

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista

**EFEITO DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO *TRANS-10, CIS-12* NA
REGULAÇÃO DO ACÚMULO DE LÍPIDES E EXPRESSÃO GÊNICA EM
EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO***

Juiz de Fora

2010

RIBRIO IVAN TAVARES PEREIRA BATISTA

**EFEITO DO ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO *TRANS-10, CIS-12* NA
REGULAÇÃO DO ACÚMULO DE LÍPIDES E EXPRESSÃO GÊNICA EM
EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo

Co-Orientador: Dr. João Henrique Moreira Viana

Juiz de Fora

2010

Batista, Ribrio Ivan Tavares Pereira.

Efeito do ácido linoléico conjugado TRANS-10, CIS-12 na regulação do acúmulo de lipídes e expressão gênica em embriões produzidos *in vitro* / Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista. – 2010.
195 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Frio – Uso terapêutico. 2. Embriologia. I. Título. |

CDU 615.832.9

Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista

Efeito do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* na regulação do acúmulo de lípidos e expressão gênica em embriões produzidos *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: 26/02/2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. João Henrique Moreira Viana (Co-orientador)
Embrapa Gado de Leite

Dr. Raúl Marcel González Garcia
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dedico á todos que me
acompanharam nessa jornada.*

AGRADECIMENTOS

À Embrapa por todas as oportunidades oferecidas na minha graduação e pós-graduação.

À Laboratório de Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo uso do microscópio.

À FAPEMIG pela bolsa de estudos e subsídios para o desenvolvimento do projeto.

À Professora Nádia, pela orientação, confiança e competência.

Ao Dr. João Henrique pela co-orientação, longo período de ensinamento, incentivos, convivência, inspiração e amizade.

Ao Dr. Luiz Sérgio, pelo incentivo, amizade e oportunidades oferecidas.

Aos funcionários do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite Carol, Joel e Miro pela amizade e ajuda na execução do trabalho.

Aos Doutores Gama e Bruno pela ajuda durante o todo o período do desenvolvimento do trabalho, esclarecimentos e sugestões.

À Dra. Lilian pela ajuda pessoal e profissional

A todos os companheiros do Laboratório de Reprodução Animal – Alberto, Carol, Eliza, Fabíola, Fernanda, Michele, Paulo, Raquel e Sabine pelo apoio, amizade, intercambio das idéias e ajuda na execução do trabalho especialmente Michele e Paulo.

Aos meus familiares que sempre acreditaram em mim e me deram apoio em todos os momentos.

Muito Obrigado !!!

RESUMO

A suplementação do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-10* no meio de cultivo, representa uma importante alternativa para aumento da sobrevivência dos embriões após a criopreservação. No entanto este isômero de CLA no cultivo *in vitro* sem antioxidante pode aumentar a taxa apoptótica. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição CLA *trans-10, cis-12* no cultivo *in vitro* de embriões sem antioxidante. Zigotos bovinos (n = 1.694) foram divididos em dois tratamentos: (T1) grupo controle, zigotos cultivados no meio CR2aa suplementado com soro fetal (n = 815); (T2) zigotos cultivados no meio CR2aa suplementado com soro fetal mais 100 µM CLA *trans-10, cis-12*. Os embriões foram avaliados quanto a desenvolvimento, quantidade de lípidos e criotolerância. Transcritos dos RNA mensageiros (RNAm) dos genes selecionados foram mensurados pelo *Real Time* PCR. Suplementação de CLA *trans-10, cis-12* não afeta significativamente a taxa de blastocisto (31,8% e 34,1% T1 e T2, respectivamente, p = 0,20) e nível dos RNAm dos genes relacionados com stress celular, apoptose e síntese *de novo* de ácido graxo. Quantidade de lípidos e transcritos do RNAm do gene 1-acilglicerol-3-fosfato o-aciltransferase 1 enzima relacionado a síntese de triglicérides foram significativamente reduzidos nos embriões cultivados na presença de CLA *trans-10, cis-12* em comparação com o grupo controle. Teve aumento significativo na taxa de re-expansão dos blastocistos cultivados na presença de CLA *trans-10, cis-12*, após o descongelamento (34.4 e 56.3% para T1 e T2, respectivamente p = 0,002). Essa diferença não persistiu na taxa de eclosão (14,0% e 16,5% para T1 e T2, respectivamente, P = 0,62). Esses resultados mostram que o CLA *trans-10, cis-12* reduz o acúmulo de lípidos nos embriões pela redução nos níveis dos transcritos do gene 1-acilglicerol-3-fosfato o-aciltransferase 1 sem afetar a qualidade do embrião. Adicionalmente, este ácido graxo aumenta a taxa de re-expansão, no entanto, não melhora a taxa de eclosão.

Palavras-Chave: Criopreservação. Blastocisto. Real-Time PCR. Radicais livre.

ABSTRACT

Supplementation of conjugated linoleic acid *trans-10*, *cis-10* in the culture medium, represents an important alternative to increasing the survival of embryos after cryopreservation. However the addition of culture media with CLA *trans-10*, *cis-12* without antioxidant may increase the apoptotic rate. The aim of this study was to evaluate the effect of adding CLA *trans-10*, *cis-12* *in vitro* culture of embryos without antioxidant. Bovine zygotes (n = 1,694) were divided into two treatments: (T1) control group, zygotes cultured in CR2aa medium supplemented with fetal calf serum (n = 815), (T2) zygotes cultured in CR2aa medium supplemented with fetal calf serum plus 100 µM CLA *trans-10*, *cis-12*. Embryos were evaluated for development, amount of lipids and cryotolerance. Transcripts of messenger RNA (mRNA) of selected genes were measured by real time PCR. Supplementation of CLA *trans-10*, *cis-12* did not significantly affect the blastocyst rate (31.8% and 34.1% T1 and T2, respectively, p = 0,20) and the mRNA level of genes related to cell stress, apoptosis and *de novo* synthesis of fatty acid . Lipids and transcripts of the mRNA of the gene 1-acilglicerol-3-phosphate o-acyltransferase 1 enzyme related to the synthesis of triglycerides were significantly reduced in embryos cultured in the presence of CLA *trans-10*, *cis-12* in comparison the control group. Had increased rate re-expansion of blastocysts cultured in the presence of CLA *trans-10*, *cis-12*, after thawing (34.4 and 56.3% for T1 and T2, respectively p = 0,002). This difference did not persist in the hatching rate (14.0 and 16.5% for T1 and T2, respectively, P = 0,62). These results show that the CLA *trans-10*, *cis-12* reduces the accumulation of lipids in the embryos by reducing the levels of gene transcripts acilglicerol-1-3-phosphate o-acyltransferase 1 without affecting the quality of the embryo. Additionally, this fatty acid increases the rate re-expansion, but does not improve the hatching rate.

Keywords: Cryopreservation. Blastocysts. Real-Time PCR. Free Radicals .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	Estrutura dos isômeros do CLA.....	25
2	Via metabólica proposta para biossíntese do C18:2.....	29
3	Genes regulados por SREBPs.....	34
4	Modelo proteolítico de liberação do esteroide SREBPs nas membranas.....	35
5	Metabolismo de CLA.....	38
6	Delineamento experimental.....	41
7	Média da intensidade da fluorescência dos embriões (D5) do grupo controle e grupo suplementada com CLA <i>trans-10, cis-12</i>	49
8	Embrião bovino produzido <i>in vitro</i> e corado com <i>Nile Red</i>	49
9	Quantificação relativa dos transcritos dos genes envolvidos no stress celular (PRDH1 e Hsp70.1), processo apoptótico (Bax e Bcl-2) e síntese de ácido graxo (ACAC1 e FASN) e triglicérides (AGPAT1) pela técnica de Real-Time PCR.....	50

LISTA DE TABELAS

1	Seqüência de <i>primers</i> e temperatura de anelamento específicas para cada gene alvo.....	47
2	Desenvolvimento embrionário dos presumíveis zigotos, cultivados no meio CR2aa suplementado com soro (T1 = controle) e suplementado com soro mais CLA <i>trans-10</i> , <i>cis-12</i>	48
3	Sobrevivência dos embriões após o cultivo (taxa de re-expansão e eclosão)	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – ácido graxo

AGNE – ácido graxo não esterificado

ATP – adenosina trifosfato

BAX – *BCL2-associated X protein*

BCL2 – *B-cell lymphoma 2*

Bl – Blastocisto

Bx – Blastocisto expandido

BSA – albumina sérica bovina

CLA – ácido linoléico conjugado

COCs – Complexo *cumulus*-oócito

CR2aa – Meio de cultivo Charle Ronsenkrans

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DMSO - Dimetilsulfoxido

DPBS – *Dulbecco's phosphate buffered saline* - Dulbecco's Salina Tamponada Fosfatada

FAS – ácido graxo síntase

FSH – Hormônio folículo estimulante

GAPDH – *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GSH – Glutaciona

LA – ácido linoléico

LH – Hormônio luteinizante

MIV – Maturação *in vitro*

MOET – múltipla ovulação e transferência de embriões

mRNA – RNA mensageiro

Na⁺/K⁺-ATPase – Bomba de Na⁺ e K⁺ dependente da hidrólise de ATP

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

PPP: Via das Pentoses Fosfato

OPU: “Ovum pick-up” Punção folicular guiada por ultrassom

RNA – ácido ribonucléico

ROS – Espécies de oxigênio reativo

SCD – esteroil coenzima A dessaturase

SFB – Soro Fetal Bovino

SREBP – “*Sterol Response Element-Binding Protein*” Proteína de ligação ao elemento de resposta a esterol

TCM – “*Tissue Culture Medium*” Meio para cultivo de tecidos

TE – Produção de embriões *in vivo* para transferência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS.....	17
1.1.1	Efeito dos ácidos graxos na qualidade do oócito e embrião	17
1.1.2	Efeito de soro na composição lipídica do oócito e embrião	19
1.1.3	Efeito de lípidos na criopreservação.....	20
1.1.4	Metabolismo embrionário durante a fase pré-implantacional	21
1.1.4.1	Fase maternal.....	22
1.1.4.2	Metabolismo após ativação do genoma embrionária.....	23
1.2	ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO.....	25
1.2.1	Produção do CLA.....	26
1.2.1.1	Síntese ruminal.....	26
1.2.1.2	Síntese por Estearoil-CoA dessaturase (Δ^9 dessaturase (SCD)).....	27
1.2.2	Efeito do CLA no acúmulo de lípidos.....	30
1.2.3	Mecanismo da Ação do CLA.....	32
1.2.4	Metabolismo do CLA.....	36
2	OBJETIVOS	39
2.1	GERAL.....	39
2.2	ESPECÍFICOS.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
3.2	METODOLOGIA.....	42
3.2.1	Coleta dos ovários.....	42
3.2.2	Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	42
3.2.2.1	Maturação <i>in vitro</i> dos complexos <i>cumulus</i> -oócito (COCs).....	42
3.2.2.2	Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	42
3.2.2.3	Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....	43
3.3	ANÁLISE LIPÍDICA.....	43
3.3.1	Coloração da amostra.....	43

3.3.2	Quantificação da fluorescência.....	44
3.4	EXPRESSÃO GÊNICA.....	44
3.4.1	Extração e amplificação do RNA.....	44
3.4.2	Análises da expressão dos genes alvos.....	44
3.5	CRIOPRESERVAÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES APÓS O ESCONGELAMENTO.....	45
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4	RESULTADOS.....	48
4.1	PRODUÇÃO DE EMBRIÃO.....	48
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE LÍPIDES.....	48
4.3	ANÁLISE DOS TRANSCRITOS ALVOS.....	49
4.4	SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO	51
4	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÃO.....	57
7	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos sobre a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos foram iniciados na década de 60, com a produção do primeiro blastocisto em 1968 (SERBIAN *et al.*, 1968; SREENAN e SCANLON, 1968). Em 1987 foi divulgada a primeira prenhez produzida por um processo totalmente *in vitro* (LU *et al.*, 1987), gerando no ano seguinte o nascimento de gêmeos (LU *et al.*, 1988). Desde então, a PIVE em bovinos tem contribuído de maneira significativa, não só para multiplicação de animais de interesse zootécnico, mas também para o melhoramento genético dos mesmos.

No Brasil, a PIVE vem sendo extensivamente aplicada na produção animal, favorecendo o melhoramento genético das raças de corte e leite. Atualmente, o rebanho nacional é estimado em mais de 195 milhões de animais (IBGE, 2008), o que coloca o Brasil como maior exportador mundial de carne bovina, e o classifica como um dos maiores produtores mundiais de leite. Em parte isso foi possível graças ao uso da produção dos animais pela biotecnologia *in vitro*. Segundo Viana, em 2008 o Brasil contribuiu com aproximadamente um terço da produção mundial de embriões bovinos, graças à significativa contribuição da produção *in vitro* de embriões, que representa 76% deste valor e 85% da produção mundial de embriões por essa biotecnologia (VIANA, 2009). Contudo, apesar do potencial que esta ferramenta representa na produção animal, ela ainda não atingiu sua capacidade máxima, devido às alterações morfológicas, metabólicas, no padrão de expressão gênica, na quantidade de lípidos e no número de células (blastômeros) observado nesses embriões (PIVE) em comparação com os produzidos *in vivo* (DUBY *et al.*, 1997; BONI *et al.*, 1999; VIUFF *et al.*, 1999).

Soma-se a estes efeitos deletérios, a baixa criotolerância dos oócitos e embriões limitando a formação de bancos de germoplasma. Mais de 80% dos embriões da TE (produção de embriões por superovulação convencional ou *in vivo*) e 95% dos embriões PIV são transferidos a fresco, reflexo da baixa capacidade de sobrevivência desses após a criopreservação, particularmente para embriões produzidos *in vitro* (VIANA e CAMARGO, 2007).

Vários estudos sustentam a hipótese que a alta sensibilidade a

criopreservação dos embriões bovinos está relacionado principalmente à grande quantidade de lípidos intracitoplasmáticos (LONERGAN *et al.*, 2003; RIZOS *et al.*, 2003). Para Abe *et al.* (2002) e Rizos *et al.* (2003), o acúmulo anormal de lípidos nos embriões PIV está relacionado especialmente às condições de cultivo *in vitro*, notoriamente devido à inclusão de soro. Segundo McEvoy *et al.* (2000), embriões PIV contêm mais triglicérides e menos lípidos das outras classes. Essa diferença, aliada as baixas concentrações dos ácidos graxos poliinsaturados nos fosfolípidos da membrana dos oócitos e embriões, podem ser responsáveis pela baixa tolerância à criopreservação dos produtos oriundos desta técnica (WILMUT, 1972; POLGE *et al.*, 1974; NAGASHIMA *et al.*, 1992).

Paralelamente, tem sido relatado efeito bioativos de alguns lípidos que desempenham importantes funções na regulação metabólica. O exemplo disto são os ácidos linolêicos conjugados (CLA), termo que se refere a uma mistura de isômeros geométricos e posicionais do ácido linolêico, onde as insaturações são conjugadas, ou seja, separadas por simples ligações carbono-carbono (BESSA *et al.*, 2000). Dentre todas as combinações possíveis com estas características, duas tem chamado bastante atenção da comunidade científica pela redução da carcinogênese (PARIZA *et al.*, 1979), efeito antiobesidade (PARK *et al.*, 1997; DUGAN *et al.*, 1999; BEE, 2000), alteração na composição lipídica do leite das vacas (BAUMGARD *et al.*, 2000), efeito benéfico no tratamento da diabetes *mellitus* e no funcionamento do sistema imunológico (SEBEDIO *et al.*, 1999).

Neste contexto, vários estudos têm demonstrado que o isômero de CLA *trans-10 cis-12*, pode reduzir o acúmulo de lípidos através da redução dos níveis de RNA mensageiros (RNAm) das enzimas lipogênicas (BAUMGARD *et al.*, 2002), atividade da lipoproteína lipase (PARK *et al.*, 2000) e abundância do RNAm da esteroil coenzima A dessaturase (LEE *et al.*, 1998). Desta forma, o uso deste composto pode representar uma importante alternativa para o controle do excesso de lípidos observado nos embriões bovinos produzidos *in vitro*.

1.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

O emprego das biotecnologias reprodutivas como a produção *in vitro* de embriões, representam uma importante ferramenta para otimização dos resultados na produção animal, permitindo maior aproveitamento dos oócitos para produção de embriões em larga escala. No entanto, esse aumento na produção de embrião exige, conseqüentemente, um número compatível de receptoras para gestá-los, o que eleva o custo da técnica, com manutenção de grande número de receptoras para observação do cio natural e/ou custos adicionais com hormônios para sincronização do cio. Tendo em vista isso, a criopreservação dos embriões excedentes a cada bateria da produção pode representar uma importante alternativa para redução dos custos com manutenção e sincronização das receptoras. Contudo, o alto conteúdo lipídico presente nesses embriões compromete a sua capacidade de sobrevivência após a criopreservação, uma vez que afeta o equilíbrio de desidratação e reidratação das células, levando maior formação de cristais de gelo e maior exposição dos embriões a crioprotetores. Desta forma, estudos que visam à diminuição de lípidos presente nesses embriões, como meio de melhorar a qualidade dos mesmos e a taxa de sobrevivência após a criopreservação, são necessários.

1.1.1 Efeito dos ácidos graxos na qualidade do oócito e embrião

Lípidos desempenham um papel vital na construção das propriedades físicas e funcionais das membranas biológicas (KING e SPECTOR, 1978), além de exercerem efeitos nas interações célula-célula, proliferação celular, transporte intra e intercelular, na função das proteínas da membrana, que dependem do ambiente lipídico para manter a sua conformação, e na composição de ácidos graxos da membrana (GALO *et al.*, 1981). A quantidade de lípidos em oócitos de ruminantes é aproximadamente 20 vezes maior que presente em camundongos (76 *versus* 4 ng), e este consiste de aproximadamente de 50% de triglicérides, 20% de fosfolípidos, 20% de colesterol e 10% de ácido graxo livre (McEVOY *et al.*, 2000). Segundo Gurr

e Harwood (1991), armazenamento de lípidos nos mamíferos tende a ser predominantemente ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Esta tendência é coerente com a observação de Jeffcoat (1979), que relatou alta concentração de ácido oléico (18:1) e palmítico (16:0) em lípidos neutros (triglicérides) dos oócitos, os quais também foram requeridos como substratos de ácidos graxos para alongação e dessaturação.

Segundo Wilmut (1972); Polge *et al.* (1974) e Nagashima *et al.* (1992), a alta concentração dos ácidos graxos saturados nos fosfolípidos da membrana afeta a capacidade de criopreservação dos oócitos e embriões. Com base nesta afirmação, especula-se que oócitos ou embriões com maior quantidade de lípidos insaturados são mais tolerantes sensíveis a criopreservação. Sata *et al.* (1999) relataram a predominância de ácido mirístico (14:0) nos oócitos bovinos. Em contraste com esse trabalho, Kim *et al.* (2001), relataram a predominância de ácido palmítico (16:0), tanto nos oócitos grau A, como nos oócitos grau B, de acordo com a classificação de De Loos *et al.* (1989). O mesmo também foi observado nos oócitos maturados na presença de soro ou de álcool polivinílico. Essa diferença pode ser atribuída a fatores, como idade, raça, e dieta, dos animais utilizados no experimento. Ainda neste trabalho Kim e colaboradores observaram diferença significativamente nos oócitos grau A e B, onde o ácido oléico (18:1) é o segundo mais abundante na categoria A e o ácido esteárico (18:0) o segundo mais abundante na categoria B, o que justifica a maior capacidade de criopreservação dos oócitos de grau A.

As propriedades físicas da membrana celular desempenham grande papel na qualidade do oócito e na sua capacidade de criopreservação. A temperatura modula as propriedades físicas das células, através da alteração na composição de lípidos da membrana. Neste contexto Zeron *et al.* (2001), reportaram redução na fluidez da membrana dos oócitos durante o verão em comparação com inverno, devido ao decréscimo na quantidade de ácido graxo monoinsaturado e poliinsaturados. Futuramente este mesmo grupo reportou aumento na qualidade dos oócitos de ovelha alimentadas com ácidos graxos poli-insaturada (ZERON *et al.* 2002).

Homa e Brown (1992) relataram que a concentração relativa de ácido linoléico em fluido folicular pode ser importante na regulação meiótica e retenção de oócitos bovinos na fase de vesícula germinal. Além disso, Murakami *et al.* (1986) também

relataram que o ácido linoléico estimula a proteína quinase C, que desempenha um importante papel no crescimento e diferenciação celular (NISHIZUKA, 1988). Kim *et al.* (2001) observaram uma baixa concentração de ácidos oléico, linoléico e araquidônico nos oócitos grau B em comparação com grau A. No entanto, a baixa concentração do ácido linoléico e araquidônico observada nos oócitos grau B foram semelhantes às concentrações em oócitos maturados *in vitro*, independentemente da sua categoria (A ou B) ou de serem maturados na presença de soro ou de álcool polivinílico. Apesar dessa variação na quantidade de ácidos graxos insaturados, não houve diferença na capacidade de maturação *in vitro* em oócitos grau A e B. Coerentemente, De Loos *et al.* (1989) também não observaram diferença na maturação em oócitos de grau 1, 2 e 3, enquanto que os oócitos de grau 4 tinha a capacidade de maturação *in vitro* reduzida. Com base nisso, é possível concluir que os diferentes ácidos graxos classificados em cada oócito não influenciam diretamente a maturação, embora possam ser importantes para a competência oocitária e capacidade de sobrevivência do embrião após a criopreservação.

1.1.2 Efeito de soro na composição lipídica do oócito e embrião

As condições de cultivo *in vitro* são fundamentalmente diferentes do ambiente existente no animal vivo (LONERGAN *et al.*, 2003). Para reduzir esse efeito rotineiramente os embriões produzidos *in vitro* são cultivados na presença de soro, o qual contribui com fatores de crescimento, hormônios, nutrientes e componentes antioxidantes, e possibilita aumento das taxas de blastocistos, em comparação com embriões cultivados no meio livre de soro. Entretanto, tem sido relatado que a presença do soro no meio de cultivo aumenta de modo significativo o acúmulo de lípidos intracitoplasmáticos (THOMPSON *et al.*, 1995; ABE *et al.*, 1999), além de alterar o perfil de ácido graxo no embrião (SATA *et al.*, 1999).

Segundo Kim *et al.* (2001) lípidos desempenham um papel importante nos embriões, controlando as propriedades físicas, metabólicas e funcionais, além de servirem como reserva de energia, porém em excesso podem alterar o metabolismo do embrião, além de diminuir a capacidade de sobrevivência do mesmo após

criopreservação (ABE *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2003).

Usando cromatografia gasosa, para avaliar o teor de lípidos presentes em oócitos bovinos maturados *in vitro* na presença ou ausência de soro, Kim e colaboradores relataram que a quantidade dos triglicérides nos oócitos maturados na ausência de soro foi menor do que nos oócitos maturados na presença de soro, demonstrando que a quantidade dos triglicérides nos oócitos pode variar em função da presença ou ausência do soro no meio (KIM *et al.* 2001). Ferguson e Leese (1999) quantificando o conteúdo de triglicérides com microscopia de fluorescência em oócitos e embriões bovinos durante a fase pré-implantacional, observaram um menor teor de lípidos em oócitos após a maturação e fecundação até a formação de 2-células. Na ausência de soro, o conteúdo de triglicérides manteve-se relativamente constante do estágio de duas células até blastocisto eclodido. Nestas condições (ausência de soro no meio de cultivo) o conteúdo de triglicérides nos blastocistos produzidos *in vitro* foi semelhante à de blastocistos produzidos *in vivo*. Em contraste, o teor de triglicérides nos blastocistos produzidos na presença de 10% soro fetal bovino aumentou de forma constante da fase de 8-células até a de blastocisto eclodido.

Esses dados demonstram que a presença de soro no meio de cultivo acarreta um maior acúmulo de lípidos intracitoplasmáticos nos embriões. No entanto o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda é desconhecido. Segundo Abd El Razek *et al.* (2000) o aumento de lípidos no embrião é dado principalmente pela neo-síntese dos triglicérides. Para Ferguson e Leese (1999) e Sata *et al.* (1999) isso ocorre devido à presença de lipoproteínas no soro que são internalizados nas células, aumentando o conteúdo lipídico intracelular. Já para Abe e Hoshi (2003) a presença do soro no meio de cultivo altera o metabolismo mitocondrial do lipídeo, conduzindo a um maior armazenamento lipídico no citoplasma. A combinação desses três mecanismos também não é descartada.

1.1.3 Efeito de lípidos na criopreservação

A produção animal foi alavancada com o advento das tecnologias de produção *in vitro* de embrião e criopreservação. No entanto ainda há uma predominância na transferência de embriões a fresco, principalmente dos embriões produzidos *in vitro*, devido aos resultados insatisfatórios na taxa de prenhez (Viana e Camargo, 2007), reflexo da baixa capacidade de sobrevivência após a criopreservação em comparação com embriões frescos.

A diminuição da viabilidade embrionária após o congelamento tem sido atribuída a danos físicos e químicos durante o processo de criopreservação (BAGUISI *et al.*, 1999; MEN *et al.*, 2003). Essas injúrias podem levar a morte celular, afetando a viabilidade e capacidade do embrião continuar o desenvolvimento. Segundo Fabian *et al.* (2005), os danos físico-químicos, que culminam com a morte celular, são reflexo das condições inadequadas de cultivo embrionário. No caso de embriões bovinos PIV a baixa taxa de sobrevivência após a criopreservação é atribuída principalmente a alto conteúdo de lípidos intracitoplasmático (LONERGAN *et al.*, 2003), ainda que fatores como taxas de refrigeração e aquecimento, tamanho e fase de desenvolvimento dos embriões, propriedades osmótica das células e toxicidade dos crioprotetores também tenham efeito sobre a congelabilidade dos mesmos.

Durante o processo de criopreservação, a fim de evitar a formação de cristais de gelo intracelular, geralmente são utilizados crioprotetores que desidratam as células, reduzindo o volume celular e minimizando a formação de cristais de gelo dentro das células (VISINTIN *et al.*, 2002). Baseado nisso, alguns estudos correlacionam a alta quantidade de lípidos intracitoplasmáticos com a maior susceptibilidade a crioinjúrias, sugerindo que grandes quantidades de lípidos intracitoplasmáticos afetam o trânsito da água durante o processo de desidratação, o que aumenta a exposição das organelas e proteínas celulares à cristais de gelo. Somado a isso também foi sugerido que choque a frio separa a membrana, quando as concentrações de esterol na membrana são mais altas em comparação com ácidos graxos poliinsaturados (VISINTIN *et al.*, 2002).

1.1.4 Metabolismo embrionário durante a fase pré-implantacional

Atividade metabólica e a produção de energia podem ser utilizadas como indicadores do potencial de desenvolvimento e vitalidade de embriões de mamíferos, uma vez que estes contribuem para maturação nuclear e citoplasmática, reinício da meiose dos oócitos, clivagem bem sucedida após a fecundação, incubação e implantação de embriões. Com base nisso, o metabolismo de substratos endógenos e exógenos que são fornecidos ao embrião durante o período pré-implantacional, são usados como critério para prever a viabilidade do embrião e, especialmente, a taxa de prenhez e parição.

Segundo Lesse (1993), podemos dividir a atividade metabólica do embrião durante o período pré-implantacional em duas grandes fases: (1) fase maternal, controlada principalmente por transcritos maternos (mRNA) e proteínas acumuladas no oócito durante a maturação; e (2) fase após a ativação do genoma embrionário, quando o embrião passa a comandar o seu próprio desenvolvimento, caracterizado por um aumento drástico na atividade metabólica.

1.1.4.1 Fase maternal

Da maturação a fase inicial do desenvolvimento (8-16 células), a atividade metabólica do embrião é relativamente baixa e caracterizada principalmente pela fosforilação oxidativa, como responsável pela produção de mais de 90% do ATP (THOMPSON *et al.*, 1996). Nesta fase de desenvolvimento, principal substrato exógeno requerido para síntese de ATP é o piruvato. A glicose absorvida pelo embrião, como indicado pela presença dos transcritos que facilitam o seu transporte para o interior da célula (Glut-1, 3 e 8) (AUGUSTIN *et al.*, 2001), é utilizada principalmente na via das pentose fosfato (PPP) para produção de NADPH, devido a grande demanda deste co-fator durante a fecundação para regeneração da glutatona e produção de açúcares ribose, necessários para síntese de ácidos nucléicos (RNA e DNA).

Em relação ao substrato endógeno, algumas evidências têm sugerido que os lípidos, especialmente os triglicérides, também desempenham um importante papel

na produção de energia durante este período de desenvolvimento. Ferguson e Leese (1999) relataram redução de 42% no conteúdo de triglicérides da maturação ao estágio de duas células em embriões bovinos. Corroborando com esses dados Kruip *et al.* (1983) relataram que, durante a maturação *in vivo* de oócitos bovinos, ocorre uma mudança na localização mitocondrial, da região periférica para a cortical, sugerindo uma mudança na dependência de fonte de energia intracelular, uma vez que o oócito perde contacto com células foliculares (teça e granulosa). Fleming e Saacke (1972) observaram uma estreita associação do retículo endoplasmático, gotículas lipídicas e mitocôndrias, formando um complexo metabólico, indicando que possivelmente os lípides podem ser utilizados como fonte de energia também durante a fecundação dos oócitos bovinos. Reiger e Loskutoff (1994) demonstraram aumento do metabolismo no ciclo de Krebs durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, indicando que metabolismo oxidativo é o principal local da produção energética na célula. Essas observações permitem concluir que os ácidos graxos derivados da desagregação dos triglicérides são oxidados no ciclo Krebs, para produção de energia na forma de ATP, necessárias para maturação, fecundação e desenvolvimento inicial. Provavelmente, isso é facilitado pela preferência na oxidação de substrato como piruvato durante este período, que é regulada pelos transcritos e proteínas mitocondriais pré-existentes, herdados do oócito.

1.1.4.2 Metabolismo após ativação do genoma embrionária

Após o período da baixa síntese protéica no início do desenvolvimento, ocorre um aumento no mesmo (síntese da proteína) após o estágio de 16-células no embrião bovino, conforme indicado pelo aumento progressivo na taxa de incorporação de L-[³⁵S] metionina (FREI *et al.* , 1989) e [³H] fenilalanina (THOMPSON *et al.*, 1998), o que é um indicativo da ativação do genoma embrionária. Com aumento da síntese protéica também ocorre um aumento na demanda de energia na forma de ATP, para realização destas atividades. Como consequência, ocorre aumento na geração de ATP por embrião.

Assim como na fase da maturação, fecundação e fase inicial do

desenvolvimento, durante esse período o piruvato continua sendo principal substrato exógeno, utilizado pelo embrião para produção de energia, através da fosforilação oxidativa. Isso é demonstrado pelo aumento na captação deste carboidrato ao longo do desenvolvimento pré-implantacional, principalmente durante a formação do blastocele. Condizente com o aumento na captação do piruvato também ocorre acréscimo no consumo de oxigênio, o que permite concluir que a fosforilação oxidativa continua sendo a principal via para produção de ATP (THOMPSON *et al.* 1996). Esse aumento no consumo de oxigênio e carboidratos, principalmente durante a compactação e formação do blastocele, pode ser explicada pela maior demanda na síntese protéica, especialmente das proteínas de adesão, necessárias para aumento da interação entre as células e pela atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase, necessárias para formação da blastocele, que é o principal consumidor de energia durante este período (LEESE, 1991; DONNAY e LEESE, 1999). No entanto, apesar do aumento na quantidade de ATP produzido por embrião, ocorre uma redução na produção por blastômero. Segundo Thompson *et al.* (1996), isso pode ser reflexo da diminuição no volume celular dos embriões, o que leva a diminuição no número das mitocôndrias por célula, ou ainda reflexo da diminuição na contribuição proporcional à produção de ATP pela fosforilação oxidativa. Essa estratégia pode ser exigida pelo embrião na produção de ATP devido à baixa concentração de oxigênio do oviduto ao útero (FISCHER e BAVISTER, 1993).

Em relação ao metabolismo da glicose nesta fase, ocorre um fenômeno parecido com o observado durante o período inicial do desenvolvimento, com exceção do período de compactação, quanto ocorre um aumento significativo na captação deste carboidrato. Durante esta fase, o principal destino da glicose não é mais produção da NADPH e açúcares ribose pela PPP, mas sim produção de ATP através da via glicolítica (JAVED e WRIGHT, 1991; REIGER *et al.* 1992; WAUGH e WALES, 1993; THOMPSON *et al.*, 1996).

Acredita-se que a β -oxidação dos ácidos graxos, também contribui durante este período na síntese de ATP, uma vez que a fosforilação oxidativa continua sendo principal fonte de produção de energia (WILEY, 1987). No entanto, em trabalho realizado por Ferguson e Leese (1999), não foi observada diminuição líquida no conteúdo dos triglicérides após a fase de duas células, sugerindo que os

ácidos graxos deixam de ser utilizado como fonte de energia, a partir do estágio de duas células. Por outro lado, não se exclui a hipótese da utilização dos ácidos graxos na produção de ATP, uma vez que, pode ocorrer absorção de lípidos, durante este período, como também observado por Ferguson e Leese (1999) no meio contendo soro.

1.2 Ácido linoléico conjugado

Os ácidos linoléicos conjugados (CLA) são uma mistura de isômeros geométricos (combinações das configurações: *cis-cis*, *trans-cis*, *cis-trans*, e *trans-trans*) e posicionais (duplas ligações nas posições 8 e 10; 9 e 11; 10 e 12; ou 11 e 13) do ácido linoléico (ácido octadecadienóico *cis*-9, *cis*-12; ou C_{18:2} n-6 *cis*, n-9 *cis*), onde as insaturações são conjugadas, ou seja, separadas por simples ligações carbono-carbono (BESSA *et al.*, 2000). De acordo com Yurawecz *et al.* (2001) é possível obter 56 isômeros de CLA através dessas combinações. No entanto, dentre todas as combinações possíveis com estas características até então somente dois tem a bioatividade comprovada, atuando na redução da carcinogênese (Pariza *et al.*, 1979), efeito anti-obesidade (PARK *et al.*, 1997; DUGAN *et al.*, 1999; BEE, 2000), alteração na composição lipídica do leite de vacas (BAUMGARD *et al.*, 2000), efeito positivos nas doenças de diabetes *mellitus* e funcionamento do sistema imunológico (SEBEDIO *et al.*, 1999).

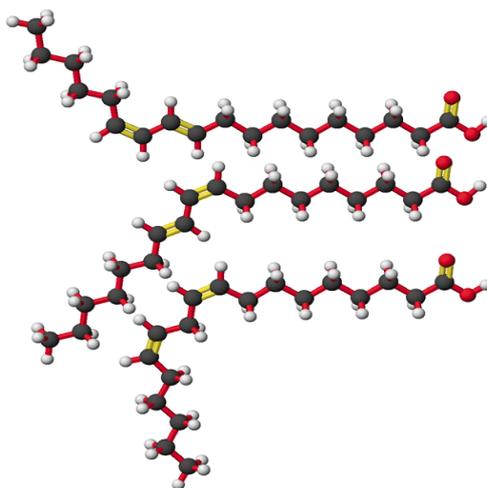


Figura 1 – Estrutura dos isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA). De cima para baixo: isômero *trans*-10, *cis*-12; com duas duplas ligações conjugada na posição 10 e 12; isômero *cis*-9, *trans*-11 com duas duplas ligações conjugada na posição 09 e 11, e Ácido linoléico (*cis*-9, *cis*-12), com duas duplas ligações não conjugadas na posição 09 e 12. Fonte: Pariza *et al.* (2001).

1.2.1 Produção do CLA

Existem duas vias de produção de CLA (Figura 2): no rúmen, pela bio-hidrogenação incompleta dos ácidos graxos poliinsaturados da dieta pelos microorganismos presentes neste ambiente, e pela dessaturação do ácido graxo C18:1 *trans-11* por uma enzima presente na glândula mamária e tecido adiposo (CORL *et al.*, 2001) chamada estearoil-CoA dessaturase ou delta 9-dessaturase (SCD).

1.2.1.1 Síntese ruminal

A síntese do CLA no rúmen ocorre por meio da bio-hidrogenação incompleta dos ácidos graxos poliinsaturados provenientes da dieta pelos microorganismos presentes neste ambiente (BAUMAN e GRIINARI, 2001). Este evento requer a lipólise previa dos ácidos graxos esterificados na forma de triglicérides, fosfolípidos e galactolípidos, por lipases microbiana presentes no rúmen (GARTON *et al.*, 1961, DAWSON *et al.*, 1977). Os ácidos graxos livres insaturados, oriundos da lipólise são então submetidos à bio-hidrogenação.

Durante o processo de bio-hidrogenação do ácido linoléico, o isômero *cis-9*, *trans-11* é o primeiro intermediário formado pelas bactérias ruminais. A enzima Δ^{12} *cis*, Δ^{11} *trans* isomerase catalisa a isomerização dos ácidos linoléicos a ácido linoléico conjugado *cis-9*, *trans-11*, que por sua vez é saturado na posição da dupla ligação *cis-9* pela enzima redutase, formando ácido vacênico (C18:1). Esta enzima redutase precisa de radicais carboxila (COOH) livres para completar a reação (KEPLER *et al.*, 1966), o que demanda a lipólise prévia dos lípidos provenientes da dieta. A próxima etapa envolve uma redução subsequente do ácido vacênico (C18:1) a ácido esteárico (18:0) (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988). Porém, durante este evento os intermediários desse processo podem atravessar o rúmen, se mover pela corrente sanguínea e serem absorvidos e incorporados à gordura nos tecidos.

Griinari e Bauman (1999) propuseram que isômeros de CLA *cis-9, trans-11* oriundos de ácido linoléico, podem ser eventualmente convertidos em C18: 1 *trans-10* no conteúdo ruminal. Essa especulação sobre a produção de CLA *trans-10, cis-12*, foi comprovada mais tarde por Kim *et al.* (2002) que demonstraram uma produção significativa de CLA *trans-10, cis-12* por cepas de *Megasphaera elsdenii*. Coakley *et al.* (2003) e Ando *et al.* (2004), demonstraram que bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, isolados a partir de outros habitats também podem produzir CLA *trans-10, cis-12*. Estes gêneros ocorrem no rúmen, embora em número bastante reduzido, elas podem contribuir para bio-hidrogenação e formação de CLA *trans-10, cis-12*. A população desses microorganismos (*Propionibacterium*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*) foi aumentada significativamente no rúmen com dietas com maior proporção de concentrado (STEWART *et al.* 1997), o que é coerente com a maior produção de CLA *trans-10, cis-12* com as mesmas.

Segundo Griinari *et al.* (1998) e Chouinard *et al.* (1999) existem algumas condições que podem intensificar esse mecanismo de síntese de CLA, como alterações no ambiente ruminal, alta quantidade dos ácidos graxos na dieta (o que favorece a predominância de determinadas bactérias ruminais) e alteração no pH ruminal.

1.2.1.2 Síntese por estearoil-CoA dessaturase (Δ^9 dessaturase (SCD))

A síntese endógena do CLA nos tecidos tem início quando o ácido graxo C18:1 sofre dessaturação pela enzima Δ^9 dessaturase, presente na glândula mamária e no tecido adiposo (GRIINARI *et al.*, 2000). Nos animais, as dessaturações ocorrem somente até o carbono 9, devido à ausência das enzimas Δ^{12} e Δ^{15} dessaturases, presentes somente em vegetais. Como consequência disso, o ácido linoléico é considerada um ácido graxo essencial, devendo ser fornecido através da dieta por ser precursor essencial na síntese das prostaglandinas. A SCD introduz uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 dos ácidos graxos. As reações

catalisadas por dessaturases são essenciais para manter as características da fluidez das membranas celulares e dos triglicérides (PERFIELD *et al.*, 2002).

Para verificar a hipótese de síntese endógena de CLA pela enzima SCD, Griinari *et al.* (2000) infundiram no abomaso de vacas lactantes, uma mistura de C18:1 *trans-11* e C18:1 *trans-12* (50%-50%) e observaram aumento de 31% de CLA *cis-9, trans-11* secretado no leite. Com base nisso concluíram que os animais realmente são capazes de sintetizar endogenamente o CLA *cis-9, trans-11*. No outro experimento, com o objetivo de avaliar a contribuição da síntese endógena de CLA via SCD, os autores infundiram óleo de esterculina (um inibidor da SCD) e estimaram que 64% do CLA na gordura do leite dos ruminantes é de origem endógena. Corroborando estes dados, Corl *et al.* (2001) também relataram a redução de 60-65% do isômero de *cis-9, trans-11* quando os animais receberam uma dieta suplementada com óleo de esterculina. Kay *et al.* (2002) estimaram que 87 a 100% do isômero *cis-9, trans-11*, presente na gordura de leite era de origem endógena nas vacas sob regime de pastagem e suplementadas com óleo de esterculina, os mesmos ainda demonstraram que é possível aumentar os níveis do isômero *cis-9, trans-11*, no leite, através da suplementação dos ácidos graxos trans C18:1 na dieta.

Com intuito de avaliar o efeito biológico do CLA na atividade da SCD, Lee *et al.* (1998), suplementaram na dieta de camundongos CLA (mistura contendo 42% do isômero *cis-9, trans-11* e 44% do isômero *trans-10, cis-12*) e avaliaram a expressão hepática do RNA mensageiro (RNAm) da SCD, e observaram redução na expressão do mesmo em relação ao grupo controle. Em outro experimento no qual foi utilizado somente o isômero *cis-9, trans-11*, não foi observado nenhum efeito na expressão do RNAm da enzima SCD. Com base nesses dados os autores inferiram que o isômero *trans-10, cis-12* é o responsável pelos efeitos inibitórios da expressão da SCD, resultado confirmado posteriormente por Park *et al.* (2000). De acordo com esses dados acredita-se que o *trans-10, cis-12* atua inibindo diretamente a enzima e que provavelmente a dupla ligação na posição *cis-12* é a mais importante nesse efeito inibitório do CLA, sendo que o efeito é mais acentuado quando ocorre, ao mesmo tempo, a conjugação na posição *trans-10*.

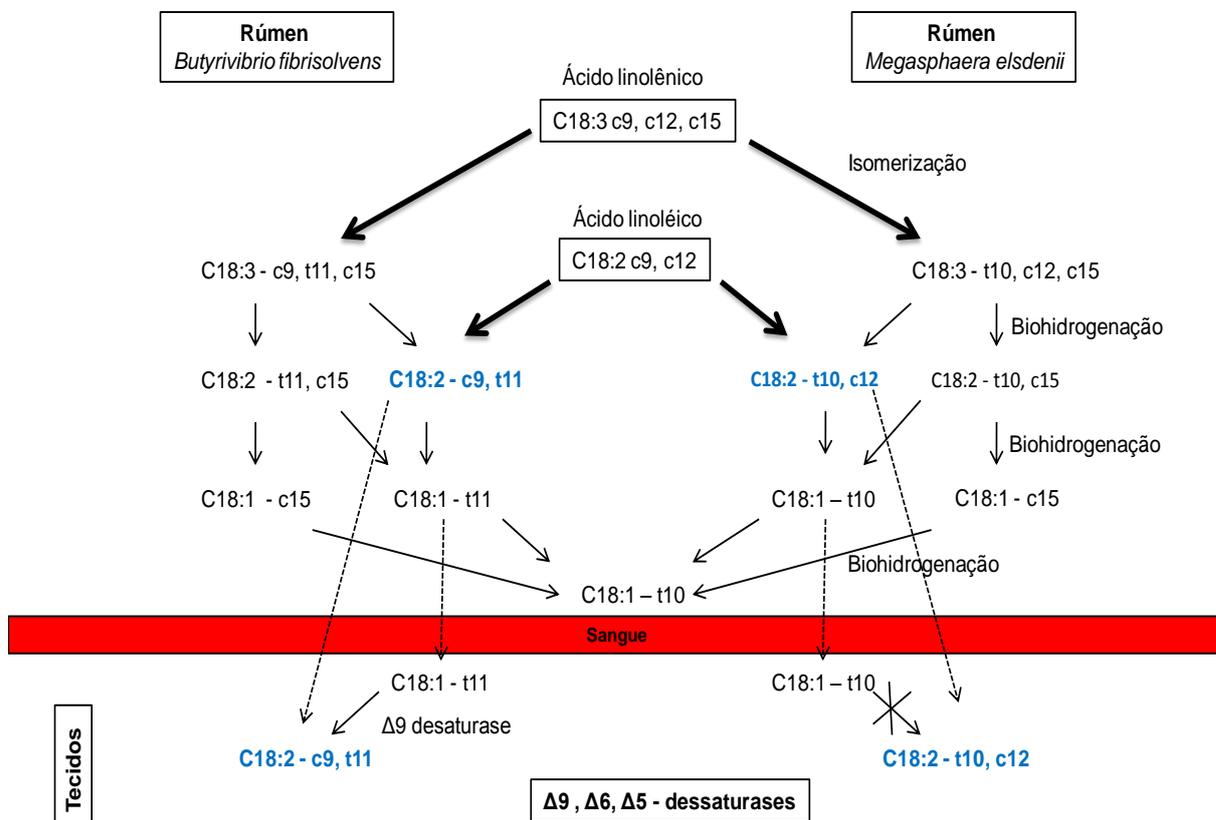


Figura 2 - Possíveis intermediários metabólicos dos ácidos linoléico e linolênico produzidos por bactérias ruminais. Isomerização seguida por bio-hidrogenação no rúmen produz principalmente ácidos graxos C18:1-c11 e C18:1-t10. Metabólitos produzidos no rúmen podem passar pelo sangue e serem absorvidos nos tecidos. Essa transferência dos ácidos graxos para tecidos é representada pelas setas tracejadas. C18:1-t11 é dessaturada para C18:2-c9, t11 por Δ^9 dessaturase, enquanto que C18:2-t10 não é convertido para C18:2-t10, c12 no tecido, devido a ausência da enzima Δ^{12} dessaturase. Fonte: Kramer *et al.* (2004).

1.2.2 Efeito do CLA no acúmulo de lípidos

A homeostasia de lípidos nas células dos vertebrados é regulada por uma família de fatores de transcrição chamadas de SREBPs. Estes fatores de transcrição controlam a atividade e expressão de mais de 30 genes relacionados à síntese de colesterol, ácido graxo, triglicérides e fosfolípidos (HORTON *et al.*, 2002). Trabalhos realizados *in vivo* e *in vitro*, têm demonstrado que o isômero de CLA *trans-10, cis-12*, exerce seu efeito no metabolismo energético promovendo alterações na quantidade de lípidos intracelular, através da modulação na expressão gênica e atividade das enzimas sob o comando de SREBP e genes relacionados ao transporte de glicose para o interior da célula.

Durante a lipogênese, a primeira molécula de ácido graxo (ácido palmítico) é obtida a partir de uma molécula de acetil-CoA e sete de malonil-CoA. Este processo requer a presença duas enzimas fundamentais, que são acetil-CoA carboxilase (ACC), responsável pela síntese de malonil-CoA, e o ácido graxo sintases (FAS), responsável pela síntese de ácido palmítico. Estudo realizado por Baumgard *et al.* (2002) demonstrou que a infusão do isômero *trans-10, cis-12* no abomaso de vacas lactantes reduz a abundância desses transcritos envolvidos na lipogênese (ácido graxo sintase e acetil-CoA carboxilase) de forma significativa em relação ao grupo controle. Como conseqüências dessa redução observaram uma diminuição de 48% na quantidade da gordura do leite e 82% na capacidade lipogênica desse tecido em relação ao grupo controle. Resultado semelhante foi observado quando os autores avaliaram a expressão da lipoproteína lipase (LPL) e proteína ligadora de ácidos graxos. Ainda neste mesmo trabalho os autores observaram a redução na expressão de glicerol fosfato acil-transferase e acil-glicerol fosfato acil-transferase, enzimas envolvidas na síntese de triglicérides. Em função destes resultados, concluiu-se que os mecanismos pelos quais o isômero *trans-10, cis-12* inibe a síntese de lípidos seriam através da redução na expressão dos genes que codificam enzimas envolvidas no consumo de ácidos graxos circulantes e transporte dos mesmos, síntese *de novo* de ácidos graxos, dessaturação de ácidos graxos e síntese de triglicérides. Brown *et al.* (2001), trabalhando com células de estroma

vascular humano, relataram redução de 60% no conteúdo dos triglicérides celular nas células tratadas com o isômero *trans-10, cis-12* em relação ao grupo controle.

A esteroil coenzima A dessaturase (SCD) também é uma das enzimas comandada por SREBP, que participa da lipogênese, introduzindo dupla ligação entre as moléculas de carbonos dos ácidos graxos. A reação catalisada por SCD é essencial para manter as características de fluidez das membranas celulares e dos triglicérides (PERFIELD *et al.*, 2002). No entanto, Lee *et al.* (1998) demonstraram que o isômero *trans-10, cis-12* reduz a abundância de RNA mensageiro de SCD. Corroborando esses dados Park *et al.* (2000) também demonstraram que o mesmo isômero inibiu a atividade de SCD.

Peterson *et al.* (2003) avaliaram o efeito da dieta que induz a depressão da gordura no leite em vacas e notaram uma redução de 27% na produção de gordura do leite, possivelmente provocada pelo isômero *trans-10, cis-12*, uma vez que houve um aumento na concentração deste isômero no leite. Baseado nisso, os autores avaliaram a abundância dos transcritos (RNAm) das enzimas relacionados com a lipogênese, como ACC, FAS, acil-CoA ligase, glicerol fosfato acil-transferase (GPAT) e acilglicerol fosfato acil-transferase (AGPAT) e observaram uma redução significativa na quantidade dessas enzimas. Esses dados foram correlacionados com aumento do isômero *trans-10, cis-12*. Com base nisso, concluíram que dietas que induzem a depressão da gordura no leite aumentam a quantidade do isômero *trans-10, cis-12*, que, por sua vez, altera a expressão das enzimas envolvidas na lipogênese. Corroborando com essas constatações, Piperova *et al.* (2000) relataram redução na expressão de RNAm e atividade das enzimas acetil-CoA e ácido graxo sintase nas células da glândula mamária dos animais estimuladas a produção de CLA com óleo de soja.

Lin *et al.* (2004) observaram redução na abundância do RNAm da acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintase na glândula mamária de ratas lactantes que receberam CLA de 4 a 15 dias pós-parto. José *et al.* (2008) observaram redução na atividade e quantidade dos transcritos da enzima FAS no tecido adiposo de suíno tratados com CLA, em relação ao grupo controle.

Segundo Bauman e Vernon (1993), outro fator limitante na taxa da lipogênese é o transporte da glicose na membrana celular, que é controlada por hormônios

homeorréticos e homeostáticos. Takahashi *et al.* (2002) relataram redução nos transcritos da glucose-4 (Glut-4), proteína transportadora da glicose para o interior da célula, no tecido adiposo marrom e branco de camundongos que receberam suplementação de CLA na dieta. Sendo um dos fatores que contribuem para aceleração da taxa da lipogênese é o estado metabólico relativo à elevação dos níveis da glicose na corrente sanguínea e, conseqüentemente, no interior da célula, pode-se especular que a redução na expressão das proteínas transportadoras da glicose para o interior da célula reduz a taxa da lipogênese.

De particular importância para produção *in vitro* de embriões bovino, Pereira *et al.* (2006) demonstraram pela primeira vez que a suplementação do isômero *trans-10 cis-12* no meio de cultivo na presença de soro reduz o acúmulo de lípidos em embriões, sem afetar a taxa de clivagem e produção de blastocisto, além de aumentar a taxa sobrevivência após o descongelamento. Adicionalmente, também foi demonstrado que o cultivo com o isômero de CLA *trans-10 cis-12* na presença de soro aumenta a capacidade dos embriões de manterem a sua integridade e voltarem a expandir após a criopreservação. No entanto, o mecanismo pelo qual o isômero de CLA *trans-10, cis-12*, modula a redução do acúmulo de lipídeos nos embriões ainda não foi investigada.

1.2.3 Mecanismo da ação do CLA

A expressão das enzimas lipogênicas é coordenadamente estimulada por uma classe de fatores de transcrição conhecida como *master regulators of lipid synthesis*. Como exemplo desses fatores de transcrição pode se citar os membros da família *sterol response element-binding protein* (SREBP) que controlam a expressão das enzimas que catalisam as reações da lipogênese (Figura 3) (EBERLE *et al.*, 2004). Os SREBP são sintetizados como precursores inativos vinculados à membrana do retículo endoplasmático. Após a ativação, o precursor sofre uma clivagem seqüencial em duas etapas do processo e ocorre a liberação da região NH(2)-terminal, a qual é transportada para o núcleo, ativando o domínio nuclear de SRBPs (nSRBPs) (Figura 4).

De acordo com Rudolph *et al.* (2007), os SREBP e, especificamente, a isoforma SREBP1c, aumentam rapidamente a síntese lipídica nas glândulas mamárias de camundongos no início da lactação. A interferência na expressão desse gene (SREBP1c) resulta na diminuição de 41% na quantidade da gordura do leite em camundongos (RUDOLPH *et al.*, 2005). Este resultado é semelhante à máxima redução da gordura do leite (50%) observado quando os animais foram tratados com o isômero *trans-10, cis-12* (BAUMAN e GRIINARI, 2003; de VETH *et al.*, 2004). Baseado nisso, Peterson e colaboradores avaliaram o sistema regulatório de SREBP em células mamária bovina (linhagem MAC-T) e observaram diminuição na abundância dos fragmentos nucleares ativos da proteína SREBP1 durante a inibição da síntese de ácidos graxos pelo isômero de CLA *trans-10, cis-12* (PETERSON *et al.* 2004).

A SREBP1 é altamente expressa em tecido mamária de bovino. As recentes investigações demonstraram que a expressão de SREBP1 e as proteínas envolvidas na sua ativação e translocação para o núcleo foram reduzidas nas células tratadas com CLA *trans-10, cis-12* (HARVATINE e BAUMAN, 2006).

Normalmente os mamíferos apresentam um sistema redundante de regulação e amplificação de sinalização dos processos bioquímicos. Spot 14 (S14) é um ativador do SREBP1, gene que codifica uma proteína nuclear que está intimamente associado à regulação da síntese dos ácidos graxos em tecidos, incluindo a lipogênese (CUNNINGHAM *et al.*, 1998). Embora sua função bioquímica ainda não seja totalmente elucidada, S14 tem sido associada à regulação transcricional dos genes envolvidos na lipogênese. Camundongos nocaute para S14 têm redução na concentração de gordura do leite, como resultado da diminuição da síntese de ácidos graxos pela via *de novo*, embora as atividades das enzimas lipogênica não fossem alteradas (ZHU *et al.*, 2005).

Harvatine e Bauman, (2006) observaram redução na expressão de S14 nas vacas lactentes durante o tratamento com CLA *trans-10, cis-12*. Usando dados de *microarray* de estudos com camundongos, Harvatine e Bauman (2006) relataram uma redução significativa na expressão do S14 no tecido adiposo, cuja massa foi reduzida pela suplementação com CLA. Dessa forma especula-se que S14 também está envolvido no mecanismo pelo qual o CLA, regula o metabolismo lipídico,

através do fator de transcrição SREBP.

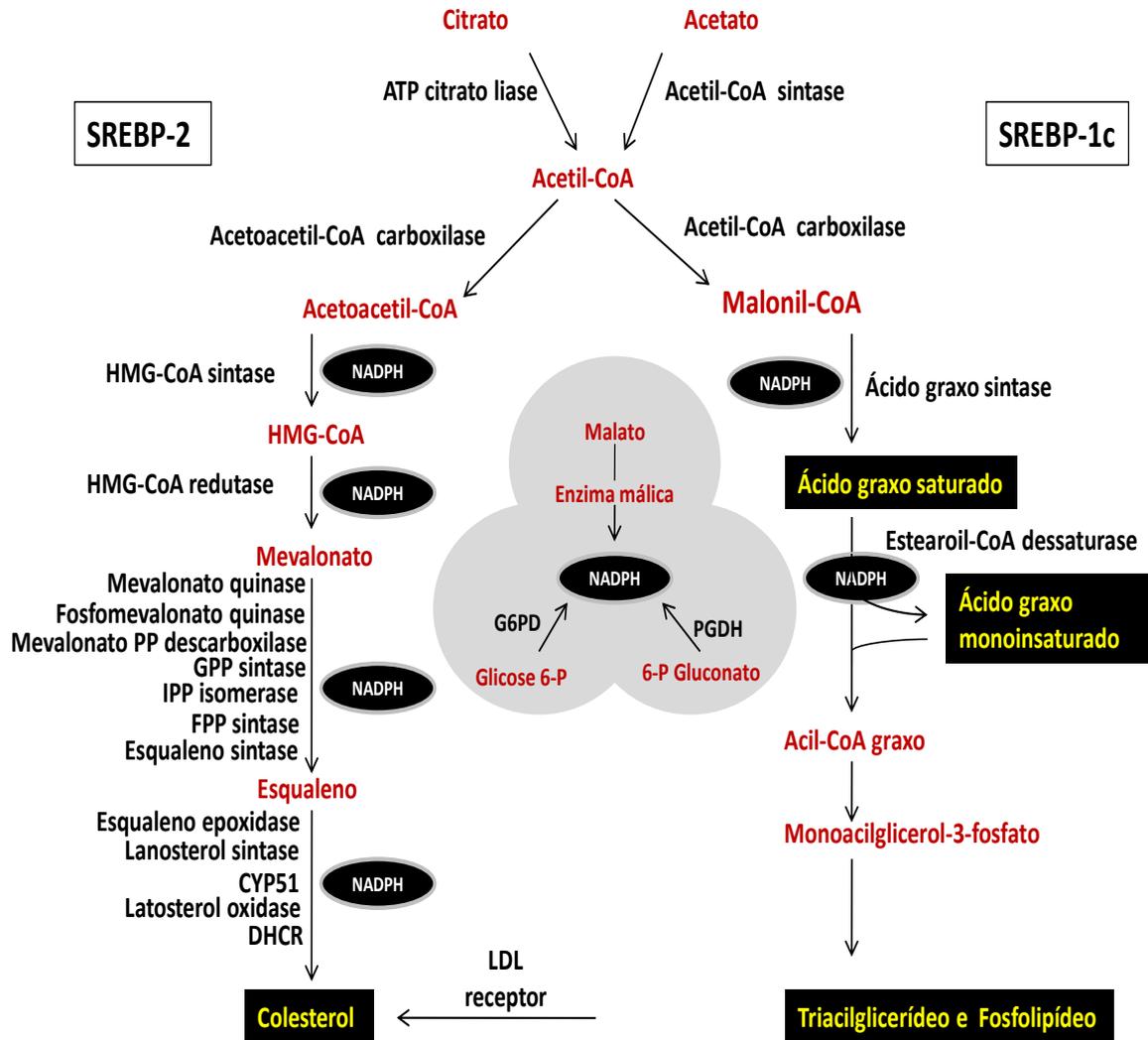


Figura 3 - Genes regulados por SREBPs. O diagrama mostra as principais vias metabólicas para intermediários na síntese de colesterol, ácidos graxos e triglicérides. SREBP-2, ativa preferencialmente genes relacionados ao metabolismo do colesterol, enquanto que SREBP-1c ativa preferencialmente genes relacionados com metabolismo de ácidos graxos e triglicérides. Fonte: Horton *et al.* (2002).

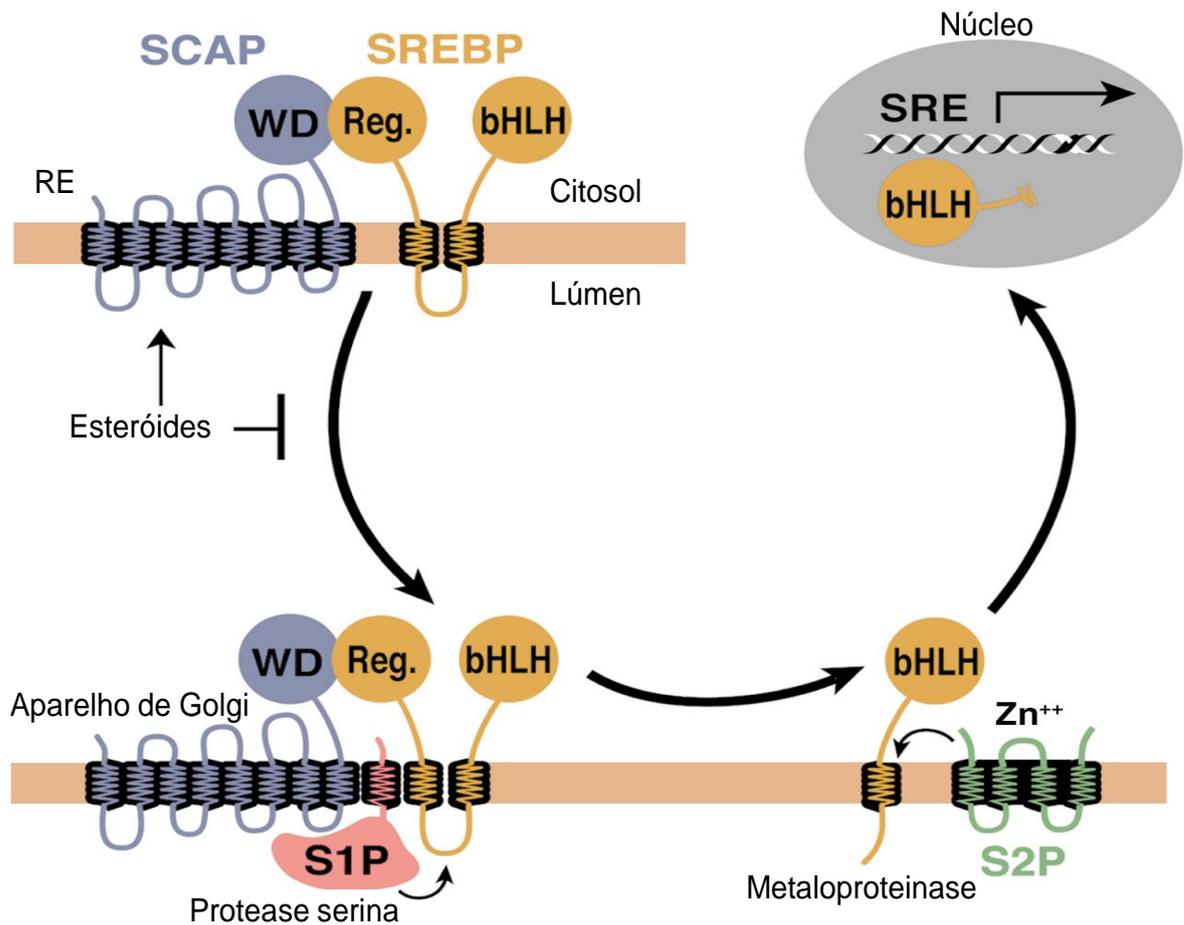


Figura 4 - Modelo proteolítico de liberação do esterol SREBPs nas membranas. SCAP é um sensor de esteróis e é uma escolha de SREBPs. Quando reduz a quantidade de esteróis nas células, SCAP transporta SREBPs do retículo endoplasmático (RE) para o aparelho Golgi, onde se localiza duas proteases, Site-1 protease (S1P) e Site-2 protease (S2P), que atuam seqüencialmente para liberação de NH₂-terminal, domínio bHLH-Zip da membrana. O domínio bHLH-Zip entra no núcleo e se liga a um elemento de resposta esterol (SRE) na região promotora dos genes alvo, ativando a sua transcrição. Quando colesterol celular aumenta, o complexo SCAP e SREBP não são incorporada ao RE vesícula transportadora, os SREBPs não chegam ao aparelho de Golgi e as domínio bHLH-Zip não pode ser liberada a partir da membrana. Como resultado, declina a transcrição de todos os genes alvo. Fonte: GOLDSTEIN *et al.* (2002).

1.2.4 Metabolismo do CLA

Em 2001, foi sugerido por Sebedio e colaboradores que o isômero de CLA *trans-10, cis-12*, é metabolizado a *trans-8, cis-10* dieno conjugado CD16:2, provavelmente pela β -oxidação peroxissomal (SEBEDIO *et al.* 2001). Para testar essa hipótese Banni *et al.* (2004) utilizaram células de fibroblasto de pacientes portadores de adrenoleucodistrofia (ALD), (doença neurodegenerativa, caracterizada pela alteração na atividade peroxissomal, que leva acúmulo excessivo de ácidos graxos de cadeia longa), para avaliar o acúmulo de metabólito de CLA (CD16:2), e observaram que a formação de metabólitos de CLA (CD16:2) foi significativamente menor no fibroblastos de pacientes portadoras de ALD (73% em pacientes com ALD do tipo 1 (ALD1) e 35% nos pacientes com ALD do tipo 2 (ALD2)) em relação ao grupo controle (pessoas saudáveis). Esses dados reforçam a hipótese proposta por Sebedio e colaboradores de que o metabolismo de CLA ocorre nos peroxissomos (SEBEDIO *et al.*, 2001).

Baseado nisso foi proposto à seguinte via de metabolismo de CLA, em tecidos animais: CLA sofre dessaturação no carbono 6 (C Δ 6) alongação e mais uma dessaturação C Δ 5, enquanto mantém consistentemente a sua estrutura dieno conjugada. Dessa forma o CD18:2 sofre dessaturação para formar CD18:3 (através da introdução de uma ligação dupla na posição 6). Uma vez formada a CD18:3, pode ocorrer a adição de dois átomos de carbono dando origem a CD20:3, ou CD18:3 sofre β -oxidação e perde dois átomos de carbono formando CD16:3. Caso ocorra a formação de CD20:3, este pode sofrer dessaturação e formar CD20:4 (introdução de uma ligação dupla na posição 5). Tanto CD20:3, como CD20:4 podem ser metabolizados e darem origem a CD16:3 Fig. 2 (BENNI, 2002).

De acordo com as evidências acumuladas, parece que os metabólitos formados dependem das condições experimentais. Belury e Kempsteczko (1997) relataram a presença de apenas CD18:3 em tecidos de ratos, entretanto, Thompson *et al.* (1997), Banni *et al.* (1995) e Banni *et al.* (1999) detectaram a presença tanto de metabólitos CD18:3 como CD20:3, quando ratos foram alimentados com a mistura de CLA, assim como quando foram alimentados com isômeros puro (SEBEDIO *et al.*, 2001). No caso de isômero *trans-10, cis-12* 18:2 puro, a quantidade de CD18:3 é

maior do que a quantidade de CD20:3 (SEBEDIO *et al.*, 2001), possivelmente devido à dificuldade na elongação de cis-6, trans-10, cis-12 18:3. Por outro lado, CD20:4 foi detectado somente em tecidos de ratos alimentados com uma dieta pobre em ácido linoléico como é o caso de uma dieta sem gordura (BANNI *et al.*, 2001).

Trabalhando com tecido adiposo, fígado, cérebro e células de plasma, Fa *et al.* (2005) demonstraram que o oposto do isômero *cis-9, trans-11*, o isômero *trans-10, cis-12*, é rapidamente β -oxidado a CD16:2 ou $\Delta 6$ dessaturado a CD18:3, além disso não foi detectado nenhum produto de elongação de CD20:3 de *trans-10, cis-12*, sugerindo que este isômero tem mais dificuldade para sofrer elongação a CD20:3 do que *cis-9, trans-11*.

Até então os únicos isômeros de CLA cujo metabolismo foi demonstrado desta forma são *cis-9, trans-11* e *trans-10, cis-12*. Segundo Sebedio *et al.* (1997) os outros isômeros não são metabolizados por esta via, entretanto a falta da amostra dos outros isômeros na forma pura tem sido um fator limitante para realizações de estudos que comprovam essa hipótese (Benni *et al.*, 2002).

Tendo em vista o exposto acima o uso de CLA *trans-10, cis-12*, no meio de cultivo pode representar uma importante estratégia para controle do acúmulo de lípidos nos embriões durante o cultivo *in vitro*.

β -Oxidação Peroxissomal

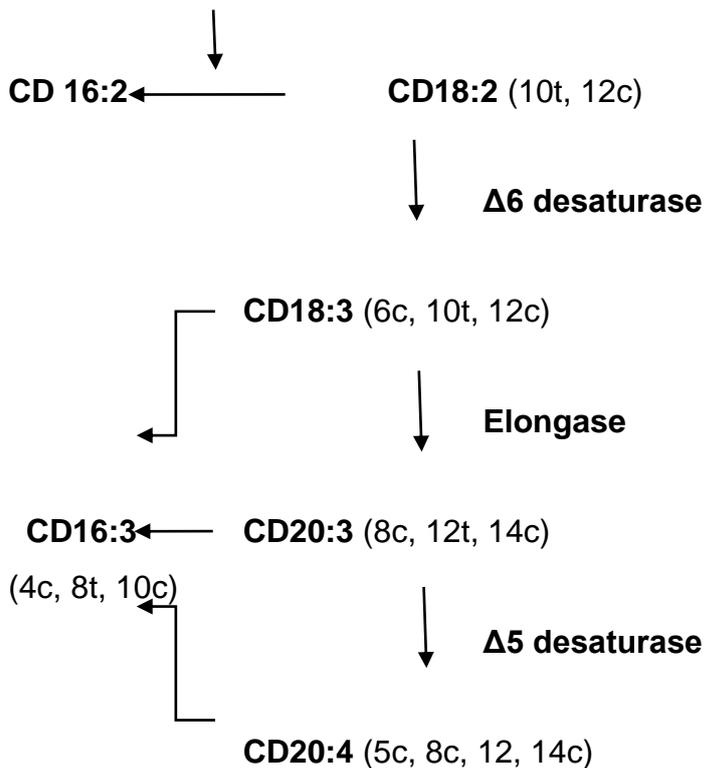


Figura 5 - Metabolismo de CLA. Os únicos isômeros de ácido linoléico conjugado (CLA) que têm sido demonstrado a ser metabolizado dessa forma são *cis-9, trans-11* e *trans-10, cis-12* que podem ser submetidos à dessaturação $\Delta 6$, alongamento e mais uma dessaturação $\Delta 5$, enquanto mantêm a estrutura CD. Assim, eles formam CD18:3 (através da introdução de uma ligação dupla na posição 6), CD20:3 (adicionando dois átomos de carbono) e CD20:4 (através da introdução de uma ligação dupla na posição 5). Os metabólitos com 16 átomos de carbono, provavelmente derivado de β -oxidação peroxissomal, também foram detectados, o CD16:2, que provavelmente foi derivado de CD18:2 e CD16:3, que devem ter sido derivados de CD18:3, CD20:3 e CD20:4. Fonte: Adaptado de Banni (2002).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito da suplementação de CLA (isômero *trans-10, cis-12*) como alternativa de reduzir o acúmulo de lípidos nos embriões bovino produzido *in vitro*.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar o efeito da adição de CLA (isômero *trans-10, cis-12*), na produção *in vitro* de embriões bovinos sem antioxidante e com uma única renovação do meio;
2. Avaliar acúmulo de lípidos em embriões bovinos cultivados no meio contendo CLA (isômero de *trans-10, cis-12*) sem antioxidante e com uma única renovação do meio;
3. Avaliar a expressão gênica das enzimas lipogênicas (acil-CoA, ácido graxo síntase e acilglicerol fosfato aciltransferase), proteínas relacionadas com estresse celular (Hsp70.1 e PRDX.1) e apoptose (Bax e Bcl-2) em embriões cultivados no meio suplementado com CLA *trans-10, cis-12*, sem antioxidante e com uma única renovação do meio;
4. Avaliar a sobrevivência dos embriões cultivados na presença de CLA isômero *trans-10, cis-12* após a criopreservação;

3 MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com a parceria estabelecida entre a Universidade Federal de Juiz de Fora e a Embrapa Gado de Leite, as atividades experimentais foram desenvolvidas nos Laboratórios de Reprodução Animal e Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG.

3.1 Delineamento experimental

Com o objetivo de avaliar o efeito do isômero de CLA *trans-10, cis-12* (Matreya, ref. 001249) no meio de cultivo dos embriões bovino, foram utilizado um total de 1.694 presumíveis zigotos, divididos em dois tratamentos: T1 = grupo controle (n = 817) e T2 = grupo suplementado com CLA *trans-10, cis-12* (n = 877). Os presumíveis zigotos foram obtidos de 11 repetições, dos oócitos oriundos de ovários de abatedouro e fecundados com sêmen holandês, cuja eficiência de produção *in vitro* de embrião foi previamente avaliada. Para atingir os objetivos propostos no presente estudo foi seguido o desenho experimental do diagrama abaixo Figura 6. Após a maturação e fecundação *in vitro*, os possíveis zigotos foram divididos em dois tratamentos (T1 = grupo controle, embriões cultivados no meio CR2aa sem CLA *trans-10, cis-12* e T2 = embriões cultivados no meio CR2aa com 100 µM de CLA *trans-10, cis-12*). No segundo dia de cultivo (D2) foi renovado 50% do meio de cultivo (CR2aa) e a taxa de clivagem avaliada (porcentagem dos embriões clivados em relação ao total dos possíveis zigotos colocados no cultivo). No D5 os embriões dos dois tratamentos no estágio de mórula foram fixação para posterior quantificação do conteúdo lipídico com o corante *Nile Red* de acordo com a metodologia descrita no item 3.3. No D7 parte dos blastocistos obtidos (T1 (n = 30) e T2 (n = 30)) de Grau I e II foram colocados em criotubos com 2 µL do meio TALP-Hepes (10 embriões/criotubo) e congelados em N₂ líquido e posteriormente estocados a -80 °C até a extração do RNAm para análise dos transcritos alvos (item 3.4). Outra parte foi submetida ao congelamento lento para avaliar a taxa de

sobrevivência após o descongelamento (item 3.5). No D8 todos os blastocistos obtidos de T1 e T2 foram submetidos ao congelamento lento. Taxa de blastocisto foi avaliado no D8 contabilizando todos os embriões produzidos no D7 e D8 (porcentagem de todos os blastocistos produzidos em relação ao total dos possíveis zigotos colocados no cultivo).

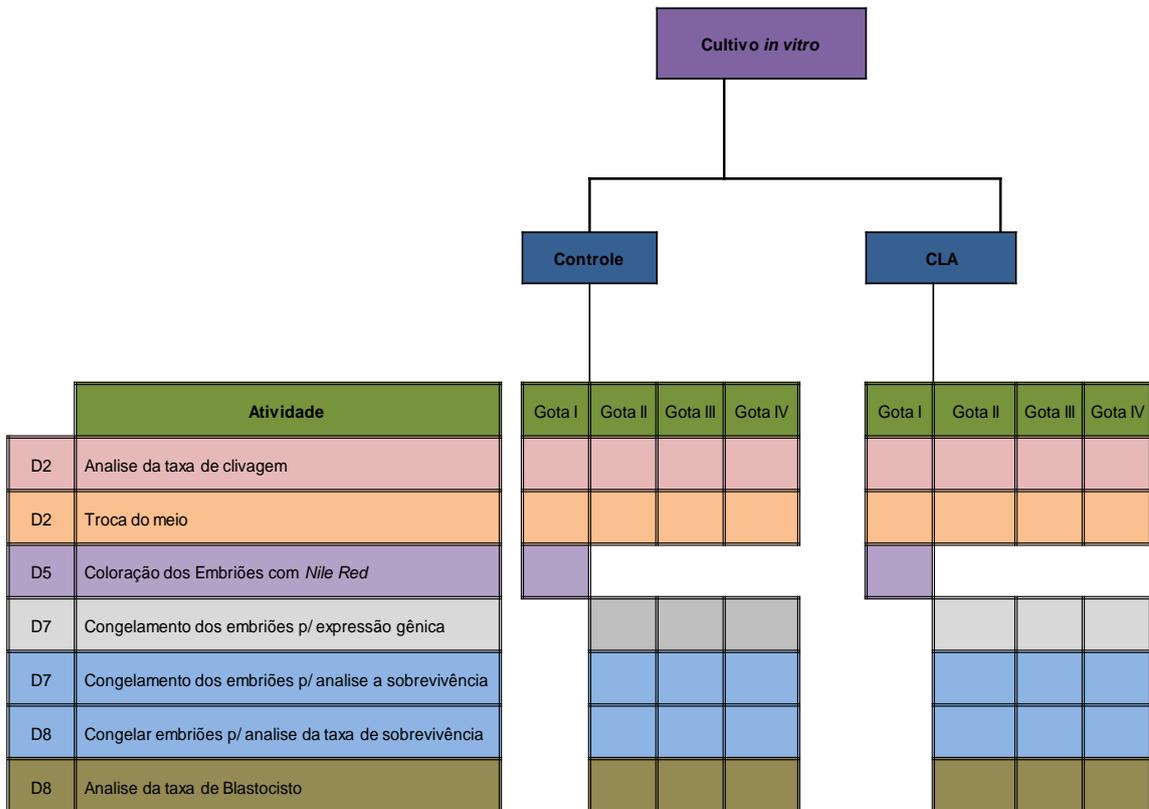


Figura 6 – Delineamento experimental

3.2 Metodologia

3.2.1 Coleta dos ovários

Os ovários coletados do abatedouro local foram transportados para o laboratório em solução fisiológica (0,9% NaCl) contendo antibiótico (0,05g/L de sulfato de estreptomicina), aquecida a 35°C. No laboratório, após subseqüentes lavagens em solução fisiológica, os folículos de 3-8 mm foram aspirados com auxílio de uma agulha acoplada a uma seringa de 10 mL, e os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) de graus I e II (VIANA *et al.*, 2004), foram selecionados com auxílio de um estereoscópico. Em seguida, os COCs graus I e II foram lavados duas vezes em meio TALP-Hepes e uma vez em TCM-199 (Gibco), e colocados para a maturação.

3.2.2 Produção *in vitro* de embriões

3.2.2.1 Maturação *in vitro* dos complexos *cumulus* oócitos (COCs)

A maturação *in vitro* dos COCs foi realizada em meio TCM 199 (Gibco) acrescido de 10% de soro de vaca em estro e 20µg/mL de FSH, em poços com 400µL, na estufa incubadora a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas.

3.2.2.2 Fecundação *in vitro* dos oócitos

Os COCs maturados *in vitro* foram fecundados *in vitro*, utilizando sêmen previamente avaliado. Para preparação dos espermatozóides foi utilizado o método do gradiente de Percol (*Invitrogen*). A fecundação foi realizada na gota de 100µL de meio FERT-TALP contendo 10µL/mL de heparina e com 2x10⁶ espermatozóides/mL,

sob óleo mineral, por um período de aproximadamente de 18-20 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação *in vitro*.

3.2.2.3 Cultivo *in vitro* dos embriões

Para o cultivo os presumíveis zigotos foram divididos e cultivados na presença e ausência de CLA *trans-10*, *cis-12*, T1 e T2 respectivamente. O meio-base para os dois tratamentos foi CR2aa contendo 10% de soro fetal bovino. Os embriões foram co-cultivados com células da granulosa nas mesmas condições de fecundação em gotas de 50µL, sob óleo mineral. Após 72 horas do início do cultivo, 50% do meio foi renovado e a taxa de clivagem avaliada. No sétimo e oitavo dia após a fecundação a taxa de blastocisto foi avaliada.

3.3 Análise lipídica

3.3.1 Coloração da amostra

Os embriões livres das células do *cumulus* foram fixados em uma solução de 500 µl de 2% glutaraldeído e 2% formaldeído, por pelo menos 24h. Decorrido esse tempo foram transferidos para tubos de plásticos (1 embrião/frasco plástico) contendo 30 µL de 10 µg / ml de *Nile Red* (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, E.U.A.) dissolvido em salina fisiológica (0,9% NaCl) com 1mg/ml de polivinilpirrolidona. As amostras foram coradas no escuro a temperatura ambiente por 24 horas. A solução de *Nile Red* estoque (1mg/ml) foi preparada por diluição em DMSO e armazenada à temperatura ambiente no escuro. Concentração final foi obtida diluindo o estoque com a solução salina com 1mg/ml de polivinilpirrolidona.

3.3.2 Quantificação da fluorescência

As gotículas de lípidos foram visualizadas usando um microscópio fluorescência com objetiva de 10x. A quantidade de luz fluorescente emitida por toda amostra (embrião) foi avaliada em 582 ± 6 nm com um microscópio de fluorescência invertido (Excitação: 400-500nm e Emissão: 515LP) usando a objetiva de 10x. A fluorescência foi quantificada utilizando *Software* QUANTPORO. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência. O filtro luz UV foi utilizado para evitar o branqueamento.

3.4 Expressão gênica

3.4.1 Extração e amplificação do RNA

O total de RNA foi extraído dos embriões (T1 = 30 e T2 = 30) utilizando kits apropriados para extração de pequenas amostras (RNeasy Micro Kit, Quiagen), seguindo-se as recomendações do fabricante. A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se 8 μ L da solução com RNA, 200 U de Superscript II RT (Invitrogen) e 1 μ L de oligo-dT₁₈ primers (0,5 mg/ μ L), 1 μ L de dNTPs (10mM), 2 μ L de tampão RT, 4 μ L de MgCl₂ (25 mM), 2 μ L de DTT (0,1 M) e 40 U de RNaseOUT (inibidor de RNase) em 20 μ L de solução. A reação de síntese do cDNA foi conduzida por 50 min a 50°C seguidos de 5 min a 85°C e resfriamento no gelo. Em seguida, foi adicionado 2 U de RNase H e o conteúdo incubado por mais 20 min a 37°C e então resfriado no gelo. O cDNA produzido foi armazenado a -70°C até o momento da reação de PCR.

3.4.2 Análise da expressão dos genes alvos

A quantificação do cDNA foi feita utilizando-se a metodologia de *Real Time PCR*. As reações foram realizadas utilizando-se o kit comercial com *SYBR® Green*,

de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, a reação contendo cDNA, par de *primers*, Master Mix (dNTPs, referência passiva, SYBER Green, etc.) e 0,1 U Taq DNA polimerase, em um volume final de 25 μ L, foi incubada a 95°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, a temperatura específica de anelamento para cada primer por 15 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Controles negativos foram preparados em que o RNA foi omitido durante a reação de RT. As amostras foram então incubadas no termociclador ABI PRISM[®] 7000 *Sequence Detection System (Applied Biosystems)*.

Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes (acil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, acilglicerol fosfato aciltransferase, Bax, Bcl2 e Glut-4) estão na tabela abaixo.

A análise dos resultados do PCR quantitativo foi realizada usando-se o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, sendo que os resultados foram expressos relativos a um grupo referência. Neste experimento o grupo referência foi o grupo controle ou livre de CLA *trans-10, cis-12*. O C_T dos genes alvo (acil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, acilglicerol fosfato aciltransferase, Bax, Bcl-2 Hsp70.1 PRDX.1 e Glut-4) e dos genes controle endógeno (β -actina ou Histona H2a) foram determinados para cada amostra. A diferença entre o C_T do alvo e o C_T endógeno, denominado ΔC_T , foi calculada para cada amostra nos grupos referência e experimental, objetivando-se normalizar as diferenças nas extrações de RNA e eficiência das reações de transcrição reversa. O ΔC_T de cada gene obtido em cada amostra do grupo experimental foi subtraído do ΔC_T obtido no grupo referência, o resultado obtido foi chamado de $\Delta\Delta C_T$ ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T_{Exp} - \Delta C_T_{Ref.}$). A quantidade do gene alvo no grupo experimental, já normalizada pelo controle endógeno (gene β -actina ou Histona 2a) e pelo grupo referência (ΔC_T do grupo referência), foi calculada usando $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Deste modo, os dados obtidos foram expressos no grupo experimental como X vezes relativas ao grupo referência.

3.5 Criopreservação e sobrevivência dos embriões após o descongelamento

Os blastocistos de sete dias classificados como de graus I e II, segundo Kennedy *et al.* (1983) do grupo controle e suplementado com CLA *trans-10, cis-12* foram lavados em solução de *Dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) acrescida de albúmina sérica bovina (BSA) 0,4% e posteriormente desidratados em solução de etileno glicol 1,5 M em DPBS + 0,4% de BSA, envasados em palhetas de 0,25 ml e transferidos para o congelador automático de embriões com curva de -6 a -35°C e queda de 0,5°C por minuto. A indução da cristalização (*seeding*) foi realizada cinco minutos após a estabilização da temperatura inicial da curva. No descongelamento, cada palheta foi mantida 10 segundos no ar e 20 segundos em banho-maria a 35°C. Os embriões de ambos os tratamentos foram lavados em DPBS acrescida de BSA 0,4% e distribuídos em gotas de 50 µl (15 embriões/gota) de CR2aa com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 72 horas. As taxas de reexpansão e eclosão foram avaliadas 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo. A taxa de sobrevivência (re-expansão e eclosão) foi avaliada pela porcentagem dos embriões re-expandidos, em relação aos descongelados e dos eclodidos em relação aos descongelados.

3.6 Análise estatística

Os parâmetros avaliados da produção *in vitro* de embrião foram taxa de clivagem e blastocisto. Os resultados obtidos da taxa de clivagem e blastocisto de cada bateria foram considerados como unidades de observação. Esses dados foram submetidos a teste de Lilliefors e Cochran & Bartlett para verificação de normalidade e homogeneidade de variâncias respectivamente, antes de serem submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar a diferença estatístico em nível de significância de 5%. Os mesmo testes foram realizados com os dados obtidos da intensidade de fluorescência emitida por embrião para verificar a normalidade e homogeneidade de variância dos dados, antes de serem submetidas à ANOVA para avaliar diferença estatística do conteúdo lipídico, entre os tratamentos em nível de

significância de 5%. Cada embrião foi considerado uma unidade de observação. Valores da expressão relativa dos genes alvos foram avaliados usando o *software* *REST*[®]. Os dados da sobrevivência embrionária após a criopreservação (re-expansão e eclosão) foram analisados pelo Qui-Quadrado.

Tabela 1 – Seqüência de *primers* e temperatura de anelamento específicas para cada gene alvo.

Gene	Seqüência do <i>Primer</i> (5'-3')	Temperatura anelamento	Tamanho Fragmento	Nº de acesso GenBank/Referência
GAPDH (Controle endógeno)	F – 5' CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA 3'	58°C	237	MOUROT et al., (2006)
	R – 5' GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG 3'			
FASN	F – 5' GCACCGGTACCAAGGTGGGC 3'	58°C	171	NM_1012669.1
	R – 5' CGTGCTCCAGGGACAGCAGC 3'			
ACACB	F – 5' CGGTGGTGCAGTGGCTGGAG 3'	58°C	254	XM_867921.3
	F – 5' CAGGAGGACCGGGGTCAGG 3'			
AGPAT1	F – 5' CCGGAAGCGCACTGGGGATG 3'	58°C	170	NM_177518.1
	R – 5' TGGGAACCTGGGCCTGCACT 3'			
PRDX1	F – 5' ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG 3'	53°C	224	MOUROT et al., (2006)
	R – 5' CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG 3'			
HSP70.1	F – 5' AACAAAGATCACCATCACCAACG 3'	59°C	275	NM_174550
	R – 5' TCCTTCTCCGCAAGGTGTTG			
BAX	F – 5' TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA 3'	64°C	174	NM_173894
	R – 5' CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG 3'			
BCL-2	F – 5' TGGATGACCGAGTACCTGAA 3'	53°C	120	XM_586976
	R – 5' CAGCCAGGAGAAATCAAACA 3'			

4 RESULTADOS

4.1 Produção de embrião

Dados do desenvolvimento dos possíveis zigotos cultivados na ausência (T1= controle) e presença de CLA *trans-10*, *cis-12* (T2 = CLA, t10, c12) estão apresentados na Tabela 2. A adição de CLA *trans-10*, *cis-12* no meio de cultivo não afetou significativamente a taxa de clivagem ($p = 0,06$) e produção de blastocisto ($p = 0,20$). A porcentagem total dos blastocistos em relação aos embriões clivados foi de 44,2 e 46,2 para T1 e T2, respectivamente.

Tabela 2 - Desenvolvimento embrionário dos presumíveis zigotos, cultivados no meio CR2aa suplementado com soro (T1 = controle) e suplementado com soro mais CLA *trans-10*, *cis-12*.

Tratamento	Oócitos fecundados	Clivagem D2 n (% \pm EP)	Blastocisto D8 n (% \pm EP)
T1 (Controle)	817	624 (74,5 \pm 2,2)	276 (34,1 \pm 2,6)
T2 (CLA <i>trans-10</i> , <i>cis-12</i>)	877	606 (70,3 \pm 3,2)	280 (31,8 \pm 2,4)

D2 = 72 horas após a fecundação, D8 = 192 horas após a fecundação, (n) = número, EP = erro padrão.

4.2 Quantificação de lípidos

A Figura 7 mostra o resultado da média da intensidade de fluorescência dos embriões (D5) cultivados no meio CR2aa suplementado com 100 μ M de CLA *trans-10*, *cis-12*, e grupo controle cultivados na ausência desse ácido graxo, após a coloração com *Nile Red*. Foi observada diferença estatística significativa ($P = 0,00010$) entre os dois tratamentos, onde a média da intensidade de fluorescência foram 183,9 e 130,4, para grupo controle e suplementado com CLA *trans-10*, *cis-12* respectivamente (unidade arbitraria de fluorescências).

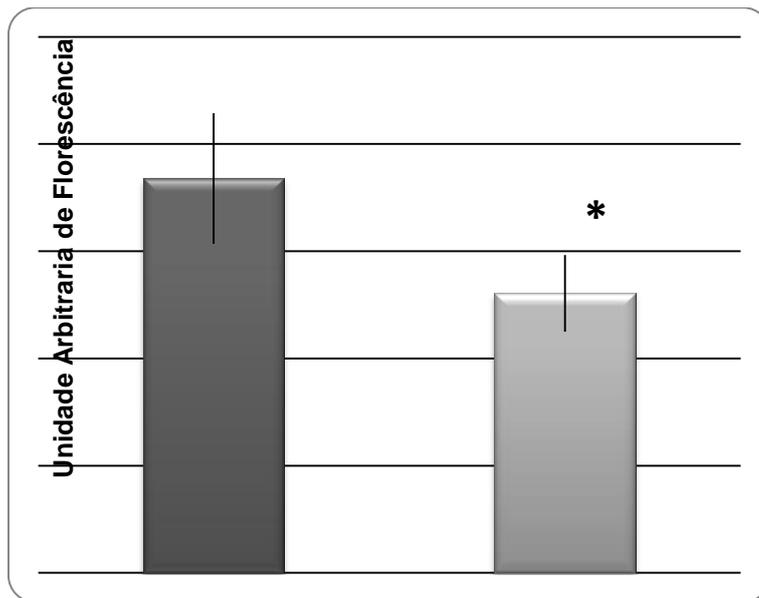


Figura 7 - Intensidade média de fluorescência dos embriões (D5) do grupo controle e grupo suplementada com CLA *trans-10, cis-12*, Resultados expressos com média \pm desvio padrão (n=15). *P = 0.00010, ANOVA.

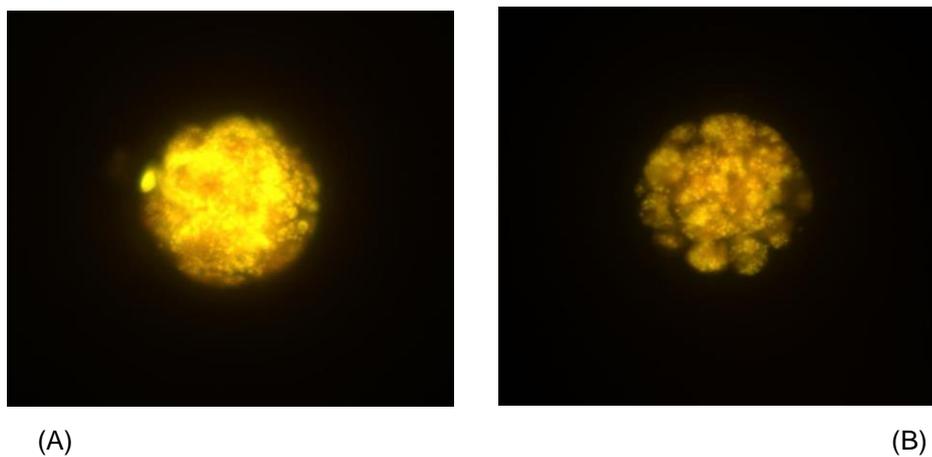


Figura 8 - Embrião bovino produzido *in vitro* e corado com *Nile Red*, no quinto dia de cultivo. (A) grupo controle cultivados na ausência de CLA (*trans-10, cis-12*), (B) grupo suplementado com 100 μ M de ácido linoléico conjugado (CLA) *trans-10, cis-12*.

4.3 Análise dos transcritos alvos

Para avaliar o impacto do CLA (*trans-10, cis-12*) nos embriões obtidos no sétimo dia de cultivo, foi avaliado a expressão dos genes envolvidos no processo de estresse celular (Hsp70.1e PRDX1) e apoptose (Bax e BcL-2). Blastocistos

cultivados no CR2aa suplementado com 100µM de CLA *trans-10, cis-12*, não mostraram efeito significativo na quantidade dos RNAm expressos por genes Hsp70.1 ($0,72 \pm 0,17$), PRDX1 ($1,12 \pm 0,27$), Bax ($0,56 \pm 0,18$,) e Bcl-2 ($1,01 \pm 0,53$,) em relação ao grupo controle ($P = 0,19$, $P = 0,56$, $P = 0,12$ e $P = 0,99$, respectivamente). Adicionalmente a análise dos transcritos dos genes relacionados com a síntese dos ácidos graxos (acetil-CoA carboxilase (ACAC), ácido graxo síntase (FASN)) e triglicérides (acilglicerol 3-fostato aciltransferase), também foram avaliados, para determinar a via pelo qual o CLA *trans-10, cis-12*, suprime o acúmulo de lípides nos embriões. Blastocistos cultivados no meio suplementado com CLA, *trans-10, cis-12*, mostraram redução significativa ($P = 0,009$) na quantidade dos transcritos do gene acilglicerol 3-fostato aciltransferase ($0,16 \pm 0,09$). No entanto a expressão dos genes acetil-CoA carboxilase ($0,6 \pm 0,21$, $P = 0,18$) e ácido graxo síntase ($0,68 \pm 0,3$, $p = 0,30$) não foram afetadas significativamente (Figura 9).

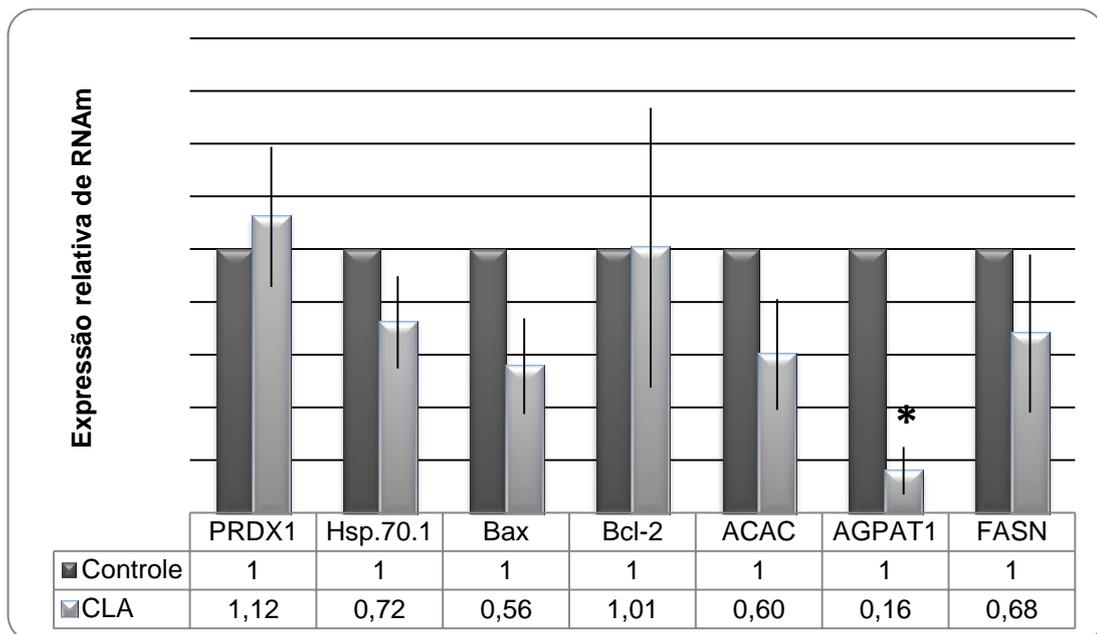


Figura 9– Quantificação relativa dos transcritos dos genes envolvidos no estresse celular (PRDH1 e Hsp70.1), processo apoptótico (Bax e Bcl-2), síntese de ácido graxo (ACAC1 e FASN) e triglicérides (AGPAT1) pela técnica de *Real-Time* PCR em embriões cultivados na presença e ausência de CLA (*trans-10, cis-12*). * $P = 0,009$.

4.4 Sobrevivência dos embriões após a criopreservação

O resultado da análise estatística realizado pelo Teste Qui-Quadrado mostrou diferença significativa ($P = 0,002$), quanto à taxa de re-expansão dos embriões cultivados no meio suplementado com CLA (*trans-10, cis-12*) em relação ao grupo controle após o descongelamento Tabela 3. No entanto, essa diferença não persiste quando compararmos a taxa de eclosão ($P = 0,62$) entre os dois tratamentos. A comparação da taxa de eclosão dos embriões fresco cultivados no meio suplementado com CLA *trans-10, cis-12*, não diferiu estatisticamente da taxa de eclosão dos embriões fresco do grupo controle ($P = 0,16$). A taxa de eclosão dos embriões congelados cultivados na presença de CLA *trans-10, cis-12* diferiram significativamente dos embriões frescos cultivados na presença do mesmo ($P < 0,0001$). Resultado semelhante foi observado quando se comparou embriões fresco e congelado do grupo controle ($P < 0,0001$).

Tabela 3 - Sobrevivência dos embriões após o cultivo (taxa de re-expansão e eclosão)

	Tratamento	Embriões n	Taxa de re-expansão n (%)	Taxa de Eclosão n(%)
Fresco	T1 (Controle)	49	49 (100)	38 (77,6) ^a
Fresco	T2 (CLA <i>trans-10, cis-12</i>)	44	44 (100)	39 (88,6) ^a
Descongelado	T1 (Controle)	93	32 (34,4) ^a	13 (14,0) ^b
Descongelado	T2 (CLA <i>trans-10, cis-12</i>)	103	58 (56,3) ^b	17 (16,5) ^b

Os embriões foram obtidos do somatório de cinco experimentos independentes. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo Teste Qui-quadrado ($P < 0,01$).

5 DISCUSSÃO

A baixa sobrevivência dos embriões bovinos produzido *in vitro*, após a criopreservação, é um grande obstáculo para a aplicação comercial extensiva desta biotecnologia. Neste contexto, o ácido linoléico conjugado, especificamente o isômero *trans-10, cis-12*, representa uma importante alternativa para contornar esse obstáculo, através da redução do alto conteúdo lipídico, que afeta a criopreservação. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que além da via apoptótica clássica (via mitocondrial) este ácido graxo pode induzir apoptose através da via do retículo endoplasmático (RE), por elevar os níveis de radicais livres (HANADA *et al.*, 2007). Com base nisso, no presente estudo foi avaliado o efeito da adição de CLA *trans-10, cis-12*, no meio de cultivo de embriões bovino, sem antioxidante e com uma única renovação de meio de cultivo, como alternativa de reduzir o conteúdo de lípidos presente intracitoplasmática dos embriões PIV. Os resultados obtidos mostram que a capacidade do desenvolvimento e a expressão dos genes relacionados a estresse celular e apoptose não são significativamente afetados nos embriões cultivados na presença de CLA *trans-10, cis-12*.

A análise dos transcritos do gene PRDX.1 membro da família peroxidase, envolvida na proteção contra os efeitos deletérios da oxidação na célula não foram afetados de forma significativa na presença de CLA *trans-10, cis-12*, apesar de Reis e colaboradores terem demonstrado que embriões cultivados em condições ricos em ácidos graxos são mais vulneráveis ao estresse oxidativo (REIS *et al.*, 2003). Segundo Banni *et al.* (2004), o catabolismo de CLA *trans-10, cis-12* ocorre preferencialmente nos peroxissomos, o que eleva os níveis de H₂O₂, uma vez que nesta organela, a primeira reação de β-oxidação (desidrogenação), ao invés de produzir FADH, produz H₂O₂. Esse resultado sugere baixa taxa metabólica ou ausência do metabolismo dos ácidos graxos durante o período pré-implantacional.

BAX é um gene regulador de apoptose, que leva a degradação do DNA pelas caspases após a indução da liberação do citocromo C das membranas mitocondriais. A expressão dessa proteína pró-apoptótico (Bax) não foi afetada em blastocistos produzidos na presença de CLA *trans-10, cis-12*, em comparação com o

controle, indicando que esses embriões são de mesma qualidade (RIZOS *et al.*, 2003). Ou e colaboradores, demonstraram que Bcl-2 desempenha importante função no efeito apoptótico de CLA *trans-10, cis-12*, tanto na via mitocondrial como na via de estresse do retículo endoplasmático, reduzindo a expressão desta proteína, cuja superexpressão atenua os efeitos apoptóticos (OU *et al.* (2007). No entanto, o gene anti-apoptótico Bcl-2 também não foi afetado em embriões cultivados na presença de CLA *trans-10, cis-12* em comparação com o grupo controle. Segundo Augustin *et al.* (2003), a proporção de Bcl-2 e Bax podem ser utilizados para avaliar a tendência quer para a sobrevivência ou apoptose dos oócitos e embriões. Um grande número de blastômeros apoptóticos pode levar à morte embrionária precoce, anomalias fetais e abortos precoces (BRILL *et al.*, 1999).

Adicionalmente, a expressão da proteína de choque térmico 70 (Hsp70) não foi afetada em blastocisto cultivado na presença de CLA em relação ao grupo controle. Hsp70 são pequenas proteínas conhecidas como chaperona, que se ligam em seqüências hidrofóbicas expostas e mantêm a cadeia peptídica desenovelada até que ela possa assumir a conformação tridimensional correta em situações de estresse e bloqueando a indução do apoptose. Em situações de estresse térmico, bem como outros estímulos de estresse (KIANG *et al.*, 1998) ocorre superexpressão dessa proteína como forma de prevenir conformação tridimensional incorreta das proteínas. Segundo Wrenzycki *et al.* (2001) e Camargo *et al.* (2007), a expressão dessa proteína pode ser utilizada como um indicador de estresse em embriões bovinos.

Os efeitos apoptóticos de CLA *trans-10, cis-12* parece ser seletiva as células pré-neoplásicas, neoplásicas e com alta taxa metabólica, devido à resistência a esses efeitos observada em algumas células normais com baixa taxa metabólica (Ou *et al.*, 2008). Thompson *et al.* (1997) e Ip *et al.* (2007) demonstraram que células epiteliais mamária de ratos e camundongos normais indiferenciadas são resistentes aos efeitos apoptóticos desencadeados pelo CLA *trans-10, cis-12*. No entanto, quando essas células se diferenciarem e tornarem ativos na síntese e secreção de grandes quantidades de lípidos e proteínas são altamente susceptíveis aos efeitos apoptótico desencadeado por esse ácido graxo (IP *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem que a cascata apoptótica induzida pelo isômero de CLA *trans-10, cis-12* é

seletiva às células com alta taxa metabólica e de replicação, possivelmente devido à priorização da molécula de glicose para produção de açúcares ribose utilizada na síntese dos ácidos nucleicos, enquanto que o ácido graxo é usado como molécula precursora para produção de acetil-CoA. Considerando essa hipótese, o efeito apoptótico do CLA *trans-10, cis-12* era esperado nos embriões após a ativação do genoma embrionária, devido à elevação na taxa metabólica e de replicação. No entanto, isso não foi observado, sugerindo que os ácidos graxos não são utilizados como fonte de energia após a ativação do genoma embrionário, provavelmente, devido à priorização desta molécula para síntese de fosfolípides necessária para construção da membrana plasmática. Corroborando com essa hipótese, Ferguson e Leese (1999) reportaram manutenção na quantidade dos triglicérides nos embriões produzidos *in vivo* após a fase de duas células, até o blastocisto, enquanto que embriões produzidos *in vitro* na presença de 10% de soro a quantidade dos triglicérides aumentou, de forma constante, até o estágio de blastocisto. Sustentando ainda essa hipótese, foi observado no presente estudo menor aderência das células-do-cúmulo em co-cultivo com embriões na presença de CLA *trans-10, cis-12*, em comparação com o grupo controle, indicando aumento do apoptose nessas células (dados não mostrados).

O congelamento lento dos embriões (resfriamento de 0,5°C/minuto) cultivados no meio contendo CLA *trans-10, cis-12* apresentaram índices de re-expansão superior aos embriões cultivados na ausência deste ácido graxo (grupo controle). O mesmo foi observado por Pereira e colaboradores (2006) que relataram a taxa de re-expansão de 63,7% e 34,7% dos embriões cultivados na presença de CLA *trans-10, cis-12* e controle, respectivamente. Esses resultados demonstram que adição de CLA *trans-10, cis-12* no meio de cultivo aumenta a capacidade do embrião em retomar o seu desenvolvimento após a criopreservação.

Segundo Pereira *et al.* (2006), o aumento na capacidade de sobrevivência dos embriões após o descongelamento é devido aos efeitos específico desse isômero de reduzir a síntese de lípidos, através da redução na expressão e atividade das enzimas que participam da síntese e absorção do lípidos (PETERSON *et al.*, 2003; GRANLUND *et al.*, 2005).

No presente estudo, os embriões cultivados na presença de *trans-10, cis-12*,

mostraram redução significativa na quantidade de lípidos em relação ao controle. Adicionalmente, a análise dos transcritos envolvidos na lipogênese acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase e acilglicerol 3-fostato aciltransferase foram avaliados com finalidade de determinar a via pelo qual o CLA *trans-10, cis-12*, suprime o acúmulo de lípidos. A expressão das enzimas envolvidas na síntese *de novo* dos ácidos graxos (acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase) não foram afetados significativamente. Entretanto, a expressão do acilglicerol 3-fostato aciltransferase catalisadora da reação de síntese de triglicérides foi significativamente reduzido nos blastocistos cultivados no meio suplementado com CLA, *trans-10, cis-12*. Esses resultados demonstram que a via pelo qual o CLA reduz a quantidade de lípidos nos embriões produzidos *in vitro* é através da redução dos transcritos de 1-acilglicerol-3-fostato o-aciltransferase, enzima envolvida na montagem de triglicérides. A redução na expressão dessa enzima, associada à redução no acúmulo de lípidos, sugerem que a principal via pelo qual o embrião sintetiza triglicérides, componente fundamental das gotículas lipídicas acumulada nos embriões, é através da montagem dos ácidos graxos presente no soro internalizado na célula, possivelmente, devido à presença de lipoproteínas presentes no soro (FERGUSON *et al.*, 1999; SATA *et al.*, 1999).

Em estudo visando melhorar a criopreservação dos embriões bovino, Hochi *et al.* (1999) adicionaram ácido linoléico (AC) no meio de cultivo CR1aa, contendo soro e observaram a sobrevivência após a criopreservação de 32%, 55% e 60% em embriões cultivados em meio contendo 0,0%, 0,03% e 0,1% de ácido linoléico, respectivamente. A explicação proposta pelos autores é que a presença de ácidos graxos no meio de cultivo aumenta a sobrevivência dos embriões, possivelmente devido ao aumento na fluidez da membrana, proporcionada pela incorporação direta do ácido linoléico nas membranas do embrião durante o cultivo. O resultado obtido no presente estudo também pode ser explicado por essa incorporação direta do ácido linoléico nas membranas do embrião. Segundo Zeron *et al.* (2002), a suplementação de ácidos graxos poliinsaturados melhora a integridade da membrana oocitária após refrigeração, devido às mudanças no perfil de ácidos graxos da membrana e propriedades físicas. Esta mudança é caracterizada por aumento (aumento na proporção de ácidos graxos insaturados em relação a

saturados nos fosfolípidos das membranas). Resultados semelhantes foram obtidos em oócitos bovinos durante o inverno (Zeron *et al.*, 2001).

Contudo, apesar da diferença significativa na taxa de re-expansão dos embriões cultivados na presença de CLA, em relação ao grupo controle, não foi observada diferença em relação à taxa de eclosão. Este resultado pode ser atribuído à baixa expressão das aquaporinas e/ou baixa atividade da bomba de Na^+/K^+ , o que limita a geração da força necessária para eclosão. As aquaporinas (AQPs) são proteínas de canal transmembrana presente tanto nas células animais como vegetais, que funcionam como canais moleculares da água permitindo a água fluir rapidamente em toda a membrana na direção do gradiente osmótico, principalmente em tecidos epiteliais (SHIELS e GRIFFIN, 1993). Virkki *et al.* (2001) e Barcroft *et al.* (2003) demonstraram que alteração na expressão dessa proteína ou atividade da mesma, afetam de forma significativa a recuperação do volume do blastocisto, interferindo dessa forma na taxa de eclosão.

Outra possível explicação do resultado observado (taxa de eclosão) é o aumento na proporção de células apoptóticas em relação a viáveis após o descongelamento. A sobrevivência do embrião após a criopreservação pode ser afetada pelo tempo de penetração do crioprotetor. Com a redução na quantidade de lípidos intracitoplasmática dos blastômeros, conseqüentemente ocorre aumento da velocidade de influxo do crioprotetor. A manutenção do tempo de exposição ao crioprotetor pode ter exacerbado a ação tóxica do crioprotetor, o que pode aumentar a proporção das células apoptóticas em relação a viáveis. Segundo Tachikawa *et al.* (1993), o tempo ideal de exposição de cada solução deve ser ajustada em função da penetração e da toxicidade do crioprotetor. Estudos adicionais são necessários para avaliar as reais necessidades dos embriões cultivados na presença de CLA (*trans-10, cis-12*) antes, durante e após a criopreservação.

6 CONCLUSÃO

A adição de CLA *trans-10, cis-12* no meio de cultivo reduz o acúmulo de lípidos através da redução na expressão da enzima 1-acilglicerol-3-fosfato o-aciltransferase.

A suplementação de CLA *trans-10, cis-12* no meio de cultivo sem antioxidante e com uma única renovação do meio de cultivo pode ser utilizada como alternativa para redução de lipídios em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Os embriões apresentaram um desenvolvimento normal em relação aos embriões cultivados na ausência deste ácido graxo. Estas observações são consistentes com os dados da expressão dos genes relacionados com estresse celular e apoptose.

Estudos adicionais são necessários para melhor esclarecer os mecanismos relacionados à baixa taxa de eclosão dos embriões cultivados na presença de CLA *trans-10, cis-12*.

7 REFERÊNCIAS

ABD EL RAZEK, I.M.; CHARPIGNY, G.; KODJA, S. MARQUANT-LEGUIENNE, B.; MERMILLOD, P.; GUYADER-JOLY, C.; HUMBLLOT, P. 2000. Differences in lipid composition between *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, **53**: 346.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. 1999. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, **53**: 325-335.

ABE, H.; HOSHI, H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal Reproduction Development**, **49**: 93-202.

ANDO, A.; OGAWA, J.; KISHINO, S. SHIMIZU, S. 2004. Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus plantarum* JCM 1551. **Microbial & Enzyme Technology**, **35**; 40–45.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDODOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. 2001. Glucose transporter expression is developmentally regulated in *in vitro*-derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction**, **60**: 370-376.

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. (2003). Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. **Reproduction**, **126**: 91–99.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A. S. S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. 2007. Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, **15 (4)**: 355-367.

BAGUISI, A.; LONERGAN, P.; OVERSTROM, E.; BOLAND, M. 1999. Vitrification of bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. **Theriogenology**, **55**: 162.

BANNI, S.; ANGIONI, E.; CASU, V. 1999. Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid. **Carcinogenesis**, **20**: 1019-1024.

BANNI, S.; CARTA, G.; ANGIONI, E.; ET AL. 2001. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. **Journal Lipid Research**, **42**: 1056- 1061.

BANNI, S. 2002. Conjugated linoleic acid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, **13**: 261-266.

BANNI, S.; DAY, B.W.; EVANS, R.W. 1995. Detection of conjugated diene isomers of linoleic acid in liver lipids of rats fed a choline-devoid diet indicates that the diet does not cause lipoperoxidation. **Journal of nutritional biochemistry**, **6**: 281-289.

BANNI, S.; PETRONI, A.; BLASEVICH, M.; CARTA, G.; ANGIONIA, E.; MURRU, E.; DAY, B.W.; MELIS, M.P.; SPADA, S.; IP, C. 2004. Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites. **Biochemica et Biophysica Acta**, **1682**: 120– 127.

BARCROFT, L. C.; OFFENBERG, H.; THOMSEN, P.; WATSON, A. J. 2003. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. **Developmental Biology**, **256**: 342–354.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, **70**: 15-29.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review Nutrition**, **23**: 203–227.

- BAUMAN, D.E.; VERNON, R.G. 1993. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. **Annual Review of Nutrition**, **13**: 437-461.
- BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D.E. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. **American Journal Physiology Regulatory Comparative Physiology**, **278**: 179-84.
- BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. 2002. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, **85**: 2155.
- BEE, G. 2000. Dietary conjugated linoleic acids clatter adipose tissue and milk lipids of pregnant and lactating sows. 1997. **Journal of Nutrition**, **130**: 2292-2298.
- BELURY, M.A.; KEMPASTECZKO, A. 1997. Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice. **Lipids**, **32**: 199-204.
- BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, J.; RIBEIRO, J.M.R. 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. **Livestock Production Science**, **63**: 201-211.
- BONI R, TOSTI E, ROVIELLO S, DALE B. 1999. Intracellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. **Biology Reproduction**, **61**: 1050–1055.
- BRILL, A.; TORCHINSKY, A.; CARP, H.; TODER, V. (1999). The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetic** **16**, 512–519.
- BROWN, J.M.; HALVORSEN, Y.D.; LEA-CURRIE, Y.R.; GEIGERMAN, C.; McINTOSH, M.K. 2001. 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. **Journal of Nutrition**, **131**: 2316-2321.

CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; RAMOS, A. A.; SERAPIÃO, R. V.; DE SA, W. F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M. F. M.; DO VALE FILHO, V. R. 2007. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, **68**: 626–632.

CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, D.E.; CORL, B.A.; BAUMARD, L.H.; McGUIRE, M.A.; GIESY, J.G. 1999. An update on conjugated linoleic acid. **Cornell Nutrition Conference Feed Manufacturers**, 93-101.

COAKLEY, M.; ROSS, R. P.; NORDGREN, M.; FITZGERALD, G.; DEVER, R.; STANTON, C. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by humanderived *Bifidobacterium* species. **Journal of Applied Microbiology**, **94**: 138–145.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER D.A.; GRINARI, J.M.; PHILIPS, B.S.; BAUMAN, D.E. 2001. The role of delta-9-desaturase in the production of cis-9, trans-11. **Journal of Nutritional Biochemistry**, **12**: 622-630.

CUNNINGHAM, B.A. MONCUR, J.T.; HUNTINGTON, J.T.; KINLAW, W.B. 1998. “Spot 14” protein: a metabolic integrator in normal and neoplastic cells. **Thyroid**, **8**: 815–825.

DAWSON, R. M. C.; HEMINGTON, N.; HAZLEWOOD, G. P. 1977. On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. **British Journal of Nutrition**, **38**: 225–232.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A.M. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, **24**: 197–204.

DE VETH, M.J.; GRINARI, J.M.; PFEIFFER, A.M.; BAUMAN, D.E. 2004. Effect of CLA on milk fat synthesis in dairy cows: comparison of inhibition by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. **Lipids**, **39**: 365–372.

- DIEZ, C.; BOURHIS, D.L.; HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. 1996. Effect of partial lipid removal from *in vitro* produced bovine zygotes on further development *in vitro* and on the freezing tolerance of blastocysts. **Theriogenology**, **45**: 166.
- DONNAY, I.; LEESE, H.J. 1999. Embryo metabolism during expansion of the bovine blastocyst. **Molecular Reproduction and Development**, **53**: 171–178.
- DUBY, R.T.; HILL, J.L.; O'CALLAGHAN, D.; OVERSTROMEW, BOLAND MP. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. **Theriogenology**, **47**: 332.
- DUGAN, M.E.R.; AALHUS, J.L.; JEREMIAH, L.E.; KRAMER, J.K.G.; SCHAEFER, A.L. 1999. The effects of feeding conjugate linoleic acid on subsequent pork quality. **Canadian Journal of Animal Science**, **79**: 45-51.
- EBERLE, D.; HEGARTY, B.; BOSSARD, P.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, **86**: 839–848.
- FA, M.; DIANA, A. CARTA, G.; CORDEDDU, L.; MELIS, M.P.; MURRUA, E.; SOGOS, V.; BANNI, S. 2005. Incorporation and metabolism of c9,t11 and t10,c12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1736**: 61 – 66.
- FABIAN, D.; KOPPEL, J.; MADDOX-HYTTEL, P. 2005. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. **Theriogenology**, **64**: 221-231.
- FERGUSON, E.M.; LEESE HJ. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal Reproduction Fertility**, **116**: 373–378.
- FISCHER, BAVISTER, B.D. 1993. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, **99**: 673-679.

FLEMING, W.N.; SAACKE, R.G. 1972. Fine structure of the bovine oocyte from the mature graafian follicle. **Journal of Reproduction and Fertility**, **29**: 203-213.

FREI, R.E.; SCHULTZ, G.A.; CHURCH, R.B. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16 cell stage of embryogenesis in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, **86**: 637-641.

GALO, M.G.; UNATES, L.E.; FARIAS, R.N. 1981. Effect of membrane fatty acid composition on the action of thyroid hormones on (Ca^{2+}, Mg^{2+}) adenosine triphosphate from rat erythrocyte. **Journal Biology Chemical**, **256**: 7113-7116.

GARTON, G. A.; LOUGH, A. K.; VIOQUE, E. 1961. Glyceride Hydrolysis and Glycerol Fermentation by Sheep Rumen Contents. **Journal of General Microbiology**, **25**: 215-225.

GOLDSTEIN, J.L.; RAWSON, R.B.; BROWN, M.S. 2002. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, **397**: 139–148.

GRANLUND, L.; PEDERSEN, J. I.; NEBB, H. I. (2005). Impaired lipid accumulation by *trans10*, *cis12* during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1687**: 11–22.

GRIINARI, J.M.; DWYER, D.A.; MCGUIRE, M.A.; BAUMAN, D.E.; PALMQUIST, D.L.; NURMELA, K.V.V. 1998. Trans-octadecenoic acid and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, **81**: 1251-1261.

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V.; BAUMAN, D.E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ desaturase. **Journal of Nutrition**, **130(9)**: 2285-2291.

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D.E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**, **1**: AOCS Press, Champaign, IL.180-200.

GURR, M.I.; HARWARD, J.L. 1991. The nature of lipids and their place in living things. **In Lipid Biochemistry, 4:** 4–9.

HANADA, S., HARADA, M., KUMEMURA, H., BISHR, O. M., KOGA, H., KAWAGUCHI, T., TANIGUCHI, E., YOSHIDA, T., HISAMOTO, T., YANAGIMOTO, C. MAEYAMA, M., UENO, T., AND SATA M. 2007. Oxidative estresse induces the endoplasmic reticulum estresse and facilitates inclusion formation in cultured cells. **Journal Hepatology, 47:** 93–102.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. 1988. Lipid metabolism in the rumem. In: HOBSON, P.N. (Ed.). The rumen microbial ecosystem, **New: Elsevier:** 527.

HARVATINE, K.J.; BAUMAN, D.E. 2006. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. **Journal of Nutriton, 136:** 2468–2474.

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

HOMA, S.T.; BROWN, C.A. 1992. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus- free bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility, 94:** 153–160.

HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **Journal Clinical Investigation, 109:** 1125–1131.

[IBGE, 2008. Em 2007, 35% do rebanho bovino nacional estava na Amazônia Legal. http://www.ecodebate.com.br/2008/11/29/ibge-em-2007-35-do-rebanho-bovino-nacional-estava-na-amazonia-legal/. Acesso em 28 de janeiro de 2010.](http://www.ecodebate.com.br/2008/11/29/ibge-em-2007-35-do-rebanho-bovino-nacional-estava-na-amazonia-legal/)

IP, C.; BANNI, S.; ANGIONI, E. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. **Journal of Nutrition**, **129**: 2135-2142.

IP, C.; IP, M. M.; LOFTUS, T.; SHOEMAKER, S.; SHEA-EATON, W. 2000. Induction of apoptosis by conjugated linoleic acid in cultured mammary tumor cells and premalignant lesions of the rat mammary gland. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, **9**: 689–696.

IP, M. M.; MCGEE, S. O.; MASSO-WELCH, P. A.; IP, C.; MENG, X.; OU, L.; SHOEMAKER, S. F. 2007. The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. **Carcinogenesis**, **28**: 1269–1276.

IP, M. M.; MASSO-WELCH, P. A.; SHOEMAKER, S. F., SHEA-EATON, W. K.; IP, C. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of normal rat mammary epithelial cells in primary culture. **Experimental Cell Research**, **250**: 22–34.

JAVED, M.H.; WRIGHT, R.W. 1991. Determination of pentose phosphate and Embden Meyerhoff pathway activities in bovine embryos. **Theriogenology**, **35**: 1029-1037.

JEFFCOAT. 1979. The biosynthesis of unsaturated fatty acids and its control in mammalian liver. **Essays in Biochemistry**, **15**: 1–36.

JOSÉ, A.A.F.B.V.; GAMA, M.A.S.; LANNA, D.D.P. (2008). Effects of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on gene expression and lipid metabolism of adipose tissue of growing pigs. **Genetic and Molecular Research**, **7 (2)**: 284-294.

KAY, J.K.; MACKLE, T.R.; AULDIST, M.J.; THOMSON, N.A.; BAUMAN, D.E. 2002. Endogenous synthesis and enhancement of conjugated linoleic acid in pasture-fed dairy cows. **Proceedings of New Zealand Society Animal Production**, **62**: 12-15.

- KEPLER, C.R.; HIRONS, K.P.; McNEILL, J.J.; TOVE, S.B. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, **241**: 1350-1354.
- KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, **80**: 183–201.
- KIM, J.Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. 2001. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, **122**: 131-138.
- KIM, J.H.; NIWA, K.; LIM, J.M.; OKUDA, K. 1993. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids development of *in vitro*-maturation, *in vitro*-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein –free culture medium. **Biology Reproduction**, **48(6)**: 1320-1325.
- KING, M. E.; SPECTOR, A. A. 1978. Effect of specific fatty acyl enrichment on membrane physical properties detected with a spin label probe. **The Journal of Biological Chemistry**, **253**: 6493-6501.
- KRUIP, T.; CRAN, D.G. VAN BENEDEN T.H.; DIELEMAN. S.J. 1983. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. **Gamete Research**, **8**: 29-47.
- KRAMER, J.K.G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DENG, Z.; ZHOU, J.; GERHARD JAHREIS, G.; DUGAN, M.E.R. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. **Animal Journal Clinical Nutrition**, **29**: 1137-1145
- LEE, K.N.; PARIZA, M.W.; NTAMBI, J.M. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase m RNA expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **248**: 817-821.
- LEESE, H.J. 1991. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, **13**: 35-72.

- LEESE, H.J. 1993. Energy metabolism of preimplantation development. **In Preimplantation Embryo Development**, 73—82.
- LEESE, H. J.; TAY, J.I. REISCHL, J.; DOWNING, S.J. 2001. Formation of Follopian tubal fluid: Role of a neglected epithelium. **Reproduction**, **121**: 339-349.
- LEVY, R. 2001. Genetic regulation of preimplantation embryo survival. **International Review of Cytology**, **210**: 1-37.
- LIN, Y.; MEIJER, G.W.; VERMEER, M.A. TRAUTWEIN, E.A. 2004 Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. **Journal of Nutrition**, **134**: 143–148.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; KINGSTON, M.; BOLAND, M.P. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, **126**: 337–46.
- LU, K.H.; GORDON, I.; CHEN, H.B.; McGOVERN, H. 1987. *In vitro* culture of early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. **In: Proceedings of the 3rd Conference of the European Embryo Transfer Association (Lyon, France)**, 70.
- LU, K. H.; GORDON, I.; CHEN, H. B.; GALLAGHER, M.; MCGOVERN, H. 1988. Birth of twins after of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. **Veterinary Records**, **122**: 539-540.
- MAYER, M.P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. 2005. **Cellular and Molecular Life Sciences** **62**: 670-684.
- McEVOY, T.G.; COULL, G.D.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON J.S.; SPEAKE B.K. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction Fertility**, **118**: 163-170.

MEN, H.; MONSON, L.R.; PARRISH, J.J.; RUTLEDGE, J.J. 2003. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, **47**: 73-81.

MURAKAMI, K.; CHAN, S.Y.; ROUTTENBERG, A. 1986. Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca²⁺ and phospholipids. **Journal of Biological Chemistry**, **261**:424–415.

NAGASHIMA, H.H.; YAMAKAWA, H.; NIEMANN H. 1992. Freezability of porcine blastocyst at different peri-hatching stages. **Theriogenology**, **37**: 839-850.

NISHIZUKA, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. **Nature**, **334**: 661–665.

O'SHEA, M.; STANTON, C.; DEVERY. R. 1999. Antioxidant enzyme defense responses of human MCF-7 and SW480 cancer cells to conjugated linoleic acid. **Anticancer Research**, **19**: 1953–1959.

OU, L.; IP, C.; LISAFELD, B.; IP. M. M. 2007. Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss. **Biochemica et Biophysica Research**, **356**: 1044–1049.

OU, L.; WU, Y.; IP, C.; MENG, X.; HSU, Y-C.; IP, M. M. 2008. Apoptosis induced by t10,c12-conjugated linoleic acid is mediated by an atypical endoplasmic reticulum estresse response. **Journal of Lipid Research**, **49**: 985-994.

PARIZA, M.W.; ASHOOR, S.H.; CHU, F.S.; LUND, D.B. 1979. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan fried hamburger. **Cancer Letters**, **7**: 63-69.

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

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

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

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I. 2006. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t,12c* CLA). **Animal Reproduction Science**, **98**: 293–301.

PERFIELD, J.W.; BERNAL-SANTOS, G.; OVERTON, T.R.; BAUMAN, D.E. 2002. Effects of dietary supplementation of rumen protected conjugated linoleic acid dairy cows during established lactation. **Journal of Dairy Science**, **85**: 2609-2617.

PETERSON, D.G.; MATITASHVILI, E.A.; BAUMAN, D.E. 2003. 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. **Journal of Nutrition**, **133**: 3098-3102.

PETERSON, D.G.; MATITASHVILI, E. A.; BAUMAN, D.E. 2004. The inhibitory effect of trans-10, cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. **Journal of Nutrition**, **134**: 2523–2527.

PIPEROVA L.S.; TETER, B.B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS, S.E.; YURAWECZ, M.P.; FRITSCH, J.; KU, K.; ERDMAN, R.A. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. **Journal of Nutrition**, **130**: 2568-2574.

POLGE, C.; WILMUT, J.; ROWSON, L.E.A. 1974. Low temperature preservation of cow, sheep and pig embryos. **Cryobiology**, **11**: 560.

REIGER, D.; LOSKUTOFF, N.M. 1994. Changes in metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, **100**: 257-262.

REIGER, D.; LOSKUTOFF, N.M.; BETTERIDGE, K.J. 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, **95**: 585-595.

REIS, A.; ROOKE, J.A.; McCALLUM, G.J.; EWEN, M.; STAINES, M.E.; LOMAX, M.A.; MCEVOY, T.G. 2003. Fatty acid content of polar and neutral lipids from bovine blastocysts produced *in vitro* in the presence or absence of serum. **Reproduction Abstract Series**. **30**: 57-58.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNALO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology Reproduction** **68**: 236–43.

RUDOLPH, M.; MARIANS, R.; BURNS, V.; RUSSELL, T.; NEVILLE, M.C. 2005. SREBP1-c plays a regulatory, but not essential role in mammary lipogenesis during lactation. **The Endocrine Society's 87th Annual Meeting Abstract**: 604.

RUDOLPH, M.C.; MCMANAMAN, J.L.; PHANG, T.; RUSSELL, T.; KOMINSKY, D.J.; SERKOVA, N.J.; STEIN, T.; ANDERSON, S.M.; NEVILLE, M.C. 2007. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. **Physiology Genomics**, **28**: 323–36.

SATA, R.; TSUJII, H.; ABE, H.; YAMASHITA, S.; HOSHI, H. 1999. Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. **Journal Reproduction Development**, **45**: 97-103.

SEBEDIO, J.L.; ANGIONI, E.; CHARDIGNY, J.M. 2001. The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16: 2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats. **Lipids**, **36**: 575- 582.

SEBEDIO, J.L.; GNAEDIG, S.; CHARDIGNY, J.M. 1999. Recent advances in

conjugated linoleic acid research. **Current Opinion Clinical Nutrition Metabolic Care, 2(6):** 499-506.

SEBEDIO, J.L.; JUANEDA, P.; DOBSON, G. 1997. Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat. **Biochim Biophys Acta, 1345:** 5-10.

SHIELS, A., GRIFFIN, C.S., 1993. Aberrant expression of the gene for lens major intrinsic protein in the CAT mouse. **Current Eye Research, 12:** 913–921.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology, 65:** 126-136.

SERBIAN, J.M.; SCANLON, P.F; GORDON, I. 1968. Culture of fertilized cattle eggs. **Journal of Agriculture Science, 70:** 183-185.

SREENAN J.M.; SCANLON P.F. 1968. Continued cleavage of fertilized bovine ova in the rabbit. **Nature. 217:** 867.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochemical et Biophysical Acta, 89-137.**

TACHIKAWA, S.; OTOI, T.; KONDO, S.; MACHIDA, T.; KASAI, M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. **Molecular Reproduction and Development, 34:** 266-271.

TAKAHASHI, Y.; KUSHIRO, M.; SHINOHARA, K.; IDE, T. 2002. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. **Comparative Biochemistry and Physiology, 133:** 395-404.

THOMPSON, H.; ZHU, Z.J.; BANNI, S. DARCY, K., LOFTUS, T., IP, C. 1997. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. **Cancer Research, 57:** 5067-5072.

- THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A.; MCMILLAN, W.H.; TERVIT, H.R. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biology Reproduction**, **53**: 1385-1391.
- THOMPSON, J. G.; PARTRIDGE, R. J.; HOUGHTON, F. D.; COX, C. I.; LEESE, H. J. 1996. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, **106**: 299-306.
- THOMPSON, J.G.; SHERMAN, A.N.M.; ALLEN, N.W.; MCGOWAN, L.T.; TERVIT, H.R. 1998. Total protein content and protein synthesis within pre-elongation stage bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, **50**: 139-145.
- THOMPSON, J.G.; SIMPSON, A.C.; PUGH, P.A.; TERVIT, H.R. 1992. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, **31**: 253–257.
- VIANA, J.H.M. 2009. Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. **O embrião**, **42**: 05-07.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. 2007. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, **35**: 915-919.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. FERREIRA, A.M.; SA, W.F.; FERNANDES, C.A.C.; MARQUES-JUNIOR, A.P. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but not prevent establishment of dominant follicle in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, **84**: 1-12.
- VIRKKI, L.V.; COOPER, G.J.; BORON, W.F. 2001. Cloning and functional expression of an MIP (AQP0) homologue from killfish (*Fundulus heteroclitus*) lens. **American Journal of Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, **281**: 1994–2003.

VISINTIN, J. A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILAQUA, E.M.; MELO, M.R.B.; NICACIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: Are they really different? **Theriogenology**, **57**: 345-359.

VIUFF, D.; RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE T. 1999. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. **Biology Reproduction**, **60**: 1273–1278.

YURAWECZ, M.P.; KRAMER, J.K.G.; MOSSOBA, M.M.; ROACH, J.A.G.; SEHAT, N.; EULITZ, K.; FRITSCH, J.; KATOAKA, A.; KU, Y. 2001. Analytical methodology for CLA. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CLA, 1. **Alesund, Proceedings. Alesund: NATURAL ASA**: 14.

WAUGH, E.E.; WALES, R.G. 1993. Oxidative utilization of glucose, acetate and lactate by early preimplantation sheep, mouse and cattle embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, **5**: 123-133.

WILEY, L.M. (1987). Development of the blastocyst: role of cell polarity in cavitation and cell differentiation. In *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation In Vitro*. Ed. **BD Bavister**, 65–93. (**Plenum Press, New York**)

WILMUT, I. 1972. The low temperature preservation of mammalian embryos. **Journal Reproduction Fertility**, **31**: 513-514.

[WRENZYCKI, C.](#); [HERRMANN, D.](#); [KESKINTEPE, L.](#); [MARTINS, A-JR.](#); [SIRISATHIEN, S.](#); [BRACKETT, B.](#); [NIEMANN, H.](#) 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, **16**: 893–901.

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

ZERON, Y., SKLAN, D., ARAV, A., 2002. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes.

Molecular Reproduction Development, 61: 271–278.

ZHU, Q.; ANDERSON, G.W.; MUCHA, G.T.; PARKS, E.J.; METKOWSKI, J.K.; MARIASH, C.N. 2005. The Spot 14 protein is required for de novo lipid synthesis in the lactating mammary gland. **Endocrinology, 146:** 3343–50.