, J. Conjugated linoleic acid reduces body fat accretion and lipogenic gene expression in neonatal pigs fed low- or high-fat formulas. **J. Nutr.**, v. 138, p. 449-454, 2008.

DARWICH, A. A.; PERREAU, C.; PETIT, M. H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, 2010. In press.

DIEZ, C.; HUYSMAN, Y.; Le BOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J. P. Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: Effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v. 55, p. 923-936, 2001.

DOBRINSKY, J. R.; OVERSTROM, E. W.; DUBY, R. T.; JOHNSON, L. A.; DUFFY, P.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Effect of cytoskeletal stabilization on the development of bovine embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology**, v. 43, p. 199, 1995. Abstract.

DONNELLY, C.; OLSEN, A. M.; LEWIS, L. D.; EISENBERG, B. L.; EASTMAN, A.; KINLAW, W. B. Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits expression of the Spot 14 (THRSP) and Fatty Acid Synthase genes and impairs the growth of human breast cancer and liposarcoma cells. **Nutrition and Cancer**, v. 61(1), p. 114–122, 2009.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J. N.; HIDALGO, J. N.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v. 69, p. 1013-1021, 2008.

GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 1117–1126, 2001.

KADEGOWDA, A. K. G.; CONNOR, E. E.; TETER, B. B.; SAMPUGNA, J.; DELMONTE, P.; PIPEROVA, L. S.; ERDMAN, R. A. Dietary trans fatty acid isomers differ in their effects on mammary lipid metabolism as well as lipogenic gene expression in lactating mice. **J. Nutr.**, v. 140, p. 919-924, 2010.

LEE, K. N.; PARIZA, M. W.; NTAMBI, J. M. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 248, p. 817-821, 1998.

LEIBO, P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 81-94, 1993.

LOOR, J. J.; HERBEIN, J. H. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. **J. Nutr.**, v. 128, p. 2411-2419, 1998.

MEZZALIRA, A.; MEZZALIRA, J. C.; MORAES, A. N.; THALER NETO, A.; VIEIRA, A. D.; BARRETA, M. H.; DAMIANI, J. Vitrification of bovine IVP embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. **Arch. Vet. Sci.**, v. 9, p. 107-111, 2004.

MOHR, L. R.; TROUNSON, A. O. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 25, p. 1009-1025, 1981.

MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reprod Fertil Dev.**, v. 22, p. 1141-7, 2010.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R. J.; GRUPEN, C. G.; SEAMARK, R. F.; NOTTLE, M. B. Removal of cytoplasmic lipids enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. **Biol. Reprod.**, v. 51, p. 618-622, 1994.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, R. J.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Successful cryopreservation of porcine early cleavage stage embryos following removal of cytoplasmic lipid. **Theriogenology**, v. 43, p. 285, 1995.

NAGASHIMA, H.; KUWAYAMA, M.; GRUPEN, C. G.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. **Theriogenology**, v. 45, p. 180, 1996.

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

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

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). **Anim. Reprod. Sci.**, 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. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 106, p. 322–332, 2008.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

POLLARD, J. W.; LEIBO, P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 107–112, 1994.

THOMPSON, J. G. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 9, p. 341-354, 1997.

TROUNSON, A. O.; WILLADSEN, S. M.; ROWSON, L. E. A.; NEWCOMB, R. The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. **J. Reprod. Fertil.**, v. 46, p. 173-178, 1976.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; TANEMURA, K.; KIM, H.; TANGE, T.; OKUYAMA, H.; KASAI, M.; IKEMOTO, S.; EZAKI, O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, v. 49, p. 1534-1542, 2000.

USHIJIMA, H.; YAMAKAWA, H.; NAGASHIMA, H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 535-539, 1999.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, n. 3, p. 191-200, 1996.

WERLICH, D. E.; BARRETA, M. H.; MARTINS, L. T.; VIEIRA, A. D.; MORAES, A. N.; MEZZALIRA, A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Act. Sci. Vet.**, v. 34, p. 77-82, 2006.

YAMASHITA, S.; ABE, H.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. **Cytotechnology**, v. 31, p. 121–129, 1999.

ZABALA, A.; CHURRUCA, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; RODRÍGUEZ, V. M.; MACARULLA, M. T.; MARTÍNEZ, J. A.; PORTILLO, M. P. *trans-10,cis-12* Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. **British Journal of Nutrition**, v. 95, p. 1112–1119, 2006.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free or in serum-supplemented medium. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 325-335, 1999.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmatic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free medium or in serum-containing medium. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 61, p. 57–66, 2002.

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

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; SAEBØ, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v. 278, p. 179-184, 2000.

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

BAVISTER, B. D. Culture of pre-implantation embryos: facts and artefacts. **Human Reproduction Update**, v. 1, p. 91–148, 1995.

BEE, G. Dietary conjugated linoleic acid consumption during pregnancy and lactation influences growth and tissue composition in weaned pigs. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2981-2989, 2000.

BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J. A.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. **J. Nutr.**, v. 130, p. 2943–2948, 2000.

BOCCA, C.; BOZZO, F.; CANNITO, S.; COLOMBATTO, S.; MIGLIETTA, A. CLA reduces breast cancer cell growth and invasion through ER α and PI3K/Akt pathways. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, p. 187–193, 2010.

BONI, R.; TOSTI, E.; ROVIELLO, S.; DALE, B. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 1050–1055, 1999.

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

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

BROWN, J. M.; HALVORSEN, Y. D.; LEA-CURRIE, Y. R.; GEIGERMAN, C.; McINTOSH, M. *Trans*-10, *cis*-12, but not *cis*-9, *trans*-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. **J. Nutr.**, v. 131, p. 2316–2321, 2001a.

BROWN, J.; LEA-CURRIE, Y.; SEN, A.; MCINTOSH, M. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid suppress fatty acid incorporation into lipid in cultures of human preadipocytes. **Obesity Res.**, v. 9, p. 142, 2001b.

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

CHIN, S. F.; STORKSON, J. M.; ALBRIGHT, K. J.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. **J. Nutr.**, v. 124, p. 2344–2349, 1994.

CHO, S. R.; CHO, S. K.; LEE, S. R. Enhanced cryosurvival of bovine blastocysts produced *in vitro* in serum-free medium. **J. Assit. Reprod. Genet.**, v. 19, p. 487–492, 2002.

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.

CHOUINARD, P. Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D. M.; METZGER, L. E.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. **J. Nutr.**, v. 129, p. 1579–1584, 1999.

CORL, B. A.; OLIVER, S. A. M.; LIN, X.; OLIVER, W. T.; MA, Y.; HARRELL, R. J.; ODLE, J. Conjugated linoleic acid reduces body fat accretion and lipogenic gene expression in neonatal pigs fed low- or high-fat formulas. **J. Nutr.**, v. 138, p. 449–454, 2008.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1459–1365, 2000.

DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I. G. The effect of cold-shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 26, p. 1409- 1420, 1973.

DARWICH, A. A.; PERREAU, C.; PETIT, M. H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, 2010. In press.

DE VETH, M. J.; BAUMAN, D. E.; KOCH, W.; MANN, G. E.; PFEIFFER, A. M.; BUTLER, W. R. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: A multi-study analysis in early-lactation dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 92, p. 2662–2669, 2009.

DeLANY, J. P.; BLOHM, F.; TRUETT, A. A.; SCIMECA, J. A.; WEST, D. B. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. 1172-1179, 1999.

DIEZ, C.; HUYPAN, Y.; Le BOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J. P. Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: Effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v. 55, p. 923-936, 2001.

DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v. 45, p. 17-26, 1996.

DOBRINSKY, J. R.; OVERSTROM, E. W.; DUBY, R. T.; JOHNSON, L. A.; DUFFY, P.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P. Effect of cytoskeletal stabilization on the development of bovine embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology**, v. 43, p. 199, 1995. Abstract.

DONNELLY, C.; OLSEN, A. M.; LEWIS, L. D.; EISENBERG, B. L.; EASTMAN, A.; KINLAW, W. B. Conjugated linoleic acid (CLA) inhibits expression of the Spot 14 (THRSP) and Fatty Acid Synthase genes and impairs the growth of human breast cancer and liposarcoma cells. **Nutrition and Cancer**, v. 61(1), p. 114–122, 2009.

DORLAND, M.; GARDNER, D. K.; TROUNSON, A. O. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. **J. Reprod. Fertil.** (Abst Ser) v. 13, p. 25, 1994.

DROBNIS, E. Z.; CROWE, L. M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. J.; OVERSTREET, J. W.; CROWE, J. H. Cold shock damage is due to lipid phase-transitions in cell-membranes - A demonstration using sperm as a model. **J. Exp. Zool.**, v. 265, p. 432-437, 1993.

DUBY, R. T.; HILL, J. L.; O'CALLAGHAN, D.; OVERSTROM, E. W.; BOLAND, M. P. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. **Theriogenology**, v. 47, p. 332, 1997.

ECKERT, J.; NIEMANN, H. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, v. 43, p. 1211–1225, 1995.

EDIDIN, M.; PETIT, V. A. The effect of temperature on the lateral diffusion of plasma membrane protein. Em: Elliott K., Whelan J. (eds.), **The Freezing of Mammalian Embryos**. Amsterdam: Elsevier, Excerpta Medica; p. 155-174, 1977.

EVANS, M.; GEIGERMAN, C.; COOK, J.; CURTIS, L.; KUEBLER, B.; McINTOSH, M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. **Lipids**, v. 35, p. 899-910, 2000.

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

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D. C.; HYTTEL, P.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of embryo production. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 58, p. 186–195, 2001.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v. 116, p. 373-378, 1999.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; SPITZER, A.; BATT, P. A. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 390-400, 1994.

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

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J. N.; HIDALGO, J. N.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v. 69, p. 1013-1021, 2008.

GUDBRANDSEN, O. A.; RODRÍGUEZ, E.; WERGEDAHL, H.; MØRK, S.; RESELAND, J. E.; SKORVE, J.; PALOU, A.; BERGE, R. K. Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid reduces the hepatic triacylglycerol content and the leptin mRNA level in adipose tissue in obese Zucker fa/fa rats. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 803–815, 2009.

GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 1117–1126, 2001.

HA Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1881-1887, 1987.

HAYASHI, A. A.; MEDEIROS, S. R.; CARVALHO, M. H.; LANNA, D. P. D. Conjugated linoleic acid (CLA) effects on pups growth, milk composition and lipogenic enzymes in lactating rats. **J. Dairy Res.**, v. 74, p. 160-166, 2007.

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

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. **Theriogenology**, v. 52, p. 497-504, 1999.

HOUSE, R. L.; CASSADY, J. P.; EISEN, E. J.; ELING, T. E.; COLLINS, J. B.; GRISSOM, S. F.; ODLE, J. Functional genomic characterization of delipidation elicited by *trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid (t10c12-CLA) in a polygenic obese line of mice. **Physiol Genomics**, v. 21, p. 351-361, 2005.

HOUSEKNECHT, K. L.; VANDEN HEUVEL, J. P.; MOYA-CAMARENA, S. Y.; PORTOCARRERO, C. P.; PECK, L. W.; NICKEL, K. P.; BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 244, p. 678-682, 1998.

HYTTEL, P.; NIEMANN, H. Ultrastructure of porcine embryos following development in vitro versus in vivo. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 27, p. 136-144, 1990.

IP, C.; CHIN, S. F.; SCIMECA, J. A.; PARIZA, M. W. Mammary Cancer Prevention by Conjugated Dienoic Derivative of Linoleic Acid. **Cancer Research**, v. 51, p. 6118-6124, 1991.

ISACHENKO, V.; SOLER, C.; ISACHENKO, E.; PEREZ-SANCHEZ, F.; GRISHCHENKO, V. Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 36, p. 250-253. 1998.

KADEGOWDA, A. K. G.; CONNOR, E. E.; TETER, B. B.; SAMPUGNA, J.; DELMONTE, P.; PIPEROVA, L. S.; ERDMAN, R. A. Dietary trans fatty acid isomers differ in their effects on mammary lipid metabolism as well as lipogenic gene expression in lactating mice. **J. Nutr.**, v. 140, p. 919-924, 2010.

KEPLER, C. R.; HIRONS, K. P.; McNEILL, J. J.; TOVE, S. B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **J. Biol. Chem.**, v. 241, p. 1350-1354, 1966.

KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S. A.; WRIGHT, S.; TSO, P.; CZARNECKI, S. K. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 472-477, 2000.

LARSEN, T. M.; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. **J. Lipid Res.**, v. 44, p. 2234-2241, 2003.

LEE, A.G. Functional properties of biological membranes: A physical chemical approach. **Progr. Biophys. Molec. Biol.**, v. 29, p. 3-56, 1975.

LEE, K. N.; PARIZA, M. W.; NTAMBI, J. M. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 248, p. 817-821, 1998.

LEIBO, P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, p. 81-94, 1993.

LOOR, J. J.; HERBEIN, J. H. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. **J. Nutr.**, v. 128, p. 2411-2419, 1998.

LOOR, J. J.; LIN, X.; HERBEIN, J. H. Effects of dietary cis 9, trans 11-18 : 2, trans 10, cis 12-18 : 2, or vaccenic acid (trans 11-18 : 1) during lactation on body composition, tissue fatty acid profiles, and litter growth in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 90, 1039-1048, 2003.

MALPUECH-BRUGÈRE, C.; VERBOEKET-VAN de VENNE, W. P.; MENSINK, R. P.; ARNAL, M. A.; MORIO, B.; BRANDOLINI, M.; SAEBO, A.; LASSEL, T. S.; CHARDIGNY, J. M.; SEBEDIO, J. L.; BEAUFRERE, B. Effects of two conjugated linoleic acid isomers on body fat mass in overweight humans. **Obes. Res.**, v. 12, p. 591-598, 2004.

MASTERS, N.; MCGUIRE, M. A.; BEERMAN, K. A.; DASGUPTA, N.; MCGUIRE, M. K. Maternal supplementation with CLA decreases milk fat in humans. **Lipids**, v. 37, p. 133-138, 2002.

McEVOY, T. G.; COULL, G. D.; BROADBENT, P. J.; HUTCHINSON, J. S. M.; 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.

MEZZALIRA, A.; MEZZALIRA, J. C.; MORAES, A. N.; THALER NETO, A.; VIEIRA, A. D.; BARRETA, M. H.; DAMIANI, J. Vitrification of bovine IVP embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. **Arch. Vet. Sci.**, v. 9, p. 107-111, 2004.

MILLER, C.; PARK, Y.; PARIZA, M.; COOK, M. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 198, p. 1107–1112, 1994.

MITCHELL, P. L.; McLEOD, R. S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. **Biochem. Cell Biol.**, v. 86, p. 293–301, 2008.

MOHR, L. R.; TROUNSON, A. O. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 25, p. 1009-1025, 1981.

MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reprod Fertil Dev.**, v. 22, p. 1141-7, 2010.

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

MURPHY, E. F.; HOOIVELD, G. J.; MÜLLER, M.; CALOGERO, R. A.; CASHMAN, K. D. The effect of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on gene expression profiles related to lipid metabolism in human intestinal-like Caco-2 cells. **Genes Nutr.**, v. 4, p. 103–112, 2009.

NAGASHIMA, H.; KATO, Y.; YAMAKAWA, H.; HATSUMOTO, T.; OGAWA, S. Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stage. **Jpn. J. Anim. Reprod.**, v. 2, p. 130-134, 1989.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R. J.; GRUPEN, C. G.; SEAMARK, R. F.; NOTTLE, M. B. Removal of cytoplasmic lipids enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. **Biol. Reprod.**, v. 51, p. 618-622, 1994.

NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, R. J.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Successful cryopreservation of porcine early cleavage stage embryos following removal of cytoplasmic lipid. **Theriogenology**, v. 43, p. 285, 1995.

NAGASHIMA, H.; KUWAYAMA, M.; GRUPEN, C. G.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. **Theriogenology**, v. 45, p. 180, 1996.

NIIMURA, S.; ISHIDA, K. Histochemical observation of lipid droplets in mammalian eggs during the early development. **Jpn. J. Anim. Reprod.**, v. 26, p. 46-49, 1980.

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

OSTROWSKA, E.; MURALITHARAN, M.; CROSS, R.; BAUMAN, D.; DUNSHEA, F. Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs, **J. Nutr.**, v. 129, p. 2037-2042, 1999.

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

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

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

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

PARODI, P. W. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. **J. Dairy Sci.**, v. 60, p. 1550–1553, 1977.

PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E. M.; PORTUGAL, P. V.; BESSA, R. J. B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C. C. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid (10*t*, 12*c* CLA). **Anim. Reprod. Sci.**, 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 *trans*10, *cis*12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 106, p. 322–332, 2008.

PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A.; BAUMAN, D. E. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. **J. Nutr.**, v. 133, p. 3098–3102, 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PLANTE, L.; KING, W. A. Light and electron microscopic analysis of bovine embryos derived by *in vitro* and *in vivo* fertilization. **J. Assit. Reprod. Genet.**, v. 11, p. 515–529, 1994.

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

POLLARD, J. W.; LEIBO, P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 107–112, 1994.

PUGH, P. A.; ANKERSMIT, A. E. L.; MCGOWAN, L. T.; TERVIT, H. R. Cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos: Effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. **Theriogenology**, v. 50, p. 495–506, 1998.

RAHMAN, S. M.; WANG, Y.; YOTSUMOTO, H.; CHA, J.; HAN, S.; INOUE, S.; YANAGITA, T. Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and β -oxidation of fatty acid in OLETF rats. **Nutrition**, v. 17, p. 385–390, 2001.

REIS, A.; ROOKE, J. A.; McCALLUM, G. J.; STAINES, M. E.; EWEN, M.; LOMAX, M. A.; McEVOY, T. G. Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 15, p. 275–284, 2003.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol. Reprod.**, v. 68; p. 236-243, 2003.

RYDER, J. W.; PORTOCARRERO, C. P.; SONG, X. M.; CUI, L.; YU, M.; COMBATSIARIS, T.; GALUSKA, D.; BAUMAN, D. E.; BARBANO, D. M.; CHARRON, M. J.; ZIERATH, J. R.; HOUSEKNECHT, K. L. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid: Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. **Diabetes**, v. 50, p. 1149– 1157, 2001.

SAKANO, M.; MIYANAGA, F.; KAWAHARA, S.; YAMAUCHI, K.; FUKUDA, N.; WANTABE, K.; IWATA, T.; SUGANO, M. Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies ketogenesis and lipid secretion by the rat liver. **Lipids**, v. 34, p. 997–1000, 1999.

SATA, R.; TSUJII, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum containing medium during early embryonic development. **J. Reprod. Dev.**, v. 45, p. 97–103, 1999.

SHINGFIELD, K. J.; ROUEL, J.; CHILLIARD, Y. Effect of calcium salts of a mixture of conjugated linoleic acids containing trans-10, cis-12 in the diet on milk fat synthesis in goats. **British Journal of Nutrition**, v. 101, p. 1006–1019, 2009.

SINCLAIR, K. D.; McEVOY, T. G.; CAROLAN, C.; MAXFIELD, E. K.; MALTIN, C. A.; YOUNG, L. E.; WILMUT, I.; ROBINSON, J. J.; BROADBENT, P. J. Conceptus growth and development following in vitro culture of ovine embryos in media supplemented with bovine sera. **Theriogenology**, v. 49, p. 218, 1998.

SINCLAIR, L. A.; LOCK, A. L.; EARLY, R.; BAUMAN, D. E. Effects of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on ovine milk fat synthesis and cheese properties. **J. Dairy Sci.**, v. 90, p. 3326–3335, 2007.

SPECTOR, A. A. Fatty acid, glyceride, and phospholipid metabolism. Em: Rothblat G. H., Cristofalo V. J. (eds). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic Press., p. 257–296, 1973.

STUBBS, C. D.; SMITH, A. D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 779, p. 89-137, 1984.

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

THOM, E.; WADSTEIN, J.; GUDMUNDSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. **Journal of International Medical Research**, v. 29, p. 392-396, 2001.

THOMPSON, J. G.; GARDNER, D. K.; PUGH, P. A; McMILLAN, W. H.; TERVIT, H. R. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 53, p. 1385–1391, 1995.

THOMPSON, J. G. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 9, p. 341-354, 1997.

TROUNSON, A. O.; WILLADSEN, S. M.; ROWSON, L. E. A.; NEWCOMB, R. The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. **J. Reprod. Fertil.**, v. 46, p. 173-178, 1976.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; TANEMURA, K.; KIM, H.; TANGE, T.; OKUYAMA, H.; KASAI, M.; IKEMOTO, S.; EZAKI, O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, v. 49, p. 1534-1542, 2000.

TSUJII, H.; KHANDOKER, M. A. M. Y.; HAMANO, K. Lipid in mammalian embryo development. **J. Mamm. Ova Res.**, v. 18, p. 73-80, 2001.

USHIJIMA, H.; YAMAKAWA, H.; NAGASHIMA, H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 535-539, 1999.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.; DE KRUIF, A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 47, p. 47-56, 1997.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, n. 3, p. 191-200, 1996.

WERLICH, D. E.; BARRETA, M. H.; MARTINS, L. T.; VIEIRA, A. D.; MORAES, A. N.; MEZZALIRA, A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Act. Sci. Vet.**, v. 34, p. 77-82, 2006.

WEST, D. B.; DELANY, J. P.; CAMET, P. M.; BLOHM, F.; TRUETT, A. A.; SCIMECA, J. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 667-672, 1998.

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

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C e -269°C. **Science**, v. 178, p. 411-414, 1972.

WOLFE, J; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v. 39, p. 103-129, 1999.

XU, X.; STORKSON, J.; KIM, S.; SUGIMOTO, K.; PARK, Y.; PARIZA, M. W. Short-term intake of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue. **J. Nutr.**, v. 133, p. 663-667, 2003.

YAMASHITA, S.; ABE, H.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. **Cytotechnology**, v. 31, p. 121-129, 1999.

YANG, M.; COOK, M. E. Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- α production, and modifies splenocyte cytokines production. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, p. 51-58, 2003.

YOUNGS, C. R.; KNIGHT, T. J.; BATT, S. M.; BEITZ, D. C. Phospholipid, cholesterol, triacylglycerol and fatty acid composition of porcine blastocysts. **Theriogenology**, v. 41, p. 343, 1994.

ZABALA, A.; CHURRUCA, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; RODRÍGUEZ, V. M.; MACARULLA, M. T.; MARTÍNEZ, J. A.; PORTILLO, M. P. *trans-10,cis-12* Conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase but increases the activity of lipogenic enzymes in adipose tissue from hamsters fed an atherogenic diet. **British Journal of Nutrition**, v. 95, p. 1112–1119, 2006.