

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

HELENA FABIANA REIS DE ALMEIDA SARAIVA

**ESTRATÉGIAS DE SUPLEMENTAÇÃO DE L-CARNITINA NO PROTOCOLO DE
VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS PRODUZIDOS *IN*
*VIVO***

NITERÓI

2017

HELENA FABIANA REIS DE ALMEIDA SARAIVA

**ESTRATÉGIAS DE SUPLEMENTAÇÃO DE L-CARNITINA NO PROTOCOLO DE
VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS PRODUZIDOS *IN*
*VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
da Universidade Federal Fluminense,
como requisito parcial para obtenção do
Grau de Mestre em Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Clínica e
Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão
Coorientadores: Dr. Jeferson Ferreira da Fonseca
Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista

NITERÓI

2017

S243e Saraiva, Helena Fabiana Reis de Almeida

Estratégias de suplementação de L-carnitina no protocolo de verificação de embriões ovinos da raça Santa Inês produzidos in vivo / Helena Fabiana Reis de Almeida Saraiva; orientador Felipe Zandonadi Brandão. - 2017.
76f.

Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal)- Universidade Federal Fluminense, 2017.

Orientador: Felipe Zandonadi Brandão

1. Ovino. 2. Melhoramento genético animal.
3. Expressão gênica. 4. Criopreservação. I. Título.

CDD 636.089394

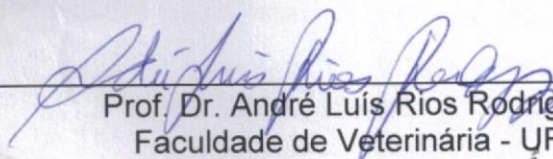
**ESTRATÉGIAS DE SUPLEMENTAÇÃO DE L-CARNITINA NO PROTOCOLO
DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS
PRODUZIDOS *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária da Universidade
Federal Fluminense, como requisito
parcial para obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária. Área
de Concentração: Clínica e
Reprodução Animal.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – Orientador
Faculdade de Veterinária – UFF



Prof. Dr. André Luís Rios Rodrigues
Faculdade de Veterinária - UFF



Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo
Embrapa Gado de Leite

*Aos meus pais, Juarez e Helena: minha
Torre Forte.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha vida. Por toda força que me deu para chegar até aqui.

Aos meus pais, Juarez e Helena, por tudo. Descrever aqui seria impossível. Melhor exemplo eu não poderia ter.

Ao professor e orientador Dr. Felipe Zandonadi Brandão, por me aceitar como orientada, pela orientação e por sempre ter me apoiado nas inovações desse projeto.

Aos coorientadores, Dr. Jeferson Fonseca e Dr. Ribrio Batista, por toda ajuda na execução desse projeto. Em especial ao Riberry, pelos ensinamentos, paciência, parceria no laboratório e pela amizade aqui iniciada. Que surja desse trabalho uma parceria científica para a vida.

Aos membros da equipe: Pedro, Ceci, Rômulo, Mário, Gláucia e Gustavo, pelo empenho nas coletas e pela parceria na execução desse projeto.

Ao Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pela disponibilização dos kits de expressão gênica e por abrir as portas do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG) para realização de nossas análises de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Felipe Perecin e à Dra. Clara Slade Oliveira, pela disponibilização das colorações utilizadas nesse experimento, as quais enriqueceram sobremaneira nossas análises.

Às minhas amigas-irmãs, Gabriela, Clara, Vivian e Carolina, por todo apoio, amizade, companheirismo e parceira nos laboratórios, da ciência e da vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida, pelo Edital CAPES/EMBRAPA.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo financiamento a este projeto.

À EMBRAPA, pelo auxílio financeiro no projeto de nº 02.13.06.026.00.00, Plano de Ação 5: "Criopreservação de embriões produzidos *in vivo* em diferentes raças ovinas".

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo
para todo o propósito debaixo do céu”*

(Eclesiastes capítulo 3, versículo 1)

RESUMO

A vitrificação representa uma importante ferramenta em programas de melhoramento genético dos rebanhos, pois permite a criopreservação de gametas e embriões com menor percentual de crioinjúrias. Entretanto, lesões causadas nas organelas durante a criopreservação comprometem a taxa de sobrevivência dos embriões após o reaquecimento. Neste contexto, este estudo objetivou avaliar duas estratégias de suplementação com L-carnitina (modulador de atividade mitocondrial) na vitrificação de embriões ovinos da raça Santa Inês produzidos *in vivo*. Mórulas e blastocistos entre os dias 6 e 7 de desenvolvimento obtidos de ovelhas foram classificados quanto qualidade e estágio de desenvolvimento e uniformemente distribuídos entre os grupos experimentais. No ensaio 1 foram formados os grupos C1 (vitrificação sem suplementação) e LC1 (vitrificação suplementada com 3,72 mM L-carnitina). No ensaio 2, foram formados C2 (reaquecimento sem suplementação) e LC2 (reaquecimento suplementado com 3,72 mM L-carnitina). Após reaquecimento, os embriões foram cultivados *in vitro* para avaliação de sobrevivência às 24, 48 e 72h pós-reaquecimento. No ensaio 1, às 24h de CIV foram retirados 15 embriões reexpandidos (8 de C1 e 7 de LC1) e congelados em -80°C para extração de RNA e análise de expressão de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e estresse oxidativo através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) e 22 embriões (9 de C1 e 13 de LC1) foram destinados para análise do número de células totais e de níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) através das colorações de Hoechst 33342 e CellROX® Green, respectivamente; às 72h de CIV, os embriões reexpandidos foram fixados para posterior análise de índice apoptótico por imunofluorescência com caspase-3. No ensaio 2 foram realizadas as mesmas avaliações de sobrevivência, sendo retirados 18 embriões (6 de C2 e 12 de LC2) do cultivo às 24h para congelação e análise de expressão dos mesmos genes avaliados no ensaio 1. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) nas taxas de sobrevivência entre C1 e LC1 e entre C2 e LC2, tampouco nos níveis de ROS, número total de células, número de células apoptóticas e índice apoptótico entre C1 e LC1. Não houve diferença ($p > 0,05$) na expressão de *CPT1* e *CPT2* (*carnitine palmytoil transferase 1* e 2) entre embriões frescos (CF), C1 e LC1 e entre CF e C2 e LC2, porém no ensaio 1 a abundância relativa de *CrAT* (*carnitine acetyl-O-transferase*) foi sub-regulada ($p < 0,05$) em LC1 (vs CF), e a abundância relativa de RNAm *PRDX1* (*peroxiredoxin 1*) foi sub-regulada ($p < 0,05$) em C1 vs CF. No ensaio 2, a abundância relativa de *CrAT* e *PRDX1* foram sobre-reguladas ($p < 0,05$) em C2 vs CF, e a de *CrAT* foi sub-regulada ($p < 0,05$) em LC2 vs CF. Conclui-se que na dosagem de 3,72 mM, a LC empregada durante a vitrificação ou reaquecimento, apesar de não ser observada diferença nas taxas de sobrevivência e na qualidade de embriões ovinos da raça Santa Inês produzidos *in vivo*, estimulam a resposta antioxidante celular e beneficia as vias de homeostase energética celular em nível molecular.

Palavras-chave: produção *in vivo* de embriões; expressão gênica; criopreservação; *Ovis aries*; Santa Inês.

ABSTRACT

Vitrification represents an important tool in genetic improvement programs of the herds since it allows the cryopreservation of gametes and embryos with a lower percentage of cryoinjuries. However, damage caused in the organelles during cryopreservation compromise embryo survival rate after warming. In this context, the present study aimed to evaluate two strategies of supplementation with L-carnitine (modulator of mitochondrial activity) in vitrification medium used for in vivo-produced Santa Inês sheep embryos. Morulae and blastocysts between days 6 and 7 of development obtained from ewes were classified by quality and developmental stage and distributed among the experimental groups. In essay 1 the groups C1 (vitrification without supplementation) and LC1 (vitrification plus 3.72 mM L-carnitine) were set-up. In essay 2, were set-up C2 (warming without supplementation) and LC2 (warming plus 3.72 mM L-carnitine). After warming, embryos were in vitro cultured for survival evaluation at 24, 48 and 72h post-warming. In essay 1, 15 reexpanded embryos (8 from C1 and 7 from LC1) were frozen at -80°C at 24h IVC for RNA extraction and expression of genes correlated to mitochondrial metabolism and oxidative stress through Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR); 22 embryos (9 from C1 and 13 from LC1) were analysed for total cell number and reactive oxygen species (ROS) levels through Hoechst 33342 and CellROX® Green staining techniques, respectively; at 72h IVC, remaining reexpanded embryos were fixed for posterior analysis of apoptotic index by caspase-3 immunofluorescence staining. In essay 2 the same survival evaluations were performed. Eighteen embryos (6 from C2 and 12 from LC2) were withdrawn at 24h IVC for freezing and gene expression analysis of the same genes evaluated in essay 1. No difference was observed ($p > 0.05$) in survival rates between C1 and LC1 and between C2 and LC2, nor in ROS levels, total cell number, apoptotic cell number and apoptotic index between C1 and LC1. There was no difference ($p > 0.05$) in the expression of *CPT1* and *CPT2* (*carnitine palmytoil transferase 1 and 2*) between fresh embryos (CF), C1 and LC1 and between CF and C2 and LC2, but in essay 1 the relative abundance of *CrAT* (*carnitine-O-acetyltransferase*) was downregulated ($p < 0.05$) in LC1 (vs. CF), and the relative abundance of *PRDX1* (*peroxiredoxin 1*) mRNA was downregulated ($p < 0.05$) in C1 vs CF. In essay 2, the relative abundance of *CrAT* and *PRDX1* were upregulated ($p < 0.05$) in C2 vs CF, and *CrAT* was downregulated ($p < 0.05$) in LC2 vs CF. In conclusion, 3.72 mM LC during vitrification or warming, it stimulate the cell antioxidant response and benefits cellular energy and homeostasis pathways at a molecular level, although no differences in survival rates and quality of in vivo produced Santa Inês sheep embryos are observed

Keywords: *in vivo* embryo production; gene expression; cryopreservation; *Ovis aires*; Santa Inês.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Produção <i>in vivo</i> de embriões	17
2.2 Criopreservação	18
2.3 L-carnitina	21
2.3.1 Efeito da L-carnitina no metabolismo lipídico.....	21
2.3.2 Efeito antioxidante da L-carnitina.....	24
2.4 Metabolismo embrionário	25
2.5 Técnicas de avaliação embrionária <i>in vitro</i>	27
2.5.1 Avaliação morfocinética embrionária	27
2.5.2 Técnicas de avaliação por coloração.....	28
2.5.3 Avaliação da expressão gênica em embriões.....	30
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 Ensaio 1 – Efeito da suplementação com L-carnitina na solução de vitrificação de embriões ovinos produzidos <i>in vivo</i>	34
5.1.1 Desenho experimental.....	34
5.1.2 Produção <i>in vivo</i> de embriões.....	35
5.1.3 Vitrificação e reaquecimento dos embriões	37
5.2 Ensaio 2 – Efeito da suplementação com L-carnitina na solução de reaquecimento de embriões ovinos produzidos <i>in vivo</i>	37
5.2.1 Desenho experimental.....	37
5.2.2 Produção <i>in vivo</i> de embriões.....	38
5.2.3 Vitrificação e reaquecimento dos embriões	39
5.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) e análise das taxas de sobrevivência.....	39
5.4 Avaliação dos níveis de ROS e do NTC às 24h de CIV	40
5.5 Avaliação do índice apoptótico e do NTC às 72h de CIV.....	40
5.6 Análise da expressão de genes associados ao metabolismo mitocondrial ...	41

5.7 Análise estatística	43
6. RESULTADOS	44
6.1 Ensaio 1	44
6.1.1 Taxas de sobrevivência após reaquecimento.....	44
6.1.2 Níveis de ROS intracelular e NTC às 24h de CIV; número de células apoptóticas, índice apoptótico e NTC às 72h.....	45
6.1.3 Expressão de genes associados ao metabolismo mitocondrial.....	48
6.2 Ensaio 2	49
6.2.1 Taxas de sobrevivência após reaquecimento.....	49
6.2.2 Expressão de genes associados ao metabolismo mitocondrial.....	50
7. DISCUSSÃO	52
8. CONCLUSÕES	60
Indicação Bibliográfica	61
ANEXOS	74

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Número total de estruturas recuperados por laparotomia e 44
classificação morfológica de embriões de acordo com o estágio
de desenvolvimento
- TABELA 2 - Sequência de *primers* específicos utilizados na análise da 42
expressão gênica de embriões ovinos submetidos à
suplementação com L-carnitina na solução de vitrificação ou
reaquecimento
- TABELA 3 - Capacidade de desenvolvimento e sobrevivência após 45
vitrificação (indicadas através de taxas de reexpansão de
blastocle e de eclosão) de embriões ovinos submetidos à
suplementação com L-carnitina na solução de vitrificação
- TABELA 4 - Capacidade de desenvolvimento e sobrevivência após 50
vitrificação (indicadas através de taxas de reexpansão de
blastocle e de eclosão) de embriões ovinos submetidos à
suplementação com L-carnitina na solução de reaquecimento

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Delineamento do ensaio 1	35
FIGURA 2 -	Delineamento do ensaio 2	38
FIGURA 3 -	Imagens representativas dos embriões do grupo C1 (vitrigificação sem suplementação) e LC1 (vitrigificação suplementada com 3,72 mM de LC) após protocolo de coloração para avaliação do número total de células (em azul) e de ROS (em verde) às 24h de CIV após reaquecimento	46
FIGURA 4 -	Níveis de ROS intracelulares (em unidades arbitrárias) em embriões dos grupos C1 e LC1, avaliados por intensidade de fluorescência emitida após coloração <i>in vivo</i> com CellROX Green às 24h de CIV após reaquecimento	46
FIGURA 5 -	Imagens representativas dos embriões do grupo C1 (vitrigificação sem suplementação) e LC1 (vitrigificação suplementada com 3,72 mM de LC) após protocolo de coloração para avaliação do NTC (em azul) e de células apoptóticas (em vermelho), e sobreposição de imagens (merge) às 72h de CIV após reaquecimento	47
FIGURA 6 -	(A) Número total de células (NTC; n) às 24 e 72h de CIV; (B) número de células apoptóticas (n) e índice apoptótico (%) em embriões dos grupos C1 e LC1, avaliados através de protocolo com Hoechst 33342 e pela técnica de imunofluorescência com caspase-3	48
FIGURA 7 -	Abundância relativa de RNAm dos genes <i>CPT1</i> , <i>CPT2</i> , <i>CrAT</i> e <i>PRDX1</i> em embriões ovinos dos grupos CF, C1 e LC1, às 24h de CIV após reaquecimento	49
FIGURA 8 -	Abundância relativa de RNAm dos genes <i>CPT1</i> , <i>CPT2</i> , <i>CrAT</i> e <i>PRDX1</i> em embriões ovinos dos grupos CF, C2 e LC2, às 24h de CIV após reaquecimento	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB – Homo sapiens actin beta
ATP – Trifosfato de adenosina
Be – Blastocisto em eclosão/eclodido
Bi – Blastocisto inicial
Bl – Blastocisto
Bx – Blastocisto expandido
BME – Basal Eagle Medium
BSA – Albumina sérica bovina
CAT – Catalase
cDNA – DNA complementar
CF – Controle fisiológico
CIV – Cultivo *in vitro*
CoA – Coenzima A
CO₂ – Dióxido de carbono
CPTs – Carnitine palmytoil transferase
CPT1 – Carnitine palmytoil transferase 1
CPT2 – Carnitine palmytoil transferase 2
CrAT – Carnitine O-acetyltransferase
DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ECC – Escore de condição corporal
eCG – Gonadotrofina coriônica equina
EG – Etilenoglicol
FAD – Flavin adenine dinucleotide
FSH – Hormônio folículo estimulante
G - Glicerol
G6PD – Glucose-6-phosphate desidrogenase
GLUT1 – Glucose transporter 1
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPx – Glutathione peroxidase
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IETS – International Embryo Transfer Society

Kg - quilo
LC – L-carnitina
LH – Hormônio luteinizante
M – Molar
MAPK – Mitogen activated protein kinase
MB – Meio base
Mc – Mórula compacta
MEM – Minimum Essential Eagle Medium
mg - Miligrama
MIV – Maturação *in vitro*
mL – Mililitro
mM – Milimolar
Mo – Mórula
MOET – Multiple ovulation and embryo transfer
N₂ – Nitrogênio
Na⁺ - Sódio
Na⁺K⁺ATPase – Sódio/potássio ATPase
NADPH – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NBCS – New born calf serum
NF-κB – Factor nuclear kappa B
ng – Nanograma
NTC – Número total de células
O₂ – Oxigênio
OCM – Ovum culture medium
OCTN2 – Organic cation transporter 2
OH⁻ - Hidroxila
PBS – Phosphate buffer saline
PCR – Polimerase Chain Reaction
PFA – Paraformaldeído
PRDX1 – Peroxiredoxin 1
PVA – Ácido polivilínico
RNA – Ácido ribonucleico
RNAm – RNA mensageiro
ROS – Reactive oxygen species

S1 – Solução de reaquecimento 1

S2 – Solução de reaquecimento 2

S3 – Solução de reaquecimento 3

SFB – Soro fetal bovino

SOD2 – Superoxide dismutase 2

TNF- α – Necrose tumoral factor α

TUNEL – Terminal deoxinucleotil transferase uracil nick end labeling

UFF – Universidade Federal Fluminense

UniPECO – Unidade de Pesquisa em Caprinos e Ovinos

γ -GCS – γ -glutamyl cysteine synthetase

μ g – Micrograma

μ L - Microlitro

1. INTRODUÇÃO

O Rio de Janeiro é um dos estados onde a criação de ovinos encontra-se em franca expansão. Apesar disso, a ovinocultura fluminense ainda é praticada de maneira ineficiente na maioria das propriedades, tornando-se necessário a adoção de práticas e tecnologias que promovam avanços tanto na esfera produtiva quanto econômica. É inegável o peso que a reprodução tem no desempenho produtivo de uma propriedade, e inevitavelmente a adoção de novas biotecnologias reprodutivas resulta em retorno ao produtor de forma mais rápida e potencializada. A produção *in vivo* de embriões, que está associada à estimulação ovariana através do uso de protocolos hormonais, entra no contexto como opção que proporciona melhores resultados em melhoramento genético e produtividade dos rebanhos nos quais é empregada.

A possibilidade de armazenar o elevado número de embriões produzidos por essa biotécnica facilita a programação antecipada da época em que os lotes de matrizes estarão em gestação e das estações de parição, coincidindo com a demanda do mercado consumidor e permitindo ao produtor o melhor gerenciamento de seus recursos e renda. Além disso, a alta taxa de produção dessa biotécnica pode gerar um número excedente de embriões de alto valor genético além do número de receptoras disponíveis para transferência, que se não preservado poderá resultar em prejuízos econômicos ao produtor. As biotécnicas de criopreservação ganham destaque nesse cenário, pois permitem a estocagem de embriões por períodos prolongados em baixíssimas temperaturas, o que as tornam estratégia essencial nos programas de aceleração do melhoramento genético dos rebanhos.

Os primeiros estudos que descrevem a sobrevivência de embriões mamíferos à criopreservação remetem à década de 70 (revisado por Dalcin; Lucci, 2010). Atualmente a criopreservação de gametas e embriões é amplamente empregada na produção animal, em programas de melhoramento genético e na preservação da diversidade genética de espécies ameaçadas (revisado por Comizzoli; Wildt, 2014). A vitrificação é o método de criopreservação mais recentemente desenvolvido, no qual são empregadas velocidade ultrarrápida de resfriamento e alta concentração de crioprotetores, com o objetivo da formação de um estado vítreo intracelular na tentativa de evitar a formação de cristais de gelo, minimizando danos ultraestruturais (Vajta, 2000). Entretanto, o que se observa em embriões submetidos à essa biotécnica é a alteração do padrão de distribuição e da atividade mitocondrial (Dalcin et al., 2013;

Fair et al., 2001), retardo na retomada de síntese de DNA e proteínas (Leoni et al., 2003), fraturas de citoesqueleto (Dalcin et al., 2013; Bettencourt et al., 2009), alterações em nível de expressão gênica (Aksu et al., 2012; Ha et al., 2015) e posterior alteração da expressão protéica placentária (Saenz-de-Juano et al., 2015). Diversos grupos de pesquisa têm testado a suplementação de moduladores em meio de cultivo *in vitro* na tentativa de melhorar as taxas de sobrevivência de embriões criopreservados (Gomis et al., 2013; Hwang et al., 2013; Sudano et al., 2011). Entretanto, essa estratégia requer a necessidade de um período de cultivo de no mínimo 24h em estufa incubadora, o que impede procedimentos de transferência direta dos embriões às receptoras logo após o reaquecimento e engessa a rotina de trabalho em muitas propriedades que não dispõem de equipamentos laboratoriais como estufa incubadora.

A carnitina é um composto endógeno limitante para a via de β -oxidação, atuando no transporte de ácidos graxos para a mitocôndria e no carregamento de intermediários dessa via, mantendo a homeostase celular e contribuindo para a produção de espécies reativas de oxigênio em níveis fisiológicos (Vaz; Wanders, 2002). Estudos tem testado a suplementação com L-carnitina (LC, L-isômero) no cultivo *in vitro* com o objetivo de melhorar a qualidade e as taxas de desenvolvimento e sobrevivência dos embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Sutton-McDowell et al., 2012; Baldoceda et al., 2015). Dessa forma, o emprego da LC, como estimuladora da β -oxidação e por sua ação antioxidante, torna-se uma estratégia interessante na busca de melhores taxas de sobrevivência embrionária após a vitrificação. Entretanto, ainda não existem trabalhos que descrevem o uso da LC no protocolo de vitrificação para a espécie ovina, o que resulta em escasso conhecimento a respeito da resposta de embriões dessa espécie à essa suplementação e quais seriam suas sobrevivências e qualidade após o reaquecimento. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi testar a suplementação com LC em duas estratégias: empregada na solução de vitrificação; e na solução de reaquecimento, com o intuito de verificar se um curto tratamento com esse modulador é capaz de incrementar as taxas de sobrevivência e a qualidade de embriões ovinos produzidos *in vivo*, visando validar um protocolo de vitrificação com suplementação curto e de fácil aplicação pelo técnico, permitindo-se assim ampliar o emprego dessa biotécnica à campo e incrementar a qualidade dos embriões resultantes e as taxas de produção de cordeiros.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Produção *in vivo* de embriões

Segundo dados do relatório da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (*International Embryo Transfer Society* – IETS), foram produzidos *in vivo* e transferidos no ano de 2015 mais de 32 mil embriões da espécie ovina no mundo, sendo os principais produtores Austrália (15.256 embriões), China (10.142 embriões) e Reino Unido (4.691 embriões) (IETS, 2016). A produção *in vivo* de embriões é baseada na biotécnica reprodutiva também conhecida como MOET (*multiple ovulation and embryo transfer*), e visa a obtenção de um maior número de crias provenientes de animais de alto valor genético, dessa forma sendo empregada em programas de melhoramento genético de rebanhos (Fonseca et al., 2014). A MOET baseia-se na utilização de protocolos de superestimulação ovariana com o intuito de obter um maior número de oócitos maduros ovulados, permitindo igualmente a produção de maior número de embriões após monta natural ou inseminação. Os protocolos mais utilizados baseiam-se no uso de FSH ou eCG como estimuladores do crescimento folicular, além do emprego de implantes de progesterona para sincronização da onda folicular, e utilização de análogos de GnRH e de prostaglandinas para indução do pico pré-ovulatório de LH (Fonseca et al., 2005).

A eCG é utilizada em ovelhas como uma alternativa ao FSH, apresentando uma maior meia-vida plasmática (72h versus 6h do FSH), mas sendo associada a um maior número de embriões degenerados em comparação ao hormônio hipofisário, devido à sua predisposição de formação de cistos foliculares (Husein et al., 1998). Protocolos mais atuais utilizam o FSH (proveniente de extratos hipofisário) em múltiplas e decrescentes aplicações como promotor de crescimento folicular, e possuem maior eficácia com sua administração concomitantemente à presença de folículos responsivos à essa gonadotrofina, ou seja, folículos antrais com diâmetro entre 2 e 3 mm (Veiga-Lopes et al., 2005). Tal premissa torna o emprego da ultrassonografia, visando a avaliação da dinâmica folicular e identificação de folículos desse diâmetro, uma importante ferramenta nos protocolos de superestimulação ovariana para produção *in vivo* de embriões (Pinto et al., 2016). O emprego de protocolos “dia 0” (que considera como dia 0 o dia da ovulação) minimiza o risco de se iniciar o tratamento hormonal em períodos indesejados do ciclo estral, evitando baixas taxas de recuperação de embriões viáveis (Fonseca et al., 2005).

O status fisiológico ovariano no momento do início do protocolo hormonal relaciona-se diretamente com o sucesso da MOET (Gonzalez-Bulnes et al., 2002; 2005), porém outros fatores também interferem nesse resultado. O protocolo hormonal adotado, a raça (Bindon et al., 1986), idade dos animais (Dattena et al., 1999), época do ano (Mitchell et al., 2002), o status nutricional do animal e o manejo adotado (Robinson et al., 2006), e a técnica de colheita dos embriões (Andrioli et al., 1999; Fonseca et al., 2014) podem influenciar o resultado dessa biotécnica. Com a utilização de protocolos hormonais, são recuperados em média, seja por colheita transcervical, laparoscópica ou cirúrgica, de 5 a 6 embriões viáveis por doadora na espécie ovina (Gordon et al., 1997, revisado por Fonseca et al., 2005).

2.2 Criopreservação

A opção de estocar embriões de valor genético superior, produzidos pela MOET, torna as biotécnicas de criopreservação essenciais nos programas de melhoramento genético de espécies comerciais. Com o intuito de desacelerar o metabolismo e a taxa de respiração celular, mantendo a célula em estado quiescente, mas preservando sua integridade, as técnicas de criopreservação utilizam o nitrogênio (N_2) líquido para alcançar temperaturas ultrabaixas e viabilizar a estocagem de gametas, embriões e diversos tipos celulares (Dalcin; Lucci, 2010).

Os métodos de criopreservação mais difundidos são aqueles que utilizam a congelação controlada, cuja taxa de resfriamento acontece gradualmente em máquinas apropriadas, ou a vitrificação, com taxas de resfriamento ultrarrápidas pelo mergulho dos dispositivos com o conteúdo celular diretamente no N_2 líquido (Dalcin; Lucci, 2010). Na prática, independentemente do método de criopreservação, faz-se o uso combinado de crioprotetores permeáveis como glicerol, etilenoglicol, propilenoglicol, ou dimetilsulfóxido, e crioprotetores não permeáveis, como sacarose, frutose ou glicose (Vajta, 2000). O objetivo dessas combinações é permitir a desidratação celular, diminuir a toxicidade da solução de criopreservação e minimizar as injúrias tóxico-osmóticas que a alta concentração de qualquer um deles causa às células (Vajta, 2000), como por exemplo, a desidratação celular excessiva que compromete a integridade celular (Araújo-Lemos et al., 2014). As soluções hipertônicas empregadas na criopreservação modulam o fluxo da água para fora da célula, causando desidratação e diminuição do tamanho da célula, resultando em menor probabilidade de formação de cristais de gelo intracelular, o qual está mais

fortemente correlacionado com os danos causados pela criopreservação do que a formação de gelo no espaço extracelular (Prickett et al., 2015). Esse fluxo de água, em embriões em estágio de mórula/blastocisto, acontece via difusão facilitada por *Aquaporinas* (Nong et al., 2013; Tan et al., 2015), canais que tornam o transporte de água mais eficiente em embriões nesse estágio de desenvolvimento, enquanto que em embriões nas primeiras divisões celulares tal transporte ocorre através da bicamada lipídica, por difusão simples (Jin et al., 2011). Essas características, associadas às diferenças no conteúdo lipídico entre embriões iniciais e mórulas e blastocistos (Romek et al., 2009), e ao tamanho e volume celular explicam o melhor desempenho de embriões mais tardios após a criopreservação (Vajta et al., 1998; Liebermann, 2009; Shirazi et al., 2010).

O termo vitrificação pode ser traduzido como a passagem direta de uma substância do estado líquido para o estado vítreo sob baixas temperaturas sem formação de cristais de gelo, fenômeno que ocorre pela alta velocidade de resfriamento e/ou aumento da viscosidade da solução, através do uso de substâncias crioprotetoras (Vajta, 2000). A vitrificação surgiu como proposta de um método de criopreservação alternativo à congelação, de fácil aplicação em condições de campo e sem a necessidade de equipamentos de alto custo, que melhor conserva as características dos embriões e/ou oócitos através do aumento da velocidade de resfriamento/reaquecimento, resultando em menores injúrias causada pelo frio (Saragusty; Arav, 2011).

Na vitrificação, a velocidade de resfriamento ultrarrápida é alcançada pela imersão do dispositivo contendo a célula em N₂ líquido, resultando em queda de temperatura de cerca de 2500°C/min, variação que depende do volume, da composição e da condutividade térmica da solução de vitrificação e do tipo de dispositivo utilizado (Palazs; Mapletoft, 1996). A alta viscosidade da solução de vitrificação, obtida pela concentração dos crioprotetores, é indispensável para que ocorra o processo de vitrificação (Vajta, 2000). Entretanto, concentrações muito altas de crioprotetores estão relacionadas ao estresse tóxico-osmótico e à prejuízos na qualidade e viabilidade das células após reaquecimento (Nícácio et al, 2011). Com o intuito de minimizar esse risco, é comum o uso combinado de diferentes crioprotetores para aumentar a viscosidade e diminuir a toxicidade da solução de vitrificação, resultando em maior temperatura de transição vítrea e eliminando a chance de formação de cristais de gelo intracelular (Saragusty; Arav, 2011). O volume da solução

no qual se coloca a célula é por fim o diferencial da segunda geração de protocolos de vitrificação: quanto menor o volume, maior a taxa de transferência de calor e maiores as chances de que ocorra a vitrificação (Vajta et al., 1998). An et al. (2015) obtiveram melhores taxas de sobrevivência e competência ao desenvolvimento após reaquecimento, tanto em embriões produzidos *in vivo* quanto em *in vitro*, utilizando volumes de 3 µL na vitrificação (*modified drop size*).

Embriões produzidos *in vivo* possuem menor conteúdo lipídico no seu citoplasma, o que pode explicar o seu melhor desempenho à criopreservação quando comparados com embriões produzidos *in vitro* (Dattena et al., 1999; De La Torre-Sanchez et al., 2006; Rizos et al., 2002). Porém, ainda é possível observar que a exposição aos crioprotetores resulta em diminuição do tamanho celular, diminuição do número de mitocôndrias, danos às microvilosidades de membrana e acúmulo de debris celulares nessa categoria de embriões (Fair et al., 2001). Além de redução em número de mitocôndrias, redução da atividade mitocondrial foi observada em embriões ovinos produzidos *in vivo* após a vitrificação, os quais também apresentaram desorganização do citoesqueleto, causada por ruptura dos filamentos de actina; presença de grandes vesículas no citoplasma, com algumas regiões ausentes de organelas; complexo de Golgi afastado do núcleo, e perda de algumas junções intercelulares (Dalcin et al., 2013). Alterações no potencial redox mitocondrial, avaliadas através da oxidação de FAD, e nas defesas endógenas antioxidantes foram observadas em oócitos após o processo de vitrificação, o que resultou em baixas concentrações de ATP no citoplasma (Zhao et al., 2011; Nohales-Córcoles et al., 2016). Os efeitos da vitrificação também podem ser observados quanto à estrutura de cromatina danificada e ao padrão de distribuição e agregação de mitocôndrias (indicativo de atividade mitocondrial e maturidade citoplasmática) demonstrando o impacto sobre o aspecto gênico e metabólico celular (Somoskoi et al., 2015). Tais consequências da vitrificação podem ser fatores limitantes nas taxas de sobrevivência após reaquecimento desses embriões e consequentemente nas taxas de gestação e de parições.

2.3 L-carnitina

2.3.1 Efeito da L-carnitina no metabolismo lipídico

A oxidação de ácidos graxos produz acetil-CoA, que é oxidada a CO₂ no ciclo de Krebs, sendo os elétrons resultantes dessa oxidação transportados através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial para produção de ATP. Dessa forma, a β -oxidação é a fonte de cerca de 80% da energia para a maioria das células em condições fisiológicas (Nelson; Cox, 2008). Ácidos graxos, mobilizados dos estoques citoplasmáticos, formam ésteres com Coenzima A (CoA) com quebra de ATP, resultando em acil-CoA citoplasmático. Através da ação da enzima *carnitine palmitoyltransferase 1* (CPT1), ocorre a transferência do éster de acil-graxo da molécula de CoA para o grupo hidroxil de uma molécula de carnitina, formando acil-carnitina, o qual é transportada por proteínas chamadas porinas na membrana mitocondrial externa, e por difusão facilitada através de uma proteína transportadora na membrana mitocondrial interna (Nelson; Cox, 2008). Uma vez na matriz mitocondrial, em reação catalizada por *carnitine palmitoyltransferase 2* (CPT2), o grupamento acil é transferido da molécula acil-carnitina para uma CoA formando acil-CoA, que segue para degradação na via de β -oxidação, enquanto a carnitina livre retorna ao espaço extramitocondrial para continuar a via de transporte (Nelson; Cox, 2008; Kerner; Hoppel, 2000).

A carnitina é uma amina quaternária, sintetizada naturalmente a partir dos aminoácidos metionina e lisina, que possui funções importantes no metabolismo intermediário na maioria dos tecidos de mamíferos (Bremer, 1983; Vaz; Wanders, 2002). Além de atuar como cofator no transporte de ésteres de ácidos graxos do citoplasma para a matriz mitocondrial, a carnitina também está envolvida no transporte de produtos da β -oxidação de peroxissomos para a mitocôndria para a oxidação em CO₂ e H₂O no ciclo de Krebs, e na modulação da razão acil-CoA/CoA, através da formação de ésteres com grupamentos acil, minimizando seus efeitos tóxicos para a célula (Jakobs; Wanders, 1995; McGarry; Brown, 1997). L-carnitina [3-hydroxy-4-(trimethylammonio)butyrate] é o L-estereoisômero biologicamente ativo da carnitina, utilizado também na suplementação de meios de cultivo visando o incremento da atividade mitocondrial em cultivo de células, oócitos e embriões (Dunning; Robker, 2012).

Carnitine acyltransferases são enzimas que atuam no metabolismo intermediário de ácidos graxos, modulando os *pools* de acetil-CoA e acil-CoA em diversos compartimentos celulares e contribuindo para a homeostase energética da célula (Zammit, 1999). *Carnitine palmitoyltransferase 1* e *2* (CPT1 e CPT2) são dois complexos multiproteína localizados nas membranas mitocondriais externa e interna, respectivamente, cuja função é a transferência dos ésteres acil-graxo entre as moléculas de CoA e carnitina, permitindo o transporte através das membranas mitocondriais e a continuidade da via de β -oxidação (Eaton; Bartlett; Pourfarzam, 1996). A carnitina é, dessa forma, uma molécula limitante nessa via, estando sua deficiência correlacionada com algumas síndromes causadas pela baixa atividade metabólica mitocondrial (Noland et al., 2009). CPT1 e CPT2 sofrem ação inibitória de malonil-CoA, um metabólito intermediário da biossíntese de ácidos graxos que sinaliza o balanço entre síntese e degradação desses compostos, de acordo com os requisitos energéticos da célula. CPTs atuam preferencialmente em ésteres de acil-CoA de cadeia longa no espaço extramitocondrial (Ramsay; Arduini, 1993; Ramsay; Gandour; van der Leij, 2001).

Carnitine O-acetyltransferase (CrAT) é outra enzima-chave no metabolismo intermediário em mitocôndrias, peroxisomos e retículo endoplasmático, pois realiza a transferência reversível de grupos acetil e acil de acetil-CoA/acil-CoA para a molécula de carnitina, regulando assim as razões acetil-CoA/CoA e acil-CoA/CoA no espaço intracelular, as quais são importantes para a produção de energia e a regulação das atividades celulares (Zammit, 1999). CrAT é um monômero com dois domínios, α e β , cujas interfaces formam um túnel no qual ocorre as reações químicas; no domínio C-terminal é onde se ligam a maioria das CoAs, já o túnel é o local de ligação da carnitina (Jogl; Tong, 2003; Wu et al., 2003). CrAT possui como substrato preferencial acil-CoAs de cadeia curta (Ramsay; Arduini, 1993; Ramsay; Gandour; van der Leij, 2001). Nesse contexto, a LC torna-se vital para a homeostase mitocondrial como substrato para CrAT, já que o excesso de acil-CoA e a indisponibilidade de CoA livre desencadeiam o bloqueio da via energética e o comprometimento dos metabolismos oxidativo, de carboidratos e aminoácidos, resultando em diminuição na produção de ATP e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pande; Blanchaer, 1971; Ramsay; Zammit, 2004; Marcovina et al., 2013).

A diminuição da expressão de enzimas do sistema carnitina, como CPT1, CPT2 e CrAT e uma alta razão acil-carnitina/carnitina livre são associadas com

disfunção da atividade mitocondrial (Sharma et al., 2008). O silenciamento do gene *CrAT* resulta em quebra da homeostase do sistema carnitina e da bioenergética mitocondrial, além de reduzir a expressão e atividade da enzima antioxidante SOD2, acarretando em aumento do estresse oxidativo dentro da mitocôndria (Sharma et al., 2013). Também é observado que na ausência de expressão de *CrAT* ocorrem diminuições no consumo de O_2 e na produção de ATP (Sharma et al., 2013). Estudo de Seiler et al. (2015), avaliou a relação entre *CrAT* e o exercício físico em camundongos. Nesse estudo pôde ser observado que a demanda energética celular estimula a diminuição de acetil-carnitina, que é mediada por *CrAT*. Quando essa enzima está indisponível, após o exercício ou demanda de produção de energia, os níveis de acetil-carnitina aumentam, ao passo que os níveis de acetil-CoA diminuem drasticamente. Após 1h do exercício, os níveis de acetil-CoA são reestabelecidos, enquanto que os níveis de acetil-carnitina permanecem elevados. Esse desequilíbrio na razão acetil-CoA/acetil-carnitina resulta em inércia metabólica e fadiga muscular (Seiler et al., 2015).

A estratégia de suplementação com LC pode reverter os efeitos inibitórios de outros compostos sobre a atividade mitocondrial, como o bloqueio da *citocromo-C oxidase* por fosfeto de alumínio, que resulta em inibição da cadeia transportadora de elétrons e prejuízos na produção de energia além de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Baghaei et al., 2016). Também já foi observado que em cultivo de folículos *in vitro*, LC estimula um aumento da β -oxidação durante a fase final de maturação oocitária (Dunning et al., 2011). A deficiência de LC já foi associada com diversas desordens metabólicas como obesidade, nefrotoxicidade, cirrose, desordens endócrinas e neuronais (revisado por Flanagan et al., 2010). A suplementação com LC em meio de cultivo estimula a expressão de CPT1 e CPT2, resultando em aumento da β -oxidação e redução do conteúdo lipídico em embriões bovinos (Ghanem et al., 2014). Além da sua conhecida ação estimuladora da β -oxidação (Dunning et al., 2010; Somfai et al., 2011), a LC pode ser benéfica também por aumentar a biodisponibilidade de carboidratos, que seriam utilizados para geração de energia, em vias não energéticas como síntese de ácidos nucleicos, ácido hialurônico e sinalização celular (Sutton-McDowall; Gilchrist; Thompson, 2010).

2.3.2 Efeito antioxidante da L-carnitina

Um equilibrado balanço do sistema redox dentro da célula é necessário para que funções vitais, como proliferação celular, expressão gênica, atividade enzimática, sobrevivência e morte celular ocorram de forma eficiente (Sun et al., 2008). Radicais livres são átomos ou moléculas com número ímpar de elétrons valentes, que entram em reações em cadeia desestabilizando outras moléculas e, em ciclo, geram mais radicais livres (revisado por du Plessis et al., 2008). ROS [superóxidos (O_2^-), radicais hidroxil (OH^-) e hidroperóxidos (H_2O_2)] abrangem radicais livres e radicais não livres derivados de oxigênio, produzidos fisiologicamente entre as fases intermediárias de redução do oxigênio na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Agarwal et al., 2004; Zhang; Gutterman, 2007). Uma excessiva produção de ROS, reflexo de um desequilíbrio no metabolismo mitocondrial, leva a danos ao DNA, lipídeos e proteínas via reações desencadeadas pelo estresse oxidativo; por outro lado, um excesso de substâncias antioxidantes pode resultar em quebra da homeostase celular através do bloqueio de vias sinalizadoras e da expressão de fatores de transcrição que são ativados por essas espécies reativas (Rand; Grant, 2006). Ainda que possam ser formadas pela ação de enzimas como NADPH oxidases, cerca de 95% das espécies reativas são derivadas do funcionamento normal da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, sendo sua produção, em níveis fisiológicos, importante para a homeostase celular pois funcionam como parâmetro de disfunção mitocondrial e sinalizam vias de reparo e morte celular (Manes; Lai, 1995; Sahin; DePinho, 2010). Em células de mamíferos, ao passo que a principal fonte de ROS via fosforilação oxidativa é a mitocôndria, a mesma é extremamente susceptível aos efeitos nocivos da alta concentração de ROS (Puddu et al., 2007). Os danos causados pelo aumento excessivo de ROS em DNA, proteínas e lipídeos mitocondriais desencadeiam na disfunção da cadeia transportadora de elétrons e prejuízo na produção de ATP, o que por sua vez aumentam ainda mais os níveis internos de ROS (Genova et al., 2004; Chan, 2006; Puddu et al., 2007).

A família de enzimas *peroxiredoxin* (PRDXs) atua na redução de hidroperóxidos, protegendo as células em situações de estresse oxidativo (Kowaltowski; Netto; Vercesi, 1998), e são amplamente expressas em oócitos e durante o desenvolvimento embrionário, com exceção de PRDX4, cuja expressão é dependente do estágio de desenvolvimento (Leyens; Knoop; Donnay, 2004). PRDX1

é uma enzima da subfamília 2-Cys PRDXs, que contém uma dobra *thioredoxina*, está localizada no citoplasma e que realiza sua função detoxificante através da oxidação do conservado resíduo Cys⁵¹ N-terminal, reagindo principalmente com H₂O₂ (Neumann; Cao; Manevich, 2009). PRDX1 atua no sistema antioxidante como ‘scavenger’ (limpador) cooperando com diversas enzimas e vias de sinalização de sobrevivência e morte celular (Kim et al., 2008; Gertz et al., 2009). Embora seja uma enzima com função antioxidante, PRDX1 pode sofrer ação de altas concentrações de ROS e alterar sua funcionalidade para chaperona (Jang et al., 2004), devido ao fato de ser o resíduo Cys⁵¹ muito instável e altamente reativo; sua superoxidação resulta em ácido sulfínico ou sulfônico, alterando sua conformação (Clairborne et al., 1999). A elevada expressão de membros dessa família está correlacionada com *downregulation* de ROS e apoptose em células cancerígenas, conhecidas por estarem sujeitas a constante estresse oxidativo (Deng et al., 2005; Kwon et al., 2015). Nesse contexto, PRDX1 é um marcador endógeno de estresse oxidativo celular.

A utilização de antioxidantes em sistemas de produção *in vitro*, conhecidos por seus efeitos estressantes, tem obtido sucesso nas taxas de desenvolvimento de blastocistos e sobrevivência após transferência (Truong; May Soh; Gardner, 2016). Além de contribuir para a homeostase celular através do adequado funcionamento do metabolismo mitocondrial, a LC é conhecida por atuar no sistema antioxidante da célula principalmente via aumento da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes como *OH-1* e *ecNOS*, *catalase* (CAT), *superoxide dismutase* (SOD) *glutathione peroxidase* (GPx), e *γ-glutamyl cysteine synthetase* (γ-GCS) (Calò et al., 2006; Ghanem et al., 2014; Bavari et al., 2016; Roy; Verma; Krishna, 2016; Wang et al., 2016). Ações de ‘scavenging’ e de inibição de peroxidação lipídica também vem sendo associadas à LC, de forma dose-dependente em sistemas de culturas de células sob estresse oxidativo (Li et al., 2012). Os resultados do efeito antioxidante da LC podem ser observados através de menor produção de ROS intracelular, resultando em menores índices de apoptose e maior viabilidade celular (Wu et al., 2011; Dunning; Robker, 2012; Wang et al., 2016).

2.4 Metabolismo embrionário

Metabolismo envolve uma série de processos que tem por objetivo prover energia para sustentar o funcionamento adequado da célula, manter a homeostase celular e prover metabólitos para a biossíntese de componentes celulares (Leese,

2012). O desenvolvimento pré-implantacional do embrião consiste de um processo dinâmico onde um adequado suprimento energético, através do ATP gerado principalmente pelas mitocôndrias, é essencial para as sucessivas divisões mitóticas e todos os eventos celulares durante essa fase (Van Blerkom, 2011). Desde a fase de zigoto até a implantação no útero, uma série de fatores contribuem para as mudanças no padrão metabólico do embrião. Na fase pré-implantacional, o metabolismo oxidativo é a principal fonte de energia em embriões, na forma de ATP (Brinster, 1973 citado por Leese, 2012). Com o avanço das primeiras clivagens, o consumo de oxigênio, que em princípio é baixo, torna-se crescente com a formação do blastocisto, refletindo a necessidade de aumentar a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ para formação da blastocela e para síntese proteica do embrião (Donnay; Leese, 1999; Houghton et al., 2003).

Embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, os quais ocorrem durante a passagem pelo oviduto, preferencialmente metabolizam ácidos tricarboxílicos, como piruvato e lactato (Biggers, 1967), ao passo que a mudança para o ambiente menos oxigenado do útero desencadeia um aumento do metabolismo de glicose, passando essa a ser uma importante fonte de energia para embriões após a fase de compactação (Thompson, 2000; Harvey, 2007). Fatores induzidos pela baixa tensão de O_2 uterina atuam regulando a expressão de genes envolvidos com o aumento do metabolismo glicolítico e com a competência ao desenvolvimento durante essa fase (Harvey, 2007). O consumo de O_2 aumenta significativamente com o durante a passagem pelo oviduto, e volta a diminuir após a entrada no útero e implantação do embrião, ao passo que o consumo de glicose, que é baixo durante o trajeto do embrião pelo oviduto, passa a aumentar quando o mesmo entra no ambiente uterino (Houghton et al., 1996). Já foi relatada a relação entre a expressão dos genes *GLUT1* (transportador de glicose 1) e *G6PD* (glicose-6-fosfato desidrogenase) e o aumento da atividade metabólica com o consumo de O_2 em blastocistos com maior competência *in vitro* (Lopes et al., 2007).

Embriões de mamíferos também possuem requisitos de aminoácidos essenciais e não essenciais para o seu pleno desenvolvimento. Os benefícios do suprimento de alanina e glicina em meios de cultivo *in vitro* já são conhecidos (Absalón-Medina; Butler; Gilbert, 2014). Metionina e lisina também são aminoácidos requeridos, envolvidos em processos epigenéticos importantes para a reprogramação do genoma embrionário, sendo a lisina também importante em diversas vias

metabólicas através da doação de esqueletos de carbono (Kwong et al., 2010; Monteiro et al., 2011).

Ácidos graxos são uma potencial fonte de energia para o desenvolvimento embrionário (Kane, 1979). A maior parte dos lipídeos em oócitos de mamíferos é composta por triglicerídeos (25-35% por ácido palmítico, 22-26% por ácido oleico e 14-16% por ácido esteárico) (McEvoy et al., 2000), sendo parte dessa reserva energética consumida ao longo da maturação e do desenvolvimento embrionário (Ferguson; Leese, 1999). Embora durante a fase de pré-compactação a via de utilização de carboidratos seja a principal fonte de ATP para o embrião, é possível observar que na ausência dos mesmos ocorre produção de energia via metabolização de ácidos graxos intracelulares, sem prejuízos nas taxas de embriões alcançando o estágio de blastocisto (Sutton-McDowall et al., 2012). O bloqueio experimental da via de β -oxidação em embriões durante o CIV resulta em bloqueio do desenvolvimento em embriões iniciais bovinos, porcos e murinos, resultados que demonstram a importância dos ácidos graxos como fonte de energia no desenvolvimento inicial do embrião (Ferguson; Leese, 2006; Sturmey; Leese, 2007; Dunning et al., 2010). Entretanto, a via da β -oxidação requer a mobilização dos ácidos graxos das gotas lipídicas citoplasmáticas e o transporte dos mesmos através da membrana mitocondrial, ação que pode ser tornar limitada com a indisponibilidade de carnitina livre na célula (Sutton-McDowall et al., 2012).

2.5 Técnicas de avaliação embrionária *in vitro*

2.5.1 Avaliação morfocinética embrionária

A avaliação da dinâmica do desenvolvimento é um método não invasivo para prever viabilidade embrionária, amplamente utilizado em pesquisas *in vitro*. Após a fertilização *in vitro*, a ocorrência das primeiras clivagens mais precocemente foi correlacionada com melhores respostas de gestação em humanos (Shoukir et al., 1997; Salumets et al., 2003). Estudo morfocinético de Meseguer et al. (2011) também correlacionou a precocidade das primeiras clivagens e do ciclo celular como um todo com alta viabilidade embrionária após a implantação, validando esse método de avaliação para classificação em embriões para transferência.

O tempo de reexpansão de blastocle e as taxas de reexpansão e eclosão após reaquecimento de embriões submetidos à vitrificação também são utilizadas

como parâmetro de viabilidade e seleção embrionária (Vajta et al., 1996; Rizos et al., 2003). Leoni et al. (2008) observaram que embriões ovinos que tiveram suas blastocèles reexpandidas dentro de 8h após o reaquecimento apresentaram maiores taxas de eclosão e de número de células totais em comparação com embriões mais tardios, o que pode ser traduzido por maior viabilidade embrionária após o reaquecimento. Em outro estudo com embriões ovinos produzidos *in vitro* em diferentes estágios de desenvolvimento, cerca de 70% dos embriões submetidos à vitrificação reexpandiram a blastocèle dentro de 3h de CIV após o reaquecimento, resultados que foram correlacionados com alta viabilidade embrionária (dos Santos Neto et al., 2015). Apesar desses resultados, ainda é usual utilizar um período de 24 e 48h para observação de reexpansão de blastocèle e eclosão, respectivamente (Ha et al., 2015; Stinshoff et al., 2011; Vajta et al., 1998; Varago et al., 2014).

A análise morfológica do desenvolvimento embrionário vem sendo utilizada ao longo do tempo para predizer a qualidade dos embriões e das condições de cultivo impostas a essas células (Dattena et al., 2004; Araújo-Lemos et al., 2014). Análises de número total de células, número de células apoptóticas, taxa de desenvolvimento pelo tempo de cultivo, taxa de reexpansão de blastocèle após criopreservação, além de número de crias nascidas após transferência são bem estabelecidas, porém são medidas de inferência indireta da qualidade dos embriões sob determinado tratamento (Barnett; Bavister, 1996; Okada et al., 2002; Shirazi et al., 2010; Araújo-Lemos et al., 2014; Oliveira et al., 2016).

2.5.2 Técnicas de avaliação por coloração

Com o avanço dos conhecimentos sobre a compartimentalização celular, foi possível a elaboração de sondas específicas para moléculas- ou organelas-alvo, de modo a permitir o avanço nas pesquisas levando em consideração a organização espacial dentro da célula (Barnett; Bavister, 1996). Existem atualmente uma diversidade de técnicas e produtos para se avaliar a qualidade de oócitos e embriões, de acordo com o objetivo do estudo. Protocolos com sondas fluorescentes que se ligam ao DNA, como o Hoechst 33342 ou DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride), já são bem estabelecidos e utilizados na rotina de muitas pesquisas em embriologia para contagem do número total de blastômeros, dados que são correlacionados com viabilidade embrionária (Albuz et al., 2010; Rose et al., 2013; Thomas et al., 2004). Ensaios de fluorescência que utilizam anticorpos primário e

secundário para marcar moléculas-alvo também são bem estabelecidos, como o ensaio com anticorpo para caspase-3, com objetivo de avaliar células que sofreram o processo de apoptose pela ação dessa enzima (Oliveira et al., 2016).

Os protocolos de coloração podem ser realizados em combinação para realização de análises correlacionadas entre si. No protocolo com reação de TUNEL (*terminal deoxynucleotil transferase uracil nick end labeling*), que avalia apoptose celular, realiza-se uma etapa com Hoechst 33342 com objetivo de correlacionar o número total de células com o número de células em apoptose para cálculo do índice apoptótico (Paula-Lopes; Hansen, 2002; Sudano et al., 2011). Com o mesmo objetivo, uma etapa com Hoechst 33342 pode ser acrescentada no protocolo de imunofluorescência com caspase-3, com bons resultados (Oliveira et al., 2016).

O objetivo da análise proposta determina o tratamento que as células receberão para realização do protocolo. Enquanto o tratamento prévio como paraformaldeído (PFA) é requisito para algumas técnicas de coloração (Franciosi et al., 2014; Caamaño et al., 2015; de Cesaro et al., 2015), análises funcionais necessitam que os parâmetros sejam avaliados na célula viva, geralmente sob condições de cultivo, como por exemplo os protocolos que avaliam atividade mitocondrial (Barnett et al., 1996; Dalcin et al., 2013). A atividade do potencial elétrico da membrana mitocondrial interna, a qual reflete a atividade dessa organela, pode ser mensurada através da incubação dos embriões por 15 min com a sonda fluorescente Rhodamine 123, diluída em meio de cultivo previamente equilibrado, sendo em seguida observados em microscópios de fluorescência ou Confocal (Barnett et al., 1996). CellROX® Green é outro exemplo de sonda utilizada para avaliar indiretamente a atividade mitocondrial, cuja intensidade de fluorescência é emitida pela ligação dos reagentes ao DNA nuclear e mitocondrial, que apenas ocorre após oxidação na presença de espécies reativas de oxigênio (informações do fabricante). O protocolo com CellROX® Green, assim como Mitotracker® Red CMXRos (outra sonda que avalia atividade mitocondrial), requer a incubação das células vivas em meio de cultivo com a sonda, por aproximadamente 15 min, com posterior fixação em paraformaldeído, com avaliação realizada através de mensuração de intensidade de fluorescência emitida equivalente à quantificação de ROS intracelular (Dalcin et al., 2013; de Assis et al., 2016; Ortega et al., 2016). Uma maneira indireta de avaliação metabólica, com o intuito de avaliar os estoques energéticos em embriões após um determinado tratamento, é a coloração de lipídeos intracelulares realizada através de

colorações como Sudan Black B (Sudano et al., 2011), BODIPY 493/503 (Sutton-McDowall et al., 2012), Nile Red (Gajda et al., 2011; Accorsi et al., 2016) ou Oil Red O (Niu et al., 2015).

2.5.3 Avaliação da expressão gênica em embriões

Os métodos mais tradicionais de avaliação de qualidade embrionária, como análise morfológica sob estereomicroscópio, são ferramentas úteis e muito praticadas na produção de embriões, mas nem sempre correspondem à real qualidade dos embriões e sua competência ao desenvolvimento. Embriões morfológicamente semelhantes podem possuir diferentes potenciais de desenvolvimento devido a diferenças de ordem molecular (Jousan et al., 2008; Cánepa et al., 2014). Durante o processo pelo qual o oócito fertilizado inicia as primeiras clivagens e se desenvolve até o estágio de blastocisto, uma profunda mudança em nível molecular acontece, com o consumo do estoque de transcritos maternos ao passo que se dá o início da expressão do genoma embrionário (Telford; Watson; Schultz, 1990). Após a transição materno-zigótica, duas principais ondas de transcrição ocorrem: a transcrição *de novo* (ativação principal, onde ocorre uma onda de metilação de todo o DNA após prévia demetilação), e uma onda de transcrição menor, que precede a fase de transição mórula-blastocisto, a qual envolve genes relacionados a moléculas de adesão intercelular, à polarização de blastômeros e compactação, parâmetros de qualidade implantacional do blastocisto (revisado por Wang; Dey, 2006). Nessa fase, alterações na atmosfera do ambiente (Calder et al., 2011; Gaspar et al., 2015), no tipo ou meio de cultivo (Wrenzycki et al., 1999; Lee et al., 2001; Calder et al., 2011) ou o processo de criopreservação (Larman et al., 2011; Shaw et al., 2012) aos quais os embriões sejam submetidos podem alterar seu padrão de expressão gênica, podendo resultar em comprometimento da sua competência de gerar uma prenhez e vir à termo.

A ferramenta de análise da expressão global gera um número elevado de informações valiosas, por traçar um mapa identificando os padrões de expressão gênica em uma determinada célula. Através dessa ferramenta, torna-se possível avaliar diferenças no padrão de expressão gênica entre embriões, possibilitando identificar possíveis vias alteradas em resposta ao mesmo tratamento ou a tratamentos diferentes (Mamo et al., 2006; Larman et al., 2011; Rekik; Dufort; Sirard, 2011; Aksu et al., 2012; Saenz-de-Juano et al., 2012). Identificadas as vias de interesse, as análises de expressão de genes-alvo funcionam como ferramenta no

estudo de como os embriões respondem a determinado fator, seja um sistema de cultivo ou um fator de estresse, contribuindo com os conhecimentos sobre a fisiologia embrionária e permitindo o aprimoramento dos sistemas de produção de embriões (Shaw et al., 2012; Machado et al., 2013; Yoon et al., 2013). Comparando-se com a expressão de um gene que não é alterado pelo tratamento (chamado 'gene endógeno'), e com um grupo de embriões fisiologicamente normais, é possível avaliar diferenças de expressão gênica entre grupos e o efeito na qualidade dos embriões sobre determinada condição (Sengodan et al., 2014).

Estudos com embriões vem demonstrando alterações no padrão de expressão gênica causadas pelo processo de criopreservação (Mehaisen et al., 2015; Zhao et al., 2015). As principais alterações causadas pela vitrificação ocorrem em nível de expressão de genes relacionados à resposta ao estresse. Parte dos genes diferencialmente expressos em embriões *in vivo* vitrificados estão relacionados a resposta ao estresse oxidativo, citoesqueleto, transporte de íons e formação do sistema nervoso (Aksu et al., 2012). Essa análise permite selecionar de forma mais criteriosa embriões de linhagens mais resistentes, ou protocolos de vitrificação ou cultivo que causem menores alterações em nível de expressão gênica, aumentando a viabilidade e o sucesso na produção de crias nascidas.

3. JUSTIFICATIVA

A ovinocultura vem mostrando seu potencial crescimento no estado do Rio de Janeiro, devendo-se isso à busca do produtor rural pela profissionalização da atividade com a adoção de tecnologias que trazem maior produtividade e rentabilidade. Avanços ainda são necessários, e as biotecnologias reprodutivas como a estimulação hormonal para produção de embriões *in vivo* representam potenciais ferramentas para esse progresso. Para melhor empregar tais técnicas e programar o calendário de parições e fornecimento de produtos ao mercado consumidor, o emprego das biotécnicas de criopreservação torna-se ímpar. Além de otimizar o uso de protocolos hormonais e materiais utilizados, é possível a preservação de material genético superior para estações com maior demanda de consumo e incrementar os programas de melhoramento genético em ovinos no estado do Rio de Janeiro. O presente trabalho, ao nosso conhecimento, é o único até o momento a testar a suplementação de LC no protocolo de vitrificação para a espécie ovina, o qual objetiva, além de elucidar as respostas fisiológicas de embriões ovinos produzidos *in vivo* a esse protocolo, aprimorar essa biotécnica de criopreservação resultando em maior aplicabilidade na cadeia produtiva de ovinos no Brasil.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da suplementação de LC nas soluções de vitrificação ou reaquecimento sobre a sobrevivência de embriões ovinos da raça Santa Inês produzidos *in vivo*.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da suplementação de LC na solução de vitrificação ou de reaquecimento sobre taxas de reexpansão e eclosão de embriões cultivados *in vitro* por 72h após o reaquecimento;
- Avaliar as concentrações de espécies reativas de oxigênio e número total de células em embriões vitrificados na presença e ausência de LC;
- Avaliar o número de células apoptóticas e índice apoptótico em embriões vitrificados na presença e ausência de LC;
- Avaliar o perfil de expressão de genes relacionados ao transporte mitocondrial de ácidos graxos (*CPT1*; *CPT2*; *CrAT*) e ao estresse oxidativo (*PRDX1*) em embriões vitrificados na presença ou ausência de LC, ou reaquecidos na presença ou ausência de LC.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto obteve aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais, número de protocolo 699, da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

A produção, colheita e vitrificação dos embriões do ensaio 1 foram realizadas na Unidade de Pesquisa em Caprinos e Ovinos (UniPECO) localizada na Fazenda Escola da Faculdade de Veterinária da UFF, em Cachoeiras de Macacu, RJ. Os embriões do ensaio 2 foram produzidos e vitrificados no Campo Experimental José Henrique Bruschi, Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco, MG).

As análises de sobrevivência embrionária após reaquecimento, de espécies reativas de oxigênio (ROS), do número total de células (NTC) e da expressão gênica foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal e de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, localizados em Juiz de Fora – MG. As análises de NTC conjuntamente com índice apoptótico foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica, Embrapa Gado de Leite (Valença, RJ).

5.1 Ensaio 1 – Efeito da suplementação de L-carnitina na solução vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vivo*

5.1.1 Desenho experimental

Para avaliar o efeito da suplementação de L-carnitina na solução de vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vivo*, 25 ovelhas nulíparas da raça Santa Inês ($11,9 \pm 1,1$ meses, ECC: $2,8 \pm 0,3$) foram submetidas a três sessões de estimulação hormonal ovariana, conforme o protocolo descrito no item 5.1.2. Os embriões em estágio de mórula (Mo); blastocisto inicial (Bi); blastocisto (BI); blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be), classificados como grau I e II foram divididos uniformemente em dois grupos experimentais, Controle (C1) e L-carnitina (LC1) para vitrificação (Figura 1). Onze embriões foram congelados frescos para formar o grupo controle fisiológico (CF) para a análise de expressão gênica. O grupo C1 foi formado de embriões vitrificados conforme o protocolo descrito por Guignot *et al.* (2006) com pequenas modificações, enquanto que no grupo LC1, as soluções de vitrificação, seguindo o mesmo protocolo, foram suplementadas com 3,72 mM de L-carnitina (Moawad et al., 2014). Após o reaquecimento, os embriões foram cultivados *in vitro* por 72h. As análises de taxa de reexpansão de blastocle foram realizadas nos momentos 24, 48 e 72h e as taxas de eclosão às 72h após

reaquecimento. Às 24h de CIV, uma amostra de embriões reexpandidos de cada grupo experimental foi retirados da placa e lavados três vezes na solução de PBS com 0,1% de álcool polivinílico (PBS-PVA). Quinze embriões (8 de C1 e 7 de LC1) foram congelados para análise de expressão gênica em 1 µL de PBS-PVA e armazenados em criotubos a -80°C. Vinte e dois embriões (9 de C1 e 13 de LC1) foram submetidos à coloração *in vivo* para avaliação de ROS e número total de células. Os embriões restantes foram mantidos em placa de CIV para avaliação de sobrevivência, de número total de células e de apoptose às 72h de CIV.

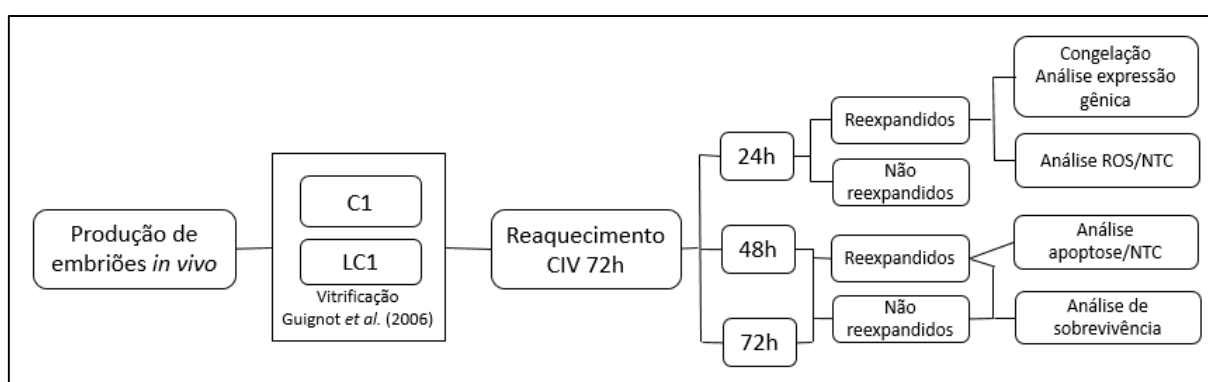


Figura 1 – Delineamento do ensaio 1: embriões produzidos *in vivo* foram vitrificados pelo protocolo de Guignot *et al.* (2006) sem suplementação (C1) ou com suplementação de L-carnitina (LC1) na solução de vitrificação. Os embriões foram reaquecidos e cultivados *in vitro* por 72h. Análise para número total de células e espécies reativas de oxigênio (ROS) e congelamento para posterior análise de expressão de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e estresse oxidativo foram realizados às 24h de CIV em parte dos embriões reexpandidos. Os embriões restantes que alcançaram a reexpansão de blastocelo foram fixados às 72h para análise de número de células e apoptose.

5.1.2 Produção *in vivo* de embriões

Vinte e cinco ovelhas núlparas da raça Santa Inês ($11,9 \pm 1,1$ meses, ECC: $2,8 \pm 0,3$) foram submetidas a três sessões de estimulação hormonal ovariana, utilizando-se o cio base para início do protocolo (D0). Para sincronização prévia da emergência folicular, foi utilizado o protocolo proposto por Balara *et al.* (2016), onde um implante vaginal contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Zoetis, Campinas, São Paulo, Brasil) foi mantido por 6 dias; 24 horas antes da remoção do implante foram aplicadas 300 UI de eCG (Novormon®, Schering

Plough, São Paulo, Brasil) e 0,24 mg de cloprostenol sódico (Estron[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). Trinta e seis horas após a remoção da esponja, os animais receberam 25 µg de lecorelina (Gestran Plus[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). A superovulação foi iniciada 80 h após a retirada da esponja. Foram utilizados 200 mg de FSH / por animal (Folltropin[®], União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, Brasil) em seis doses decrescentes a cada 12 horas (50/50, 30/30, 20/20 mg). Na última dose de FSH, realizou-se a aplicação de 0,24 mg de cloprostenol (Estron[®], Agener União, São Paulo, Brasil) e, 24 horas após, 0,025 mg de lecorelina (Gestran Plus[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). Em paralelo, na primeira dose de FSH uma nova esponja (Progespon[®], Zoetis, Campinas, São Paulo, Brasil) foi inserida e removida na penúltima dose deste hormônio. Após a última dose de FSH foi realizada a monta natural controlada, com macho reprodutor da mesma raça, a cada 12 horas.

As colheitas dos embriões foram realizadas por laparotomia entre os dias 6 e 7 de desenvolvimento embrionário. Os animais foram submetidos à anestesia geral para realização do procedimento cirúrgico de coleta. Para medicação pré-anestésica foram administrados via intravenosa (IV) 0,1 mg/Kg de acepromazina (Acepran[®], Vetnil, Louveira, São Paulo, Brasil) e 0,3 mg/Kg de diazepam (Diazepam[®], Teuto, Anápolis, Goiás, Brasil) acrescida de 0,4 mg/Kg de morfina (Dimorf[®], Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) por via IM. A indução anestésica foi realizada com 6 mg/Kg de cetamina (Cetamin[®], Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil) e 1 mg/Kg de propofol (Provive[®], Claris, Barueri, São Paulo, Brasil) por via IV. Para manutenção anestésica foi utilizado o anestésico inalatório isoflurano (Isoforine[®], Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil). Laparotomia foi realizada para acesso aos cornos uterinos, nos quais foram realizadas incisões para realização da lavagem interna com PBS suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB). O lavado uterino foi acondicionado em tubos cônicos de 50 mL e transportados ao laboratório, para triagem e classificação morfológica dos embriões obtidos.

Os embriões obtidos foram submetidos à classificação quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela IETS, antes da distribuição nos grupos experimentais. Os embriões em estágio de mórula (Mo); mórula compacta (Mc), blastocisto inicial (Bi); blastocisto (BI); blastocisto expandido (Bx) e blastocisto em eclosão/eclodido (Be) classificados como grau I e II foram agrupados quanto ao estágio de desenvolvimento, e uniformemente distribuídos dentro dos grupos experimentais.

Foram recuperadas, em três sessões, 203 estruturas, das quais 164 foram embriões viáveis, com uma taxa de 80,78% de embriões viáveis produzidos neste ensaio. Destes, 25,61% (42/164) foram classificados como mórula, 42,68% (70/164) como mórula compacta, 11,58% (19/164) como blastocisto inicial, 10,97% (18/164) como blastocisto, 7,31% (12/164) como blastocisto expandido e 1,83% (3/164) como blastocisto eclodido. Ainda, 19,21% das estruturas (39/203) foram consideradas como estruturas não viáveis (oócitos não fecundados, zona pelúcida ausente de embrião ou embriões degenerados). Os dados de produção e classificação dos embriões coletados encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Número total de estruturas recuperadas por laparotomia e classificação morfológica de embriões de acordo com o estágio de desenvolvimento

Mês da colheita	Recuperados (n)	TV (n)	TNV (n)	Mo (n)	Mc (n)	Bi (n)	Bl (n)	Bx (n)	Be (n)
Março	127	105	22	32	38	14	8	10	3
Maio	45	31	14	3	18	4	6	0	0
Junho	31	28	3	7	14	1	4	2	0
TOTAL	203	164	39	42	70	19	18	12	3
n (%)		(80,78)*	(19,21)*	(25,61)**	(42,68)**	(11,58)**	(10,97)**	(7,31)**	(1,83)**

Abreviaturas: Mo (mórula); Mc (mórula compacta); Bi (blastocisto inicial); Bl (blastocisto); Bx (blastocisto expandido); Be (blastocisto em eclosão/eclodido); TV (total de estruturas recuperadas viáveis); TNV (total de estruturas recuperadas não viáveis). * (n*100)/n total recuperado. ** (n*100)/n viáveis

5.1.3 Vitrificação e reaquecimento dos embriões

Foram utilizados dois crioprotetores, glicerol (G) e etilenoglicol (EG) em três soluções: (i) solução 1 (10% G); (ii) solução 2 (10% G e 20% EG); e (iii) solução 3 (25% G, 25% EG e 1 M sacarose). Em grupos de dois, os embriões passaram por duas lavagens em meio base OCM [Ovum culture medium, 20% new born calf serum (NBCS) em PBS], em seguida foram transferidos para gota de 100 µL da solução 1 onde permaneceram por 5 min, sendo então transferidos para gota com solução 2 por mais 5 min. Durante esse tempo, a palheta foi preparada com uma coluna de 5 cm de solução galactose 0,85 M, uma coluna de ar e uma 0,5 cm de solução 3. Os embriões foram transferidos para solução 3 e imediatamente envasados em uma coluna de 1 cm dessa solução, seguida por uma coluna de 0,5 cm de ar, completando-se a palheta

com solução de galactose 0,85 M. As palhetas foram imersas em N₂ líquido. O tempo entre a transferência para a solução 3 e o N₂ não excedeu 30 segundos.

Antes do envase, as palhetas foram identificadas com números sequenciais e em ficha própria os respectivos números foram identificados com data do procedimento e conteúdo (número de embriões e classificação dos mesmos). Todas as palhetas foram armazenadas em botijão com N₂ líquido, em canecas e raques previamente identificados, até a realização das análises.

No reaquecimento, as palhetas foram retiradas uma a uma do botijão, deixadas ao ar por 5 segundos e por 15 segundos em banho-maria a 22°C. O conteúdo da palheta foi depositado em placa vazia e homogeneizado imediatamente, aguardando-se 5 min em temperatura ambiente. Os embriões foram aspirados com o mínimo possível desse meio e transferidos para placa contendo 2 mL de OCM, aguardando-se 5 min em temperatura ambiente, após os quais foram lavados em OCM a 39°C.

5.2 Ensaio 2 – Efeito da suplementação com L-carnitina na solução de reaquecimento de embriões ovinos produzidos *in vivo*

5.2.1 Desenho experimental

Para avaliar o efeito da suplementação de L-carnitina na solução de reaquecimento de embriões ovinos produzidos *in vivo*, 26 ovelhas da raça Santa Inês foram submetidas a protocolo de estimulação hormonal ovariana, conforme o protocolo descrito no item 5.2.2. Os embriões obtidos e classificados nos graus I, II e III foram submetidos à vitrificação segundo protocolo de Gibbons et al. (2011), com pequenas modificações. Onze embriões foram congelados frescos para formar o grupo controle fisiológico (CF) para análise de expressão gênica. Para o reaquecimento, os embriões foram homogeneamente divididos nos grupos controle (C2), reaquecimento sem suplementação, e L-carnitina (LC2), com suplementação de 3,72 mM de LC nas soluções de reaquecimento. Após o reaquecimento, os embriões foram cultivados *in vitro* por 72h (Item 5.3). As análises de taxa de reexpansão de blastocle foram realizadas nos momentos 24, 48 e 72h e as taxas de eclosão às 72h após reaquecimento. Dezoito embriões reexpandidos (6 embriões do grupo C2 e 12 do grupo LC2) foram retirados da placa de CIV às 24h de cultivo, lavados três vezes na solução de PBS com 0,1% de álcool polivinílico (PBS-PVA), e congelados a -80°C

para análise de expressão gênica. Os embriões restantes foram mantidos em placa de CIV para avaliação de sobrevivência às 72h.

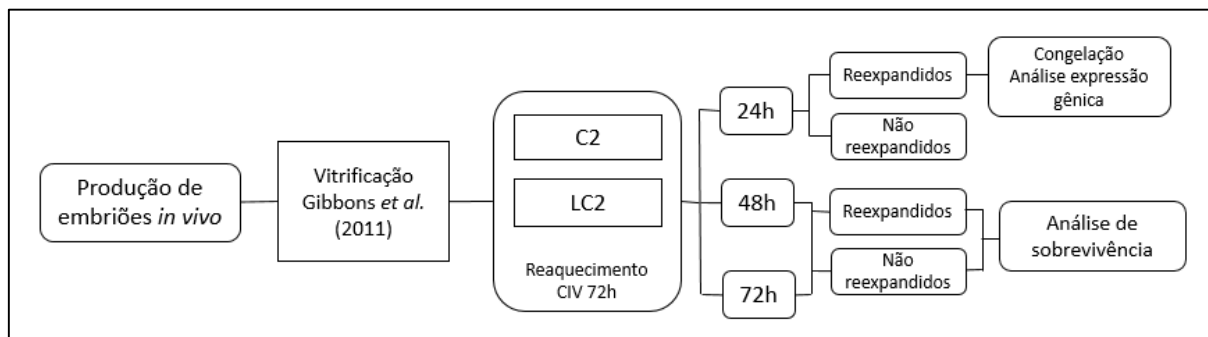


Figura 2 – Delineamento do ensaio 2: embriões produzidos *in vivo* previamente vitrificados pelo protocolo de Gibbons *et al.* (2011) foram reaquecidos sem suplementação (C2) ou com suplementação de 3,72 mM de L-carnitina (LC2) nas soluções de reaquecimento e cultivados *in vitro* por 72h. Congelamento para posterior análise de expressão de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e estresse oxidativo foi realizado às 24h de CIV em parte dos embriões reexpandidos. Os embriões restantes foram cultivados até às 72h para análise de sobrevivência.

5.2.2 Produção *in vivo* de embriões

Vinte e seis ovelhas da raça Santa Inês receberam esponjas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon®, Zoetis, Campinas, São Paulo, Brasil) por 6 dias. Às 24 h antes da remoção das esponjas, foram administrados 300 UI de eCG (Novormon 500®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) IM e 37,5 µg de cloprostenol (Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil) laterovulvar. Após remoção da esponja, o estro foi monitorado a cada 12 h e as fêmeas consideradas em estro foram colocadas para monta natural com reprodutores da mesma raça. A colheita dos embriões foi realizada no D7 de desenvolvimento, por via transcervical, os quais foram classificados quanto à qualidade e estágio de desenvolvimento.

5.2.3 Vitrificação e reaquecimento dos embriões

Após a coleta e classificação os embriões foram mantidos por 20 min a temperatura ambiente no meio base (MB), consistindo de PBS suplementado com 20% de SFB. Para vitrificação, os embriões foram expostos a três diferentes soluções, compostas por diferentes concentrações de crioprotetores no MB: solução 1 (MB +

10% G) por 5 min; solução 2 (MB + 10% G e 10% EG) por 5 min e solução 3 (MB + 25% G e 25% EG) por 30 seg. Durante os 30 seg na solução 3, os embriões foram aspirados em 1 µL dessa solução em ponteiros de 10 µL, as quais foram desacopladas da micropipeta e imersas em N₂ líquido. Em seguida, as ponteiros contendo os embriões foram armazenadas em criotubos previamente identificados, com orifício na tampa para permitir o contato da ponteira com o N₂ líquido durante o período de estocagem em botijão de N₂.

Para o reaquecimento, as ponteiros foram retiradas dos criotubos e suas pontas foram diretamente mergulhadas na solução 1 de reaquecimento (S1) composta de MB acrescido de 12,5% de G, 12,5% de EG e 0,5 M sacarose por 5 min em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, os embriões foram recuperados e transferidos para S2 (meio base OCM com 0,5 M sacarose) por 5 min; então transferidos para S3 (OCM com 0,25 M sacarose) por mais 5 min e por fim lavados em OCM a 39°C. No grupo LC2, todas as três soluções foram suplementadas com 3,72 mM de LC.

5.3 Cultivo *in vitro* (CIV) e análise de taxa de sobrevivência

Procedeu-se o mesmo protocolo de CIV para os ensaios 1 e 2. Ao final do reaquecimento, os embriões foram transferidos para gotas de 50 µL de meio CR2 (Wilkinson et al., 1996) para CIV em estufa incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂ em umidade máxima. O meio CR2 é composto por CR2 estoque (108 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 26 mM de bicarbonato, 10 mM de glicina, 1 mM de alanina, 1 mM de glutamina e 4,3 mM de hemi cálcio lactato em água Milli-Q) suplementado com 0,36 mM de piruvato de sódio, 10 µL de antibiótico, 0,01 g de albumina sérica bovina (BSA), 100 µL de Minimum Essential Eagle Medium (MEM), 200 µL de Basal Eagle Medium (BME) e 2,5% de soro fetal bovino (SFB). As análises das taxas de reexpansão de blastocle foram realizadas nos momentos 24, 48 e 72h e as taxas de eclosão às 72h após reaquecimento.

5.4 Avaliação dos níveis de ROS e do NTC às 24h de CIV

A análise dos níveis intracelulares de ROS por protocolo de coloração com CellROX Green se dá através de mensuração da intensidade de fluorescência emitida pela ligação dos reagentes do CellROX Green ao DNA nuclear e mitocondrial, que apenas ocorre após oxidação na presença de ROS. No ensaio 1, a avaliação do

número total de células (NTC) e ROS foi realizada através das colorações com Hoechst 33342 e CellROX Green (ambos Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Os embriões foram retirados da placa de CIV às 24h de cultivo, passaram por lavagem em PBS com 0,1% PVA e foram transferidos para poço contendo PBS-PVA com CellROX Green (10 mM) e Hoechst 33342 (2,5 μ M) por 30 min em ambiente protegido de luz. Após esse período, os embriões foram submetidos a três lavagens em PBS-PVA e fixados por 30 min em solução PFA 4%. Após a fixação, os embriões foram novamente lavados em PBS-PVA, e dentro de 24h foram avaliados em microscópio de fluorescência. Para isso os mesmos foram dispostos em lâminas e cobertos com lamínulas, avaliados em microscópio de fluorescência Olympus BX53, com comprimento de onda de excitação/emissão de 350/461 para Hoechst e 485/520 para CellROX Green. As imagens foram capturadas com câmera Olympus DP73 acoplada ao mesmo microscópio. O NTC foi avaliado manualmente através da contagem dos blastômeros corados com Hoechst (em azul), enquanto que a avaliação de ROS foi realizada através de mensuração da intensidade de fluorescência verde (CellROX Green) através do programa *ImageJ*. Para o cálculo da intensidade de fluorescência, foi utilizada a equação do programa de Real-Time.

5.5 Avaliação do índice apoptótico e do NTC às 72h de CIV

Às 72h de CIV, oito embriões do ensaio 1 (4 por grupo avaliado) que permaneceram na placa de CIV e que alcançaram a reexpansão da blastocele, mostrando portanto sinais de viabilidade, foram avaliados quanto ao NTC por coloração com Hoechst 33342, e número de células apoptóticas através do protocolo de coloração por imunofluorescência com caspase-3. A contagem de células foi realizada manualmente, e o cálculo do índice apoptótico foi realizado através da equação $(n \text{ células apoptóticas} \times 100) / \text{NTC}$. Para isso, os embriões foram fixados em PFA 4% às 72h de CIV e armazenados a 10°C até a realização dos protocolos de coloração. Os embriões passaram por permeabilização de membrana plasmática com 0,5% Triton em PBS por 30 min em placa de 4 poços, seguido por três lavagens de 10 min cada em solução 0,2% Tween em PBS. Foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos durante por 1h em solução 3% BSA em PBS e incubação *overnight* (12h) com anticorpo primário anti-caspase 3 (rabbit) (Sigma C8487, 1:20 em PBS) em geladeira. Na manhã seguinte, os embriões passaram por 3 lavagens (10 min/cada) em solução 0,2% Tween em PBS, seguidas de novo bloqueio de sítios inespecíficos

por 1h. Foi realizada então incubação com anticorpo secundário Alexa Fluor 555 (goat anti-rabbit IgG; 1:400 em PBS) (Molecular Probes, Eugene. OR, USA) em PBS por 2h em ambiente protegido de luz. Após esse período, os embriões passaram por mais três lavagens, protegidos de luz, em solução 0,2% Tween em PBS por 10 min cada. Na última lavagem, foi adicionado Hoechst 33342 (1:50) à solução de lavagem. Foi observada a eficiência das colorações em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TS100, na própria placa de 4 poços. Os embriões foram montados em lâmina e cobertos por lamínula, e as imagens foram capturadas por câmera digital DCM510 (Alltion, Guangxi, China) acoplada ao mesmo microscópio. Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram de 350/461 para Hoechst e de 555/565 para o anticorpo secundário.

5.6 Análise da expressão de genes associados ao metabolismo mitocondrial

A extração do RNA total foi realizada em 3 pools de 5 embriões/grupo para os grupos do ensaio 1 e CF e 1 pool de 5 embriões/grupo para o ensaio 2, utilizando RNeasy Micro kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, e tratado com DNase. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit *Superscript III First-strand supermix* (Invitrogen, Carlsband, CA, USA) e um primer hexâmero aleatório, de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do cDNA de cada pool por grupo foi realizada utilizando 1µL da amostra e espectrofotômetro ND-100 (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA), e a qualidade estimada numa razão 260/280. As amostras contiveram entre 5-10 ng/mL de cDNA. A quantificação relativa foi realizada em triplicata utilizando a técnica de PCR em tempo real (ABI Prism1 7300, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e as reações utilizando o mix *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystem), 400 ng de cDNA, água livre de nuclease e os primers específicos para cada reação. As reações de PCR consistiram das seguintes etapas: desnaturação do cDNA a 95°C por 10 minutos; seguida por 45 ciclos de: 95°C por 15 seg para abertura da fita, temperatura de anelamento de cada primer específico por 30 seg e síntese da nova fita a 60°C por 30 seg. Como controles negativos foram preparadas reações em que o cDNA foi omitido durante a reação de amplificação. Após cada corrida de PCR, uma análise da curva de *Melting* foi realizada para confirmar a geração de um único produto específico. As sequências dos primers utilizados e o tamanho dos fragmentos amplificados para todos os transcritos estão demonstrados no Tabela 2. A eficiência

dos primers para cada reação foi determinada pelo software *LinRegPCR*[®], considerada no cálculo da quantificação relativa, e foram: 1,95 (*CPT1*); 1,97 (*CPT2*); 2,00 (*PRDX1*); 1,98 (*CrAT*); e 1,95 (*ACTB*). O coeficiente de variação do gene endógeno (*housekeeping*) foi de 1,7%. A análise dos resultados do PCR quantitativo foi realizada utilizando o software *REST*[®], sendo os resultados expressos relativos a um calibrador. Para avaliação da expressão foi utilizado como calibrador embriões frescos no estágio de blastocisto. Deste modo, os dados obtidos foram expressos como N vezes relativas ao tratamento calibrador.

Tabela 2 – Sequência de *primers* específicos utilizados na análise da expressão gênica de embriões ovinos submetidos à suplementação com L-carnitina na solução de vitrificação ou reaquecimento

Produto	Sequência 5'-3' do primer	Temperatura de ligação	Tamanho do produto	Nº acesso GenBank/Referência
<i>CPT1</i>	F CGACTGGTGGGAGGAATACA	60°C	155 pb	Sharma <i>et al.</i> (2012)
	R TCGCTCTGTAAAGCAGGATG			
<i>CPT2</i>	F TTGTGCCTTCCTTCCTGTCT	60°C	149 pb	Sharma <i>et al.</i> (2012)
	R GAGGTGTCTGGCCTTGTC			
<i>CrAT</i>	F GTTCAGCAGGACCAAGAAGC	60°C	150 pb	Sharma <i>et al.</i> (2012)
	R TGCAGTGACGAGTTCCAGAC			
<i>PRDX1</i>	F CAAAGCAACAGCTGTTATGC	60°C	197 pb	Sengodan <i>et al.</i> (2014)
	R GAGAATCCACAGAAGCACC			
<i>ACTB</i>	F GGAAATCGTGCGTGACATTAAG	60°C	273 pb	NM 001101.3
	R TGTGTTGGCGTAAGGTCTTTG			

Abreviaturas: *CPT1*: carnitine palmitoyltransferase 1; *CPT2*: carnitine palmitoyltransferase 2; *PRDX1*: peroxiredoxin 1; *CrAT*: carnitine O-acetyltransferase; *ACTB*: Homo sapiens actin beta.

5.7 Análise estatística

As médias das taxas de reexpansão de blastocle e eclosão foram comparadas pelo teste de Qui-Quadrado. As médias de número total de células, células apoptóticas, índice apoptótico e intensidade de fluorescência foram comparadas pelo teste *t* de Student. As análises estatísticas foram realizadas

utilizando software *GraphPad Prisma 5.6*, sendo considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Ensaio 1

6.1.1 Taxas de sobrevivência após reaquecimento

Foram vitrificados 154 embriões, sendo 73 embriões no grupo C1 e 81 embriões em LC1. Os resultados da análise de sobrevivência, avaliados através das taxas de reexpansão de blastocle e eclosão dos grupos C1 e LC1 encontram-se apresentados na Tabela 3. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) nas taxas de reexpansão de blastocle entre o grupo LC1 e o grupo C1. Resultado similar ($p > 0,05$) também foi observado para as taxas de eclosão.

Dos 154 embriões vitrificados, houve recuperação de 106 embriões no reaquecimento (68,83%) devido à ruptura de algumas palhetas durante a imersão em N_2 líquido na primeira sessão de vitrificação. Em três sessões foram reaquecidos e cultivados *in vitro* 43 embriões em C1 e 63 embriões em LC1. Uma contaminação em placa de CIV durante a segunda sessão resultou na perda de 10 embriões em C1 e 21 em LC1, com isso, para o cálculo das taxas de sobrevivência de LC1 foram considerados os dados da primeira sessão, sendo os embriões da última sessão destinados à análise de ROS.

Tabela 3 – Capacidade de desenvolvimento após a vitrificação (indicadas através de taxas de reexpansão de blastocle e de eclosão) de embriões ovinos vitrificados na presença de L-carnitina

Grupos	n	Taxa de reexpansão de blastocle			Taxa de eclosão*
		24h	48h	72h	
		% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
C1	41	41,46 (17/41)	53,12 (17/32)	68,75 (22/32)	9,37 (3/32)
LC1	40	50,00 (20/40)	68,18 (15/22)	81,81 (18/22)	13,64 (3/22)

Legenda: C1 (Controle 1); LC1 (grupo L-carnitina 1)

*Avaliação realizada às 72h de CIV.

6.1.2 Níveis de ROS intracelular e NTC às 24h de CIV; número de células apoptóticas, índice apoptótico e NTC às 72h

A representação dos embriões em estágio de blastocisto dos grupos C1 e LC1 corados com Hoechst e CellROX Green são apresentados na Figura 4. Blastocistos vitrificados na presença de L-carnitina apresentaram níveis intracelulares de ROS similar ($p = 0,0991$) aos blastocistos vitrificados sem suplementação ($890,04 \pm 844,94$ vs. $858,29 \pm 683,76$ unidades arbitrárias de fluorescência; Figura 3).

Na avaliação do NTC no momento 24h de CIV, realizada através da contagem manual dos blastômeros corados em azul (Figura 4), as médias para C1 e LC1 foram, respectivamente, 89 ± 22 e $82,2 \pm 28$ células, sem diferença entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 6A).

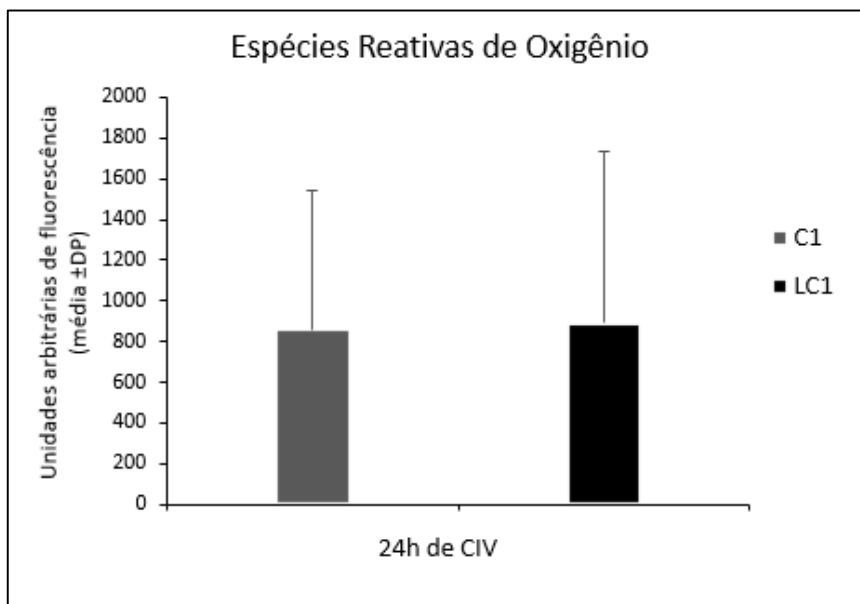


Figura 3 – Níveis de ROS intracelulares (em unidades arbitrárias) em embriões dos grupos C1 e LC1, avaliados por intensidade de fluorescência emitida após coloração *in vivo* com CellROX Green às 24h de CIV após reaquecimento ($p > 0,05$)

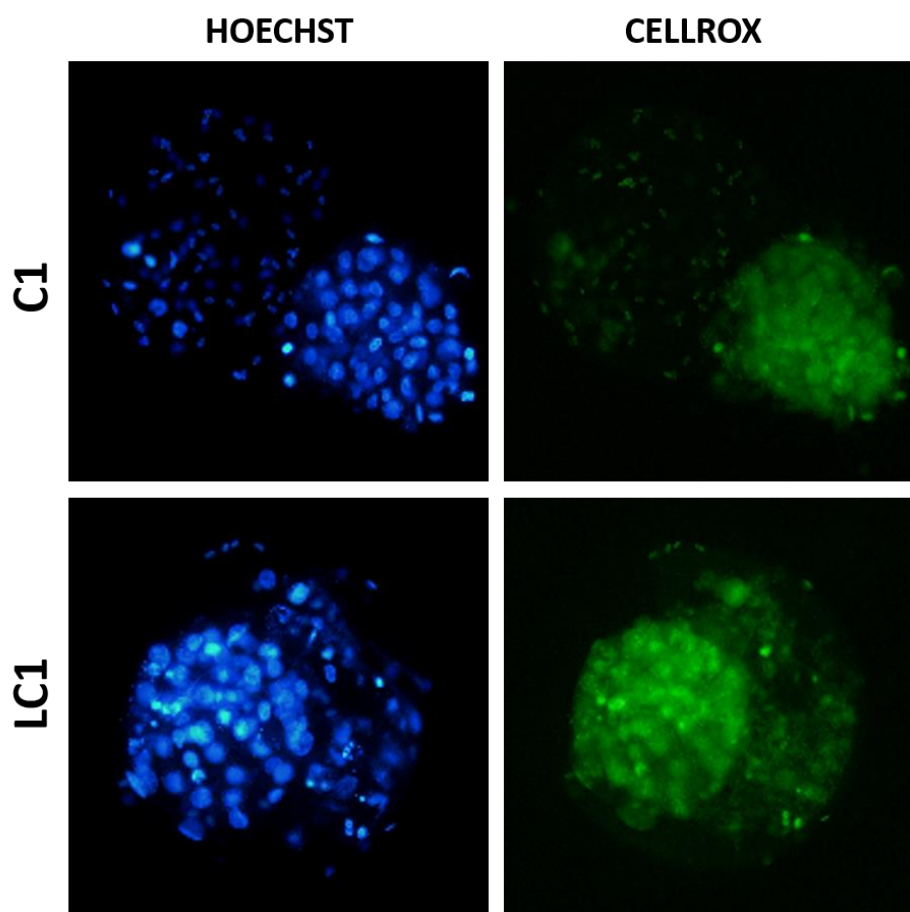


Figura 4 – Imagens representativas dos embriões do grupo C1 (vitrificação sem suplementação) e LC1 (vitrificação suplementada com 3,72 mM de LC) após protocolo de coloração para avaliação do número total de células (em azul) e de ROS (em verde) às 24h de CIV após reaquecimento.

As imagens representativas do NTC e células apoptóticas às 72h após reaquecimento dos embriões dos grupos C1 e LC1 estão representadas na Figura 5. Na avaliação dos embriões fixados às 72h de CIV, não foi observada diferença ($p > 0,05$) no NTC entre C1 ($86 \pm 19,9$) e LC1 ($68 \pm 25,2$) ($p > 0,05$) (Figura 6A). O número de células apoptóticas e índice apoptótico foram $3,75 \pm 1,48$ e $4,37\%$ para C1 e $4,50 \pm 4,72$ e $5,23\%$ para LC1, números que não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os grupos avaliados (Figura 6B).

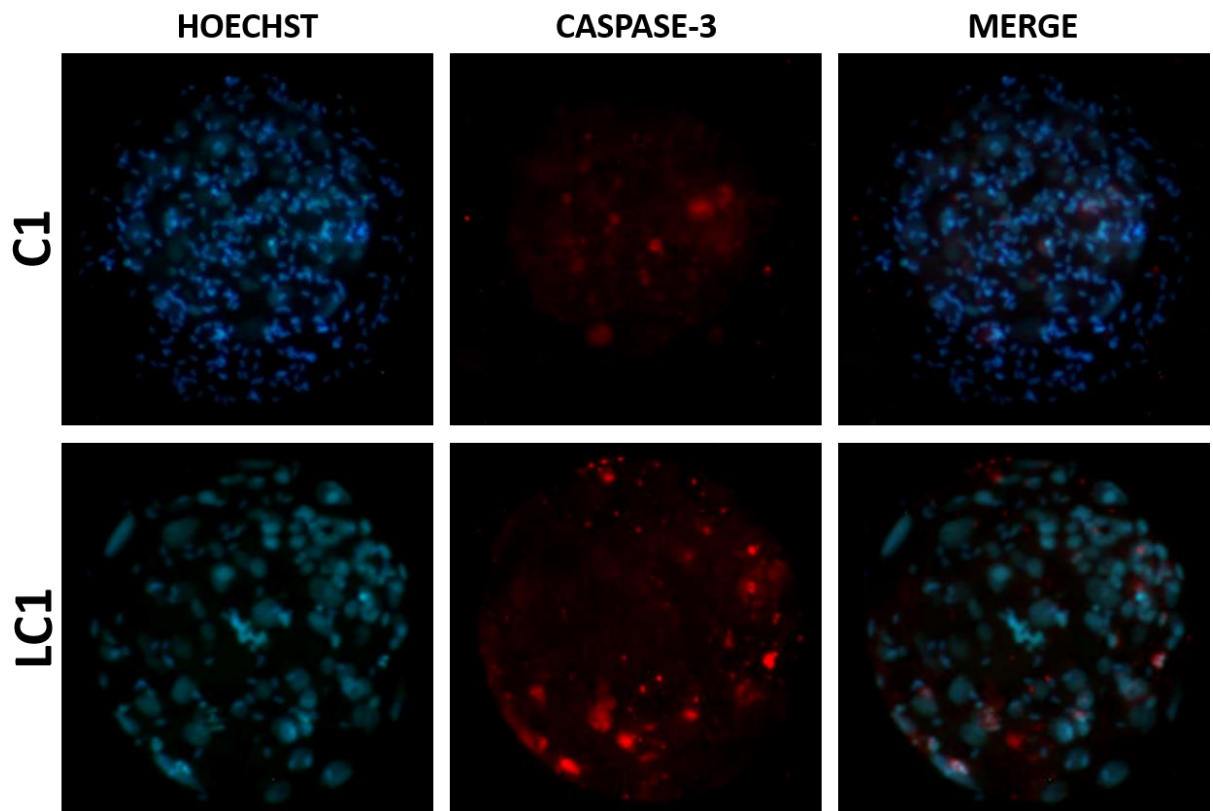


Figura 5 – Imagens representativas dos embriões do grupo C1 (vitrificação sem suplementação) e LC1 (vitrificação suplementada com 3,72 mM de LC) após protocolo de coloração para avaliação do número total de células (em azul) e de células apoptóticas (em vermelho), com sobreposição de imagens (merge) às 72h de CIV após reaquecimento.

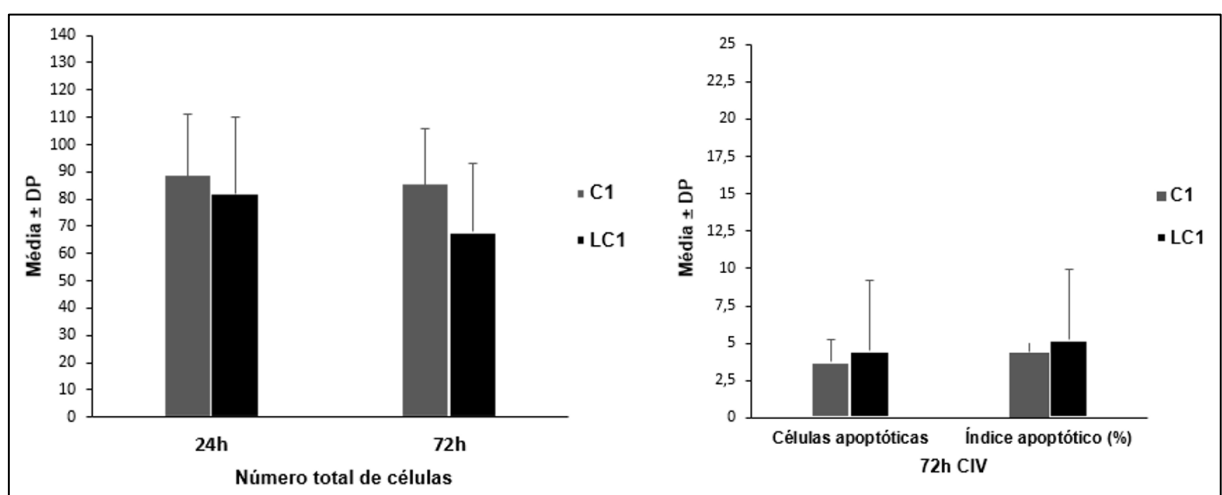


Figura 6 – (A) Número total de células (NTC; n) às 24 e 72h de CIV; (B) número de células apoptóticas (n) e índice apoptótico (%) em embriões dos grupos C1 (Controle 1) e LC1 (L-carnitina 1), avaliados através de protocolo com Hoechst 33342 e pela técnica de imunofluorescência com caspase-3 ($p > 0,05$)

6.1.3 Expressão de genes associados ao metabolismo mitocondrial e stress oxidativo

O resultado da expressão dos genes relacionados ao metabolismo mitocondrial (*CPT1*, *CPT2* e *CrAT*) e estresse oxidativo (*PRDX1*) dos embriões vitrificados (grupos C1 e LC1) foram comparados com embriões frescos (CF; Figura 7). As abundâncias relativas de transcritos de *CPT1* e *CPT2* não apresentaram diferença entre embriões dos grupos C1 e LC1 e embriões frescos. Entretanto, a expressão de *CrAT* foi *down*-regulada ($p < 0,05$) nos embriões do grupo C1, enquanto que não houve diferença ($p > 0,05$) na expressão relativa desse gene entre embriões LC1 e CF. A expressão de *PRDX1* foi *down*-regulada ($p < 0,05$) nos embriões vitrificados (grupos C1 e LC1) em comparação aos embriões frescos (Figura 7).

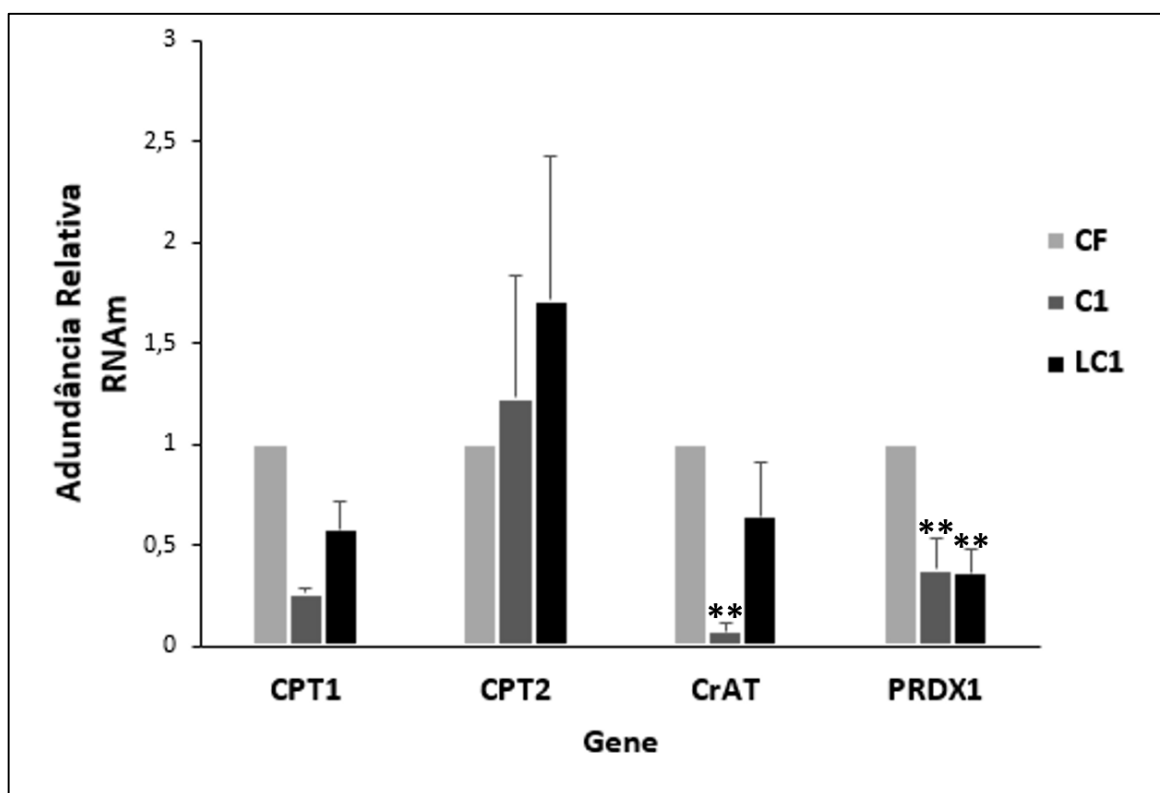


Figura 7 – Expressão relativa dos genes *carnitine palmytoil transferase 1* (*CPT1*), *carnitine palmytoil transferase 2* (*CPT2*), *carnitine O-acetyltransferase* (*CrAT*) e *peroxiredoxin 1* (*PRDX1*) em embriões ovinos vitrificados (C1 e LC1) às 24h de CIV após reaquecimento. CF: embriões frescos. (*) *up*-regulado; (**) *down*-regulado ($p < 0,05$).

6.2 Ensaio 2

6.2.1 Taxas de sobrevivência após reaquecimento

Os resultados de sobrevivência do ensaio 2, avaliados através das taxas de reexpansão de blastocle e eclosão, encontram-se apresentados na Tabela 4. Apesar do aumento de 13,90, 13,73 e 16,22%, na taxa de reexpansão de blastocle promovido pela suplementação de L-carnitina na solução de reaquecimento às 24, 48 e 72h, respectivamente, não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre o grupo LC2 e o grupo C2. Resultado similar ($p > 0,05$), também foi observado para as taxas de eclosão. Neste parâmetro, embora tenha sido observado um aumento de 11,59% às 72h no grupo LC2 em comparação ao grupo C2, não houve diferença entre os grupos avaliados ($p > 0,05$).

Tabela 4 – Capacidade de desenvolvimento e sobrevivência após vitrificação (indicadas através de taxas de reexpansão de blastocle e de eclosão) de embriões ovinos submetidos à suplementação com L-carnitina nas soluções de reaquecimento

Grupos	n	Taxa de reexpansão de blastocle			Taxa de eclosão*
		24h	48h	72h	
		% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
C2	33	27,27 (9/33)	33,33 (11/33)	48,48 (16/33)	6,06 (2/33)
LC2	34	41,17 (14/34)	47,06 (16/34)	64,70 (22/34)	17,65 (6/34)

Legenda: C2 (Controle 2); LC2 (grupo L-carnitina 2)

*Avaliação realizada às 72h de CIV

6.2.2 Expressão de genes associados ao metabolismo mitocondrial

De forma semelhante ao ensaio 1, neste ensaio também foi avaliada a expressão dos genes relacionados ao metabolismo mitocondrial e estresse oxidativo. Os resultados da abundância relativa de RNAm de embriões vitrificados (grupos C2 e LC2) foram comparados com os de embriões frescos (CF) também produzidos *in vivo* (Figura 8). Similar ao ensaio 1, não foi observada diferença ($p > 0,05$) na abundância relativa de RNAm de *CPT1* e *CPT2* nos embriões vitrificados (C2 e LC2) em

comparação com embriões CF. Entretanto, a expressão de *CrAT* foi *up*-regulada ($p < 0,05$) no grupo C2 e *down*-regulada ($p < 0,05$) no grupo LC2 em comparação com o grupo CF. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) na expressão de *PRDX1* entre os embriões LC2 e CF, entretanto, a abundância desses transcritos foi *up*-regulada no grupo C2 em comparação à CF (Figura 8).

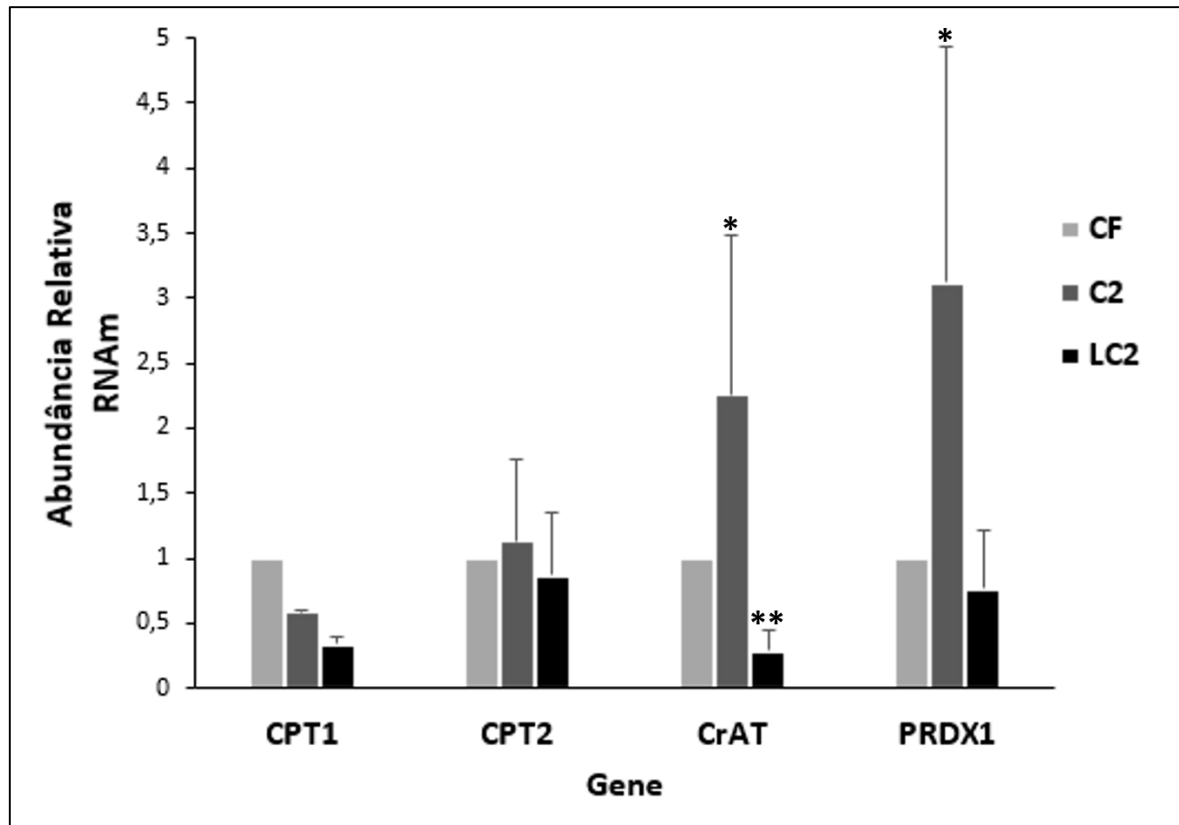


Figura 8 – Expressão relativa dos genes *carnitine palmytoil transferase 1* (*CPT1*), *carnitine palmytoil transferase 2* (*CPT2*), *carnitine-O-acetyltransferase* (*CrAT*) e *peroxiredoxin 1* (*PRDX1*) em embriões ovinos vitrificados (C2 e LC2) às 24h de CIV após reaquecimento. CF: embriões frescos. (*) *up*-regulado; (**) *down*-regulado ($p < 0,05$)

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito da suplementação de LC no protocolo de vitrificação para avaliar seus efeitos sobre o metabolismo, a qualidade e a sobrevivência após reaquecimento em embriões ovinos da raça Santa Inês produzidos *in vivo*. Os resultados de sobrevivência do ensaio 1 demonstraram que não houve diferença entre os grupos C1 e LC1, mesmo tendo sido observado um incremento de 10% nas taxas de reexpansão de blastocle e de 4,27% na taxa de eclosão no grupo suplementado com LC em relação ao grupo controle, resultado que justifica o emprego da LC em protocolos de vitrificação de embriões ovinos em função do custo/benefício e da facilidade prática de adoção dessa estratégia. O mesmo padrão de resultados observados no ensaio 1 se repetiu no ensaio 2. A suplementação com LC na solução de reaquecimento resultou em aumento de 14% nas taxas de reexpansão de blastocle e de 11% na taxa de eclosão no grupo LC2 quando comparado ao grupo controle. Apesar da ausência de diferença nesses resultados, esses dados também foram observados em um número restrito de embriões, e justificam o emprego da LC nesse tipo de protocolo ao se considerar esse incremento sob a perspectiva de utilização em um número elevado de embriões vitrificados.

Os protocolos de vitrificação e as estratégias de suplementação com LC foram diferentes entre os ensaios deste estudo. O protocolo segundo Guignot et al. (2006) utiliza palhetas de 0,25 mL como dispositivo, com duas colunas de solução de galactose separadas por colunas de ar daquela que contém os embriões em solução de vitrificação, em um método semifechado. Esse protocolo tem por objetivo possibilitar a transferência direta às receptoras, com taxas de prenhez semelhantes ao método convencional de transferência (Guignot et al., 2006), no qual os embriões passam por uma etapa de lavagem para retirada dos crioprotetores antes de serem transferidos às receptoras. Para contornar o problema do volume maior de solução no qual os embriões são vitrificados, existe a adição de sacarose na terceira solução de vitrificação, com o objetivo de aumentar a velocidade de desidratação das células e minimizar a absorção de crioprotetores pelas mesmas, diminuindo sua toxicidade (Kasai et al., 1990). A escolha de suplementar esse método de vitrificação teve por objetivo avaliar se a LC traria benefícios à sobrevivência dos embriões em protocolo que permite a transferência direta, facilitando o manejo e o emprego da biotécnica de vitrificação na rotina de campo. Diferenças são observadas entre esse tipo de

suplementação e os métodos mais usuais de utilização da LC. A maioria dos trabalhos que demonstram os benefícios da suplementação com LC, na mesma dosagem usada neste estudo, utilizam-na por longos períodos (Sutton-McDowell et al., 2012; Chankitisakul et al., 2013; Ghanem et al., 2014; Baldoceda et al., 2015; Calò et al., 2016), ao passo que no protocolo deste estudo, os embriões estiveram em contato efetivamente com a LC por aproximadamente 16 minutos. Dosagens maiores que 5 mM de LC por períodos maiores que 12h demonstram ter efeito deletério sobre as células (Wu; Zan, 2012; Li et al., 2012; Wang et al., 2016). O estudo de Moawad et al. (2014) utilizou a mesma dosagem de LC que a do presente estudo (3,72 mM) no protocolo de vitrificação de oócitos murinos em estágio de vesícula germinativa, entretanto com o emprego da mesma dosagem na MIV após o reaquecimento, resultando em maior taxa de oócitos com fuso mitótico normal e com maior atividade mitocondrial. No presente estudo, diferentemente de estudos prévios que utilizam a LC em cultivo por períodos mais longos, foi observado que a suplementação com 3,72 mM de LC durante aproximadamente 15 min foi suficiente para gerar um incremento em torno de 10% na taxa de sobrevivência de embriões após o reaquecimento, apesar da ausência de diferença significativa. Tal efeito pôde ser comprovado pelos resultados da análise de expressão gênica, discutidos mais à frente. Talvez os resultados da suplementação de LC deste estudo, realizado com embriões ovinos produzidos *in vivo*, possam ser mais pronunciados em embriões produzidos *in vitro*, os quais possuem maior conteúdo lipídico e uma maior utilização desses componentes em seu metabolismo pré-implantacional (Sutton-McDowall et al., 2012).

O protocolo de vitrificação utilizado no ensaio 2 (Gibbons et al., 2011) é baseado no método *minimum drop size*, onde os embriões são aspirados em volume mínimo de 1 µL. Esse método permite reduzir a quantidade de crioprotetores na solução de vitrificação, minimizando injúrias tóxico-osmóticas e permitindo uma velocidade de resfriamento ultrarrápida (Vajta et al., 1998; Kasai; Mukaida, 2004). Esse tipo de protocolo necessita a etapa convencional de retirada de crioprotetores em solução de reaquecimento, para então ocorrer o envase dos embriões para transferência. Dessa forma, a estratégia escolhida neste estudo foi suplementar com 3,72 mM de LC as soluções de reaquecimento, com objetivo de eliminar a necessidade do período de cultivo *in vitro* com suplementação, permitindo a transferência dos embriões assim que reaquecidos. Da mesma forma que no ensaio 1, apesar da ausência de diferença nos resultados de sobrevivência entre os grupos

avaliados, estima-se que o tempo de 15 min em que os embriões estiveram em contato com a LC durante o reaquecimento tenha sido suficiente para exercer um efeito benéfico sobre os embriões suplementados, através da observação de um incremento em torno de 15% nas taxas de sobrevivência e pelos resultados de expressão gênica nesse grupo de embriões, discutidos mais à frente. Quando se considera os custos relacionados ao emprego de protocolos de MOET, os incrementos nas taxas de sobrevivência de embriões vitrificados que foram observados em ambos ensaios desse estudo justificam essas estratégias de suplementação, por serem protocolos de fácil adoção e com baixa relação custo/benefício, considerando-se que um frasco com 5 g de LC custa R\$444,00 e que em cada sessão de reaquecimento se utiliza 0,6 mg/mL nas soluções de vitrificação ou reaquecimento.

Em relação às taxas de eclosão dos ensaios 1 e 2, cabe ressaltar que às 24h de CIV em ambos ensaios foram retirados do cultivo parte dos embriões que já haviam atingido a reexpansão de blastocle para análise de expressão gênica, além dos embriões retirados para análise de ROS e NTC no ensaio 1. Estudos demonstram que a maior parte dos embriões que sobrevivem ao processo de vitrificação, reexpandem a blastocle dentro de 24h após o reaquecimento (Leoni et al., 2008; Ha et al., 2014; Caamaño et al., 2015). Provavelmente os embriões retirados para análises às 24h, caso permanecessem na placa de CIV, teriam eclodido até as 72h de cultivo, observações que aumentariam essas taxas em ambos os ensaios deste estudo.

A suplementação com LC na dosagem de 3,72 mM durante o protocolo de vitrificação não resultou em diminuição dos níveis de ROS em embriões ovinos às 24h após o reaquecimento, tampouco no número de células apoptóticas e índice apoptótico às 72h de CIV. Um aspecto da ação antioxidante da LC é que sua suplementação induz um aumento na expressão de enzimas antioxidantes, tal como CAT, SOD e GPx (Wu; Zan, 2012; Li et al., 2012; Roy; Virma; Krishna, 2016; Wang et al., 2016). O efeito antiapoptótico da LC parece acontecer de maneira dose-tempo dependente (Bavari et al., 2016; Conlon et al., 2016). Doses menores de LC (1 mM) em períodos maiores do que o utilizado nesse experimento não resultaram em diferença significativa de ROS em cultivo de células, enquanto que períodos de cultivo de 18 a 24h com até 5 mM de LC aumentam a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e CAT, resultando em menores níveis de ROS, de fragmentação de DNA e morte celular (Bavari et al., 2016). Em embriões murinos em estágio de 8 células

descongelados, foi observada redução nos níveis de apoptose e aumento nas taxas de sobrevivência após tratamento por 4h com 0,3 mg/mL de LC, metade da dosagem utilizada no presente estudo, ao passo que nessa espécie a dosagem de 3,72 mM ou 0,6mg/mL resultou em um incremento menos expressivo nos mesmos parâmetros observados (Abdelrazik et al., 2009). Levando em consideração que os embriões do presente estudo estiveram em contato com a LC (3,72 mM) por volta de 15-16 min, e que trabalhos que obtiveram resultados significativos utilizaram essa dosagem por períodos longos, é compreensível sugerir que a dosagem de 3,72 mM no nosso tipo de protocolo tenha sido insuficiente para se observar diferenças nos níveis de ROS e no índice apoptótico. Em experimento com embriões suínos clones, o tratamento com LC durante uma MIV prolongada produziu um aumento na síntese de GSH intraoocitária, que resultou em diminuição nos níveis de ROS e incrementou a competência ao desenvolvimento desses oócitos, traduzida pela expressão de genes relacionados à reprogramação nuclear (You et al., 2012). Os efeitos benéficos dos antioxidantes são melhor observados em condições de cultivo com alto O₂, como ocorre nos sistemas de produção *in vitro* (Choe et al., 2010; Dovolou et al., 2011). Nos ensaios deste trabalho foi utilizado CIV em atmosfera com 5% O₂, com o intuito de mimetizar as condições atmosféricas uterinas (Fischer; Bavister, 1993) no caso de transferência direta para receptoras, o que pode ter minimizado os efeitos da LC nos níveis de ROS, avaliados pelo protocolo com CellROX Green.

A avaliação de apoptose no ensaio 1 foi realizada através do protocolo de imunofluorescência com caspase-3, nos embriões fixados às 72h de CIV. Caspase-3 é uma das mais importantes enzimas membro da família de proteases cisteína aspartato-específicas chamada Caspase, importante na sinalização apoptótica intracelular que ocorre em resposta ao estresse oxidativo (Friendlander, 2003; Ott et al., 2007). Fragmentação do DNA é a principal consequência da ativação da caspase-3 pelos altos níveis de ROS (Friendlander, 2003). Baseado nisso, é compreensível observar que a mesma ausência de diferença nos níveis de ROS entre C1 e LC1 às 24h de CIV também ocorreu no índice apoptótico de embriões desses mesmos grupos às 72h. Também não foi observada diferença no NTC às 24h e às 72h de CIV entre embriões vitrificados com ou sem suplementação de LC na solução de vitrificação, ao passo que é observada uma tendência de diminuição do número de células entre os momentos observados. Cabe lembrar que as observações não foram feitas nos mesmos embriões entre os momentos de observação, e que às 24h os blastocistos

utilizados para a análise eram os mais precoces na reexpansão de blastocelo, e, portanto, os de melhor qualidade (dos Santos Neto et al., 2015). Apesar da suplementação com LC, estudos avaliando NTC em embriões submetidos a diferentes protocolos de vitrificação, ou comparando-os com embriões frescos ou congelados pelo método lento de congelamento não têm observado diferença no número de blastômeros totais entre os embriões analisados (Stinshoff et al., 2011; dos Santos Neto et al., 2015).

Apesar da ausência de diferença observada nos níveis intracelulares de ROS, no índice apoptótico e no NTC nos embriões analisados, os resultados de expressão gênica apresentaram diferenças entre os grupos avaliados, onde podem ser observados dois padrões de resposta diferentes nos ensaios 1 e 2. A abundância relativa de transcritos *CPT1* e *CPT2* não diferiu entre CF, LC1 e C1, e entre CF, LC2 e C2. Ao longo de seu desenvolvimento inicial, embriões derivam sua energia através da fosforilação oxidativa do piruvato, lactato e aminoácidos, contudo, ocorre um aumento da contribuição da via glicolítica na produção de ATP a partir da fase de compactação (Houghton et al., 1996; Thompson, 2000). Acreditamos que a ausência de diferença na expressão de *CPT1* e *CPT2*, observada nesse experimento, se deva ao fato de que a β -oxidação em mórulas e blastocistos ovinos produzidos *in vivo*, os quais naturalmente possuem menor conteúdo lipídico (Dattena et al., 1999), não seja uma via majoritária de produção de energia durante as primeiras 24h após o reaquecimento.

CrAT e *PRDX1* se mostraram diferencialmente expressos em ambos ensaios, porém de formas distintas entre eles. No ensaio 1, os embriões que foram vitrificados com suplementação de 3,72 mM de LC apresentaram menores abundâncias relativas de RNAm *CrAT* e *PRDX1* em relação aos embriões frescos, e embriões C1 tiveram uma menor expressão de *CrAT* e *PRDX1* comparados à CF. No ensaio 2, os embriões do grupo LC2 apresentaram menor abundância relativa de transcritos *CrAT* em relação a CF, ao passo que os embriões C2 apresentaram expressões *up-reguladas* de *CrAT* e *PRDX1* quando comparados aos embriões frescos. *CrAT* é uma enzima essencial para a homeostase mitocondrial, regulando os *pools* de acil-CoA e CoA, cujos desequilíbrios resultam no bloqueio da via energética e comprometimento do metabolismo oxidativo e da produção de ATP para a célula (Pande; Blanchaer, 1971; Ramsay; Zammit, 2004). Alterações na expressão de *CrAT* e uma alta razão acil-carnitina/carnitina livre são associadas com disfunção da atividade mitocondrial

(Sharma et al., 2008). Níveis baixos de LC acarretam no aumento dos níveis de acil-CoA e na redução das concentrações de CoA livre dentro da mitocôndria, prejudicando a ação de desidrogenases e consequentemente o metabolismo mitocondrial de carboidratos e aminoácidos (Marcovina et al., 2013). No presente estudo, a menor abundância relativa de transcritos *CrAT* no grupo LC1 pode ser interpretada como um equilíbrio dessas células em produzir e modular os *pools* de acil-CoA/CoA, os quais não exigiram um aumento de expressão desse gene para regular a homeostase celular frente ao processo de vitrificação. Um aumento da expressão de *CrAT* foi observada em embriões de aves após o tratamento com ácido perfluorooctanóico, ao passo que a administração de LC retornou a expressão de *CrAT* aos níveis normais (Jiang et al., 2016). O aumento da expressão de *CrAT* observado no grupo C2 pode ser interpretado sob a mesma ótica, ou seja, a necessidade de contrabalancear um desequilíbrio na razão acil-CoA/CoA frente a um fator estressante, no caso o da vitrificação. Ainda que diversos estudos correlacionem a baixa expressão de membros da via carnitina mitocondrial a patologias de ordem metabólica (Sharma et al., 2008; Sharma et al., 2013; Kim et al., 2016), corroboramos os resultados deste estudo com a hipótese do “embrião silencioso”, revisada por Leese (2002), a qual é baseada na premissa de que as células trabalham minimizando o custo metabólico. Sob essa ótica, embriões com viabilidade comprometida possuem menor tolerância a condições de estresse oxidativo e precisam recorrer a mecanismos de manutenção da homeostase, com consumo de energia. Nesse caso, embriões com maior viabilidade apresentariam, sob condições estressantes, menores alterações metabólicas, baixo turnover de aminoácidos e alto nível de enzimas antioxidantes (Leese, 2002), estas últimas as quais não mensuramos nesse experimento, mas que podemos hipotetizar através dos resultados de expressão de *PRDX1*.

Foi observada uma menor expressão relativa de *PRDX1* em LC1 *versus* CF, e em LC2 *versus* C2. LC atua através do aumento da expressão e da atividade de enzimas e marcadores antioxidantes, como GPx, SOD e CAT, sendo a diminuição nos níveis intracelulares de ROS e de apoptose celular um efeito observado (Calò et al., 2006; Kunak et al., 2016; Mishra et al., 2016). A atuação de *PRDX1* se dá como ‘scavenger’ de ROS quando do aumento dessas espécies reativas, contribuindo para a diminuição das mesmas e modulando vias de sobrevivência e morte celular (Kim et al., 2008; Gertz et al., 2009). Células constantemente sujeitas a estresse oxidativo, como células cancerígenas ou em apoptose, possuem elevada expressão de

membros da família PRDX, como resposta aos níveis aumentados de ROS (Deng et al., 2005; Kwon et al., 2015); assim como embriões ovinos produzidos *in vitro* cultivados em 20% CO₂ possuem uma alta abundância relativa de RNAm *PRDX1* em todos os estágios de desenvolvimento (Sengodan et al., 2014). Sob estresse oxidativo e na inativação de CAT, PRDX2 (outra enzima da família PRDXs) encontra-se na forma oxidada (em forma de dímero), ligada à membrana de eritrócitos e com menor concentração da sua forma ativa e monomérica no citoplasma, sendo essa concentração insuficiente para prevenir os danos causados por ROS na célula (Rocha et al., 2015). Essa mesma enzima foi correlacionada como sendo uma importante mediadora em processos inflamatórios em resposta ao estresse oxidativo, induzindo a produção e liberação de TNF- α por macrófagos (Salzano et al., 2014). Ainda, a hiperoxidação de membros da família PRDX, sob condições de estresse oxidativo, está associada com a inibição da via sinalizadora Akt (pró-sobrevivência celular) e com o estímulo da via de sinalização *p38 mitogen activated-protein kinase* (MAPK), relacionada à morte celular (Collins et al., 2016). Altas concentrações de ROS podem ainda ativar a atividade de chaperona em PRDX1, passando esta a atuar como oncogene, associando-se a fatores de transcrição como *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) e suprimindo vias de morte celular em células tumorais (Hansen et al., 2007), além de ser um intermediário essencial na via de apoptose celular induzida por H₂O₂ via ativação da via p53, que induz fatores de expressão apoptóticos como Bak e Bax, os quais por sua vez ativam o sistema de caspases (Morinaka et al., 2011). Nesse contexto, podemos interpretar que a menor expressão relativa de *PRDX1* nos grupos suplementados com LC apresenta-se como uma resposta ao aumento das defesas antioxidantes nesses embriões. Da mesma forma, a abundância de RNAm *PRDX1* foi *up*-regulada em C2 em relação aos embriões frescos, o que pode ser uma resposta de defesa celular a um menos pronunciado sistema antioxidante frente à produção de ROS causada pela técnica de vitrificação.

Os padrões de expressão de *PRDX1* e *CrAT* mostraram-se diferentes entre os ensaios 1 e 2. Talvez essa diferença possa ser explicada pelas formas de suplementação diferentes em ambos ensaios. A estratégia de suplementação com LC no ensaio 1 ocorreu durante o protocolo de vitrificação, ou seja, na etapa em que os embriões eram submetidos ao tratamento com crioprotetores, visando sua absorção e a desidratação da célula para que ocorresse a vitrificação (Vajta et al., 1998). No ensaio 2, a suplementação com LC foi realizada no reaquecimento, no qual os

embriões são submetidos a sucessivas etapas em soluções com concentrações decrescentes de crioprotetores, que permitem via osmose a remoção dos crioprotetores e absorção de água pela célula (Gibbons et al., 2011). Talvez uma possível diferença na taxa de absorção da LC durante o curto período de vitrificação ou o reaquecimento seja a responsável por esse padrão diferenciado na expressão dos genes *CrAT* e *PRDX1* nos embriões às 24h de CIV após reaquecimento. Em estudo onde voluntários receberam dosagem oral de 2,0 g de LC, foi observada uma constante de taxa de absorção de $0,8 \text{ g} \pm 0,9 \text{ g/h}$ (Cao et al., 2009), entretanto, dados esses que não podem ser extrapolados para as condições do presente estudo, devido à diferente natureza de suplementação (oral versus na solução de vitrificação). Já foi comprovado o transporte de LC dependente de Na^+ em células intestinais (García-Miranda et al., 2005), e Wu et al. (1999) demonstraram o envolvimento do transportador OCTN2 no transporte Na^+ -dependente de LC em células renais, cardíacas, em placenta, e em córtex, hipocampo e em cerebelo de ratos. Contudo, mais estudos são necessários para testar diferentes dosagens de LC em função do tempo de cultivo celular, com o objetivo de se adequar a dosagem mais eficiente em protocolos de tratamento curto com LC, como foi utilizado no presente trabalho.

8. CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos demonstraram que, na dosagem de 3,72 mM durante um curto protocolo, a LC foi eficiente em promover uma resposta em nível de expressão de genes relacionados à homeostase energética e à defesa celular antioxidante, porém tais resultados não foram visíveis com relação aos parâmetros de qualidade embrionária aqui avaliados. Embora não tenha sido observada diferença quanto às taxas de sobrevivência embrionária após reaquecimento, o curto tratamento com LC foi capaz de promover, em nível molecular, incrementos na qualidade dos embriões vitrificados ou reaquecidos com L-carnitina. Concluimos que mais estudos são necessários com o objetivo de se adequar uma dosagem ideal em função do curto tempo de suplementação de LC, afim de potencializar seus efeitos benéficos resultando em incrementos na qualidade e sobrevivência dessa categoria de embriões, com consequente aumento nas taxas de produção de cordeiros de alto valor genético.

Indicação bibliográfica

ABDELRAZIK, H. et al. L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocysts development rate in mouse embryos. *Fertility and Sterility*, v. 91, n. 2, p. 589-596, 2009. Disponível em: <10.1016/j.fertnstert.2007.11.067> Acesso em: 21 out. 2016

ABSALÓN-MEDINA, V. A.; BUTLER, W. R.; GILBERT, R. O. Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 31, n. 4, p. 393-409, 2014. Disponível em: <10.1007/s10815-014-0179-2> Acesso em: 27 ago. 2016.

ACCORSI, M. F. et al. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured in vitro with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance. *Zygote*, v. 24, n. 4, p. 485-494, 2016. Disponível em: <10.1017/S0967199415000428> Acesso em: 18 set. 2016.

AKSU, D. A. et al. Gene expression profiles of vitrified in vitro- and in vivo-derived bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, v. 79, n. 9, p. 613-625, 2012. Disponível em: <10.1002/mrd.22068> Acesso em: 22 ago. 2016.

ALBUZ, F. K. et al. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryos yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction*, v. 25, n. 12, p. 2999-3011, 2010. Disponível em: <10.1093/humrep/deq246> Acesso em: 22 nov. 2016.

AN, L. et al. Efficient cryopreservation of mouse embryos by modified droplets vitrification (MDV). *Cryobiology*, v. 71, n. 1, p. 70-76, 2015. Disponível em: <10.1016/j.cryobiol.2015.05.067> Acesso em: 15 set. 2016.

ANDRIOLI, A. et al. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 3, p. 136-143, 1999. Disponível em: <10.1590/S1413-95961999000300006> Acesso em: 10 out. 2016.

ARAÚJO-LEMO, P. F. B. et al. Comparison of different cryoprotectant regimes for vitrification of ovine embryos produced *in vivo*. *Small Ruminant Research*, v. 119, n. 1-3, p. 100-106, 2014. Disponível em: <10.1016/j.smallrumres.2014.02.013> Acesso em: 18 ago. 2016.

ARGAWAL, A.; ALLAMANENI, S. S. R. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 9, n. 3, p. 338-347, 2004. Disponível em: <10.1016/S1472-6483(10)62151-7> Acesso em: 22 set. 2016.

BAGHAEI, A. et al. Molecular and biochemical evidence on the protection of cardiomyocytes from phosphine-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis by acetyl-L-carnitine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 42, p. 30-37, 2016. Disponível em: <10.1016/j.etap.2015.12.019> Acesso em: 15 set. 2016.

BALARO, M. F. A. et al. Potential role for GnRH in the synchronization of follicular emergence before the superovulatory Day 0 protocol. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 54, p. 10-14, 2016. Disponível em: <10.1016/j.domaniend.2015.07.002> Acesso em: 12 nov. 2016.

BALDOCEDA, L. et al. Genetic influence on the reduction in bovine embryo lipid content by L-carnitine. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 8, p. 1172-1184, 2015. Disponível em: <10.1071/RD14215> Acesso em: 22 set. 2016.

BARI, F. et al. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, v. 56, n. 1, p. 147-155, 2001. Disponível em: <10.1016/S0093-691X(01)00550-7> Acesso em: 22 set. 2016.

BARNETT, D. K.; BAVISTER, B. D. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular Reproduction and Development*, v. 43, n. 1, p. 105-133, 1996. Disponível em: < 10.1002/(SICI)1098-2795(199601)43:1<105::AID-MRD13>3.0.CO;2-4> Acesso em: 15 out. 2016.

BAVARI, M. et al. Neuroprotective, antiapoptotic and antioxidant effects of L-carnitine against caffeine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 39, n. 2, p. 157-166, 2016. Disponível em: <10.3109/01480545.2015.1063062> Acesso em: 15 out. 2016.

BETTENCOURT, E. M. V. et al. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology*, v. 71, n. 6, p. 947-958, 2009. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2008.10.019> Acesso em: 7 ago. 2016.

BIGGERS, J. D.; WHITTINGHAM, D. G.; DONAHUE, R. P. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 58, n. 2, p. 560-567, 1967. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC335672/> Acesso em: 20 out. 2016.

BINDON, B. M. et al. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, v. 25, n. 1, p. 53-70, 1986. Disponível em: <10.1016/0093-691X(86)90183-4> Acesso em: 16 out. 2016.

BREMER, J. Carnitine – metabolism and functions. *Physiological Reviews*, v. 63, n. 4, p. 1420-1480, 1983. Disponível em: <http://physrev.physiology.org/content/63/4/1420.long> Acesso em: 13 set. 2016.

CAAMAÑO, J. N. et al. Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*, v. 83, n. 5, p. 881-890, 2015. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2014.11.021> Acesso em: 7 ago. 2016.

CALDER, M. D.; WATSON, P. H.; WATSON, A. J. Culture medium, gas atmosphere and MAPK inhibition affect regulation of RNA-binding protein targets during mouse preimplantation development. *Reproduction*, v. 142, n. 5, p. 689-698, 2011. Disponível em: <10.1530/REP-11-0082> Acesso em: 18 out. 2016.

CALÒ, L. A. et al. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *International Journal of Cardiology*, v. 107, n. 1, p. 54-60, 2006. Disponível em: <10.1016/j.ijcard.2005.02.053> Acesso em: 20 out. 2016

CÁNEPA, M. J. et al. Expression profile of genes as indicators of developmental competence and quality of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *PLoS One*, v. 9, n. 9, e108139, 2014. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0108139> Acesso em 22 out. 2016.

CAO, Y. et al. Comparison of pharmacokinetics of L-carnitine, acetyl-L-carnitine and propionyl-L-carnitine after single oral administration of L-carnitine in healthy volunteers. *Clinical & Investigative Medicine*, v. 32, n. 1, p. 13-19, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19178874> Acesso em: 26 out. 2016.

CHAN, D. C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, v. 125, n. 7, p. 1241-1252, 2006. Disponível em: <10.1016/j.cell.2006.06.010> Acesso em: 20 out. 2016.

CHANKITISAKUL, V. et al. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology*, v. 79, n. 4, p. 590-598, 2013. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2012.11.011> Acesso em: 15 set. 2016.

CHOE, C. et al. Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during in vitro maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. *Journal of Reproduction and Development*, v. 56, n. 6, p. 575-582, 2010. Disponível em: <10.1262/jrd.09-214H> Acesso em: 12 out. 2016.

CLAIBORNE, A. et al. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry*, v. 38, n. 47, p. 15407-15416, 1999. Disponível em: <10.1021/bi992025k> Acesso em: 12 out. 2016.

COLLINS, J. A. et al. Oxidative stress promotes peroxiredoxin hyperoxidation and attenuates pro-survival signaling in aging chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 13, p. 6641-6654, 2016. Disponível em: <10.1074/jbc.M115.693523> Acesso em: 15 out. 2016.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E. Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, n. 1, p. 91-98, 2013. Disponível em: <10.1071/RD13259> Acesso em: 13 mar. 2016.

CONLON, T. M. et al. Metabolomics screening identifies reduced L-carnitine to be associated with progressive emphysema. *Clinical Science*, v. 130, n. 4, p. 273-287, 2016. Disponível em: <10.1042/CS20150438> Acesso em: 21 out. 2016.

DAVIES, M. N. et al. The acetyl group buffering action of carnitine acetyltransferase offsets macronutrient-induced lysine acetylation of mitochondrial proteins. *Cell Reports*, v. 14, n. 2, p. 243-254, 2016. Disponível em: <10.1016/j.celrep.2015.12.030> Acesso em: 12 set. 2016.

DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 3, p. 149-159, 2010. Disponível em: <www.cbra.org.br> Acesso em: 18 nov. 2015.

DALCIN, L. et al. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Criobiology*, v. 67, n. 2, p. 137-145, 2013. Disponível em: <10.1016/j.cryobiol.2013.05.012> Acesso em: 20 out. 2016.

DATTENA, M. et al. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, v. 56, n. 8, p. 1511-1519, 1999. Disponível em: <10.1016/S0093-691X(00)00293-4> Acesso em: 22 ago 2016.

DATTENA, M. et al. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology*, v. 62, n. 3-4, p. 481-493, 2004. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2003.10.010> Acesso em: 23 ago. 2016.

De ASSIS, P. M. et al. System for evaluation of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 31, n. 4, p. 577-580, 2016. Disponível em: <10.1016/j.rbmo.2015.06.014> Acesso em: 12 out. 2016.

De CESARO, M. P. et al. Natriuretic peptides stimulate oocyte meiotic resumption in bovine. *Animal Reproduction Science*, v. 159, p. 52-59, 2015. Disponível em: <10.1016/j.anireprosci.2015.05.012> Acesso em: 25 out. 2016.

De LA TORRE-SANCHEZ, J. F. et al. Metabolic regulation of *in-vitro*-produced bovine embryos. II. Effects of phenazine ethosulfate, sodium azide and 2,4-dinitrophenol during post-compaction development on glucose metabolism and lipid accumulation. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 18, n. 5, p. 597-607, 2006. Disponível em: <10.1071/RD05064> Acesso em: 15 set. 2016.

DENG, B. et al. Proteomics analysis of stage-specific proteins expressed in human squamous cell lung carcinoma tissues. *Cancer Biomarkers*, v. 1, n. 6, p. 279-286, 2005. Disponível em: <10.3233/CBM-2005-1603> Acesso em: 15 out. 2016.

DONNAY, I.; LEESE, H. J. Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Molecular Reproduction and Development*, n. 53, n. 2, p. 171-178, 1999. Disponível em: <10.1002/(SICI)1098-2795(199906)53:2<171::AID-MRD6>3.0.CO;2-F> Acesso em: 12 ago. 2016.

DOS SANTOS NETO, P. C. et al. Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology*, v. 70, n. 1, p. 17-22, 2015. Disponível em: <10.1016/j.cryobiol.2014.11.001> Acesso em: 15 set. 2016.

DOVOLOU, E. et al. Effects of guaiazulene on in vitro bovine embryo production and on mRNA transcripts related to embryo quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 5, p. 862-869, 2011. Disponível em: <10.1111/j.1439-0531.2011.01756.x> Acesso em: 12 out. 2016.

DU PLESSIS, S. S. et al. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology*, v. 3, n. 4, p. 539-554, 2008. Disponível em: <10.1586/17474108.3.4.539> Acesso em: 16 out. 2016.

DUNNING, K. R. et al. Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to L-carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice. *Biology of Reproduction*, v. 85, n. 3, p. 548-555, 2011. Disponível em: <10.1095/biolreprod.110.090415> Acesso em: 15 set. 2016.

DUNNING, K. R.; ROBKER, R. L. Promoting lipid utilization with L-carnitine to improve oocyte quality. *Animal Reproduction Science*, v. 134, n. 1-2, p. 69-75, 2012. Disponível em: <10.1016/j.anireprosci.2012.08.013> Acesso em: 12 set. 2016

EATON, S. Control of mitochondrial β -oxidation flux. *Progress in Lipid Research*, v. 41, n. 3, p. 197-239, 2002. Disponível em: <10.1016/S0163-7827(01)00024-8> Acesso em: 14 set. 2016.

EATON, S.; BARTLETT, K.; POURFARZAM, M. Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochemical Journal*, v. 320, pt. 2, p. 345-357, 1996. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1217938/> Acesso em: 12 out. 2016.

FAIR, T. et al. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocysts production. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, n. 2, p. 186-195, 2001. Disponível em: <10.1002/1098-2795(200102)58:2<186::AID-MRD8>3.0.CO;2-N> Acesso em: 10 set. 2016.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 116, n. 2, p. 373-378, 1999. Disponível em: <10.1530/jrf.0.1160373> Acesso em: 15 ago. 2016.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 99, n. 2, p. 673-679, 1993. Disponível em: <10.1530/jrf.0.0990673> Acesso em: 13 out. 2016.

FLANAGAN, J. L. Role of carnitine in disease. *Nutrition & Metabolism*, v. 7, n. 30, p. 1-14, 2010. Disponível em: <10.1186/1743-7075-7-30> Acesso em: 15 ago. 2016.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. 9 f. 1 CD-ROM.

FONSECA, J. F. et al. *Bioteχνologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos*. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2014. 108 p.

FRANCIOSI, F. et al. Natriuretic peptide precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 91, n. 3, p. 1-9, 2014. Disponível em: <10.1095/biolreprod.114.118869> Acesso em: 14 out. 2016.

FRIEDLANDER, R. M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *The New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 14, p. 1365-1375, 2003. Disponível em: <10.1056/NEJMra022366> Acesso em: 13 out. 2016.

GADJA, B. et al. Lipid content and cryotolerance of porcine embryos cultured with phenazine ethosulfate. *CryoLetters*, v. 32, n. 4, p. 349-357, 2011. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/cryo/cryo/2011/00000032/00000004/art00007?crawler=true> Acesso em: 18 out. 2016.

GARCÍA-MIRANDA, P. et al. Developmental maturation and segmental distribution of rat small intestinal L-carnitine uptake. *The Journal of Membrane Biology*, v. 206, n. 1, p. 9-16, 2005. Disponível em: <10.1007/s00232-005-0769-0> Acesso em: 27 out. 2016.

GASPAR, R. C. et al. Oxygen tension affects histone remodeling of in vitro-produced embryos in a bovine model. *Theriogenology*, v. 83, n. 9, p. 1408-1415, 2015. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2015.01.002> Acesso em: 20 out. 2016.

GENOVA, M. L. et al. The mitochondrial production of reactive oxygen species in relation to aging and pathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1011, p. 86-100, 2004. Disponível em: <10.1196/annals.1293.010> Acesso em: 18 ago. 2016.

GERTZ, M. et al. Identification of peroxiredoxin 1 as a novel interaction partner for the lifespan regulator protein p66Shc. *Aging (Albany, NY)*, v. 1, n. 2, p. 254-265, 2009. Disponível em: <10.18632/aging.100017> Acesso em: 13 out. 2016.

GHANEM, N. et al. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology*, v. 82, n. 2, p. 238-250, 2014. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2014.03.024> Acesso em: 8 ago. 2016.

GIBBONS, A. et al. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 95, n. 1, p. 61-64, 2011. Disponível em: <10.1016/j.smallrumres.2010.08.007> Acesso em: 13 ago. 2015.

GOMIS, J. et al. Forskolin improves the cryosurvival of in vivo derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. *Cryobiology*, v. 66, n. 2, p. 144-150, 2013. Disponível em: <10.1016/j.cryobiol.2012.12.009> Acesso em: 22 nov. 2016.

GONZALEZ-BULNES, A. et al. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH response. *Theriogenology*, v. 58, n. 8, p. 1607-1614, 2002. Disponível em: <10.1016/S0093-691X(02)01078-6> Acesso em: 21 set. 2016.

GUIGNOT, F. et al. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology*, v. 66, n. 4, p. 1004-1011, 2006. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2006.02.040> Acesso em: 15 set. 2015.

HA, A-N. et al. Development of a modified straw method for vitrification of in vitro-produced bovine blastocysts and various genes expression in between the methods. *Cryobiology*, v. 68, n. 1, p. 57-64, 2014. Disponível em: <10.1016/j.cryobiol.2013.11.007> Acesso em: 8 jul. 2016.

HANSEN, J.; MORIARTY-CRAIG, S.; JONES, D. P. Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-1 differentially regulate NF-Kappa B activities. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 43, n. 2, p. 282-288, 2007. Disponível em: <10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.029> Acesso em: 12 ago. 2016

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, v. 98, n. 1-2, p. 113-128, 2007. Disponível em: <10.1016/j.anireprosci.2006.10.008> Acesso em: 17 out. 2016.

HOUGHTON, F. D. et al. Na⁺, K⁺, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. *Developmental Biology*, v. 263, n. 2, p. 360-366, 2003. Disponível em: <10.1016/j.ydbio.2003.07.014> Acesso em: 12 out. 2016.

HUSEIN, M. Q. et al. Effect of eCG on the pregnancy rate of ewes transcervically inseminated with frozen-thawed semen outside the breeding season. *Theriogenology*, v. 49, n. 5, p. 997-1005, 1998. Disponível em: <10.1016/S0093-691X(98)00048-X> Acesso em: 14 set. 2016.

HWANG, I-S et al. Rescue of vitrified-warmed bovine oocytes with rho-associated coiled-coil kinase inhibitor. *Biology of Reproduction*, v. 89, n. 2, p. 1-6, 2013. Disponível em: <10.1095/biolreprod.113> Acesso em: 10 out. 2016.

IETS. *Embryo Technology Newsletter*, v. 34, n. 4, p. 1-74, 2016.

JAKOBS, B. S.; WANDERS, R. J. A. Fatty acid β -oxidation in peroxisomes and mitochondria: the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine in shuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 213, n. 3, p. 1035-1041, 1995. Disponível em: <10.1006/bbrc.1995.2232> Acesso em: 12 set. 2016.

JANG, H. H. et al. Two enzymes in one: two yeast peroxiredoxin display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, v. 117, n. 5, p. 625-635, 2004. Disponível em: <10.1016/j.cell.2004.05.002> Acesso em: 14 out. 2016.

JIANG, Q. et al. Changes in the levels of l-carnitine, acetyl-l-carnitine and propionyl-l-carnitine are involved in perfluorooctanoic acid induced developmental cardiotoxicity in chicken embryo.

Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 48, p. 116-124, 2016. Disponível em: <10.1016/j.etap.2016.10.01> Acesso em: 27 nov. 2016.

JIN, B. et al. Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*, v. 85, n. 4, p. 834-847, 2011. Disponível em: <10.1095/biolreprod.110.088641> Acesso em: 15 ago. 2016.

JOGL, G.; TONG, L. Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport. *Cell*, v. 112, n. 1, p.113-122, 2003. Disponível em: <10.1016/S0092-8674(02)01228-X> Acesso em: 14 out. 2016.

JOUSAN, F. D. et al. Relationship between group II caspase activity of bovine preimplantation embryos and capacity of hatching. *Journal of Reproduction and Development*, v. 54, n. 3, p. 217-220, 2008. Disponível em: <10.1262/jrd.19175> Acesso em: 22 out. 2016.

KANE, M. T. Fatty acids as a energy source for culture of one-cell rabbit ova to viable morulae. *Biology of Reproduction*, v. 20, n. 2, p. 323-332, 1979. Disponível em: <10.1095/biolreprod20.2.323> Acesso em: 15 set. 2016.

KASAI, M. et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 89, n. 1, p. 91-97, 1990. Disponível em: <10.1530/jrf.0.0890091> Acesso em: 8 ago. 2016.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 9, n. 2, p. 164-170, 2004. Disponível em: <www.rbmonline.com/Article/1354> Acesso em: 8 ago. 2016.

KERNER, J; HOPPEL, C. Fatty acid import to mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1486, n. 1, p. 1-17, 2000. Disponível em: <10.1016/S1388-1981(00)00044-5> Acesso em: 12 out. 2016.

KIM, W. T. et al. Metabolic pathways signatures associated with urinary metabolite biomarkers differentiate bladder cancer patients from healthy controls. *Younsei Medical Journal*, v. 57, n. 4, p. 865-871, 2016. Disponível em: <10.3349/ymj.2016.57.4.865> Acesso em: 15 set. 2016.

KIM, Y. S.; KIM, T. J.; LEE, K-Y. A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK-1)-mediated signalling pathway. *FEBS Letters*, v. 582, n. 13, p. 1913-1918, 2008. Disponível em: <10.1016/j.febslet.2008.05.015> Acesso em: 14 out. 2016.

KUNAK, C. S. et al. Nephroprotective potential of carnitine against glycerol and contrast-induced kidney injury in rats through modulation of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and apoptosis. *The British Journal of Radiology*, v. 89, n. 1058, 2015. Disponível em: <10.1259/bjr.20140724> Acesso em: 24 ago. 2016.

KWON, T. et al. An important role for peroxiredoxin II in survival of A549 lung cancer cells resistant to gefitinib. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 47, n. 5, e165, 2015. Disponível em: <10.1038/emm.2015.24> Acesso em: 22 out. 2016.

KOWALTOWSKI, A. J.; NETTO, L. E. S.; VERCESI, A. E. The thiol-specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition. Evidence for the participation of reactive oxygen species in this mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 21, p. 12766-12769, 1998. Disponível em: <10.1074/jbc.273.21.12766> Acesso em: 15 set. 2016.

LARMAN, M. G. et al. Analysis of global gene expression following mouse blastocysts cryopreservation. *Human Reproduction*, v. 26, n. 10, p. 2672-2680, 2011. Disponível em: <10.1093/humrep/der238> Acesso em: 22 out. 2016.

LEE, K-F. et al. A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. *Biology of Reproduction*, v. 64, n. 3, p. 910-917, 2001. Disponível em: <10.1095/biolreprod64.3.910> Acesso em: 22 out. 2016.

LEESE, H. J. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays*, v. 24, n. 9, p. 845-849, 2002. Disponível em: <10.1002/bies.10137> Acesso em: 18 set. 2016.

LEESE, H. J. Metabolism of the preimplantation embryos: 40 years on. *Reproduction*, v. 143, n. 4, p. 417-427, 2012. Disponível em: <10.1530/REP-11-0484> Acesso em: 18 ago. 2016.

LEONI, G. et al. Resumption of metabolic activity of vitrified/warmed ovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 64, n. 2, p. 207-213, 2003. Disponível em: <10.1002/mrd.10251> Acesso em: 22 set. 2016.

LEONI, G. G. et al. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Molecular Reproduction and Development*, v. 75, n. 2, p. 373-382, 2008. Disponível em: <10.1002/mrd.20754> Acesso em: 22 set. 2016.

LEYENS, G.; KNOOPS, B.; DONNAY, I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 69, n. 3, p. 243-251, 2004. Disponível em: <10.1002/mrd.20145> Acesso em: 21 set. 2016.

LI, J-L. et al. Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Journal of Biomedical Science*, v. 19, p. 1-9, 2012. Disponível em: <10.1186/1423-0127-19-32> Acesso em: 11 out. 2016.

LIEBERMANN, J. Vitrification of human blastocysts: an update. *Reproductive Biomedicine Online*, v. 19, sup. 4, p. 105-114, 2009. Disponível em: <10.1016/S1472-6483(10)61073-5> Acesso em: 22 set. 2016.

LOPES, A. S. et al. Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology*, v. 68, n. 2, p. 223-236, 2007. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2007.04.055> Acesso em: 11 out. 2016.

MACHADO, G. M. et al. Morphology, sex ratio and gene expression of Day 14 in vivo and in vitro bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 25, n. 4, p. 600-608, 2013. Disponível em: <10.1071/RD11282> Acesso em: 22 out. 2016.

MAMO, S. et al. Gene expression profiles of vitrified in vivo derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. *Molecular Reproduction and Development*, v. 73, n. 11, p. 1380-1392, 2006. Disponível em: <10.1002/mrd.20588> Acesso em: 22 out. 2016.

MANES, C.; LAI, N. C. Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production on superoxide radicals. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 104, n. 1, p. 69-75, 1995. Disponível em: <10.1530/jrf.0.1040069> Acesso em: 15 out. 2016.

MARCOVINA, S. M. et al. Translating the basic knowledge of mitochondrial functions to metabolic therapy: role of L-carnitine. *Translational Research*, v. 161, n. 2, p. 73-84, 2013. Disponível em: <10.1016/j.trsl.2012.10.006> Acesso em: 21 set. 2016.

McEVOY, T. G. et al. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, n. 1, p. 163-170, 2000. Disponível em: <10.1530/jrf.0.1180163> Acesso em: 11 ago. 2016.

McGARRY, J. D.; BROWN, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European Journal of Biochemistry*, v. 244, n. 1, p. 1-14, 1997. Disponível em: <10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x> Acesso em: 12 ago. 2016.

MEHAISEN, G. M. K. et al. Antioxidant capacity of melatonin on preimplantation development of fresh and vitrified rabbit embryos: morphological and molecular aspects. *PLoS One*, v. 10, n. 10, e.0139814, 2015. Disponível em: <0.1371/journal.pone.0139814> Acesso em: 14 set. 2016.

MESSENGER, M. et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction*, v. 26, n. 10, p. 2658-2671, 2011. Disponível em: <10.1093/humrep/der256> Acesso em: 18 set. 2016

MISHRA, A. et al. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 51, n. 2, p. 311-321, 2016. Disponível em: <10.1111/rda.12682> Acesso em: 15 out. 2016.

MITCHELL, L. M. et al. Season affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes. *Animal Reproduction Science*, v. 74, n. 3-4, p. 163-174, 2002. Disponível em: <10.1016/S0378-4320(02)00190-2> Acesso em: 13 set. 2016.

MOAWAD, A. R. et al. L-carnitine supplementation during vitrification of mouse germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent in vitro maturation improves meiotic spindle configuration and mitochondrial distribution in metaphase II oocytes. *Human Reproduction*, v. 29, n. 10, p. 2256-2268, 2014. Disponível em: <10.1093/humrep/deu201> Acesso em: 15 ago. 2016.

MONTEIRO, F. M. et al. Chromatin modifying agents in the in vitro production of bovine embryos. *Veterinary Medicine International*, v. 2011, p. 1-9, 2011. Disponível em: <10.4061/2011/694817> Acesso em: 17 out. 2016.

MORINAKA, A. et al. Oligomeric peroxiredoxin-I is an Essential intermediate for p53 to activate MST1 kinase and apoptosis. *Oncogene*, v. 30, n. 40, p. 4208-4218, 2011. Disponível em: <10.1038/onc.2011.139> Acesso em: 17 out. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. 5. ed. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, 2008. 1302 p.

NEUMANN, C. A.; CAO, J.; MANEVICH, Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle*, v. 8, n. 24, p. 4072-4080, 2009. Disponível em: <10.4161/cc.8.24.10242> Acesso em: 12 out. 2016.

NICÁCIO, A. C. et al. Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of *in vitro* produced bovine embryos. *Zygote*, v. 20, n. 2, p.117-122, 2012. Disponível em: <10.1017/S0967199410000717> Acesso em: 8 ago. 2016.

NIU, Y. et al. Distribution and content of lipid droplets and mitochondria in pig parthenogenetically activated embryos after delipitation. *Theriogenology*, v. 83, n. 1, p. 131-138, 2015. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2014.09.002> Acesso em: 15 set. 2016.

NOHALES-CÓRCOLES, M. et al. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Human Reproduction*, v. 31, n. 8, p. 1850-1858, 2016. Disponível em: <10.1093/humrep/dew130> Acesso em: 8 ago. 2016.

NOLAND, R. C. et al. Carnitine insufficiency caused by aging and overnutrition compromises mitochondrial performance and metabolic control. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 34, p. 22840-22852, 2009. Disponível em: <10.1074/jbc.M109.032888> Acesso em: 18 out. 2016.

NONG, Y-q et al. The expression and distribution of aquaporin 3 in mouse embryos before and after vitrification. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 30, n. 4, p. 601-606, 2013. Disponível em: <10.1007/s10815-013-9965-5> Acesso em: 8 ago. 2016.

OKADA, A. et al. Viability of cryopreserved and vitrified embryos and fertility after direct transfer in ewes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 48, n. 2, p. 189-195, 2002. Disponível em: <10.1262/jrd.48.189> Acesso em: 13 set. 2016.

OLIVEIRA, C. S. et al. Cell death is involved in sexual dimorphism during preimplantation development. *Mechanisms of Development*, v. 139, p. 42-50, 2016. Disponível em: <10.1016/j.mod.2015.12.001> Acesso em: 18 out. 2016.

ORTEGA, M. S. et al. Modification of embryonic resistance to heat shock in cattle by melatonin and genetic variation in *HSPA1L*. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 11, p. 9152-9164, 2016. Disponível em: <10.3168/jds.2016-11501> Acesso em: 18 nov. 2016.

OTT, M. et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, v. 12, n. 5, p. 913-922, 2007. Disponível em: <10.1007/s10495-007-0756-2> Acesso em: 15 set. 2016.

PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recente advances. *Biotechnology Advances*, v. 14, n. 2, p.127-149, 1996. Disponível em: <10.1016/0734-9750(96)00005-5> Acesso em: 23 ago. 2016.

PANDE, S. V.; BLANCHER, M. C. Reversible inhibition of mitochondrial adenosine diphosphate phosphorylation by long chain acyl coenzyme A esters. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 246, n. 2, p. 402-411, 1971. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/246/2/402.long> Acesso em: 23 set. 2016.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Apoptosis is an adaptive response in bovine preimplantation embryos that facilitates survival after heat shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 295, n. 1, p. 37-42, 2002. Disponível em: <10.1016/S0006-291X(02)00619-8> Acesso em: 12 ago. 2016.

PINTO, P. H. N. et al. Ultrassonografia modo Doppler colorido como substituta à laparoscopia na contagem de CL em ovelhas superovuladas. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016, Foz do Iguaçu. *Anais...* Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016, p. 247-248.

PRICKETT, R. C. et al. Effect of supercooling and cell volume on intracellular ice formation. *Cryobiology*, v. 70, n. 2, p. 156-163, 2015. Disponível em: <10.1016/j.cryobiol.2015.02.002> Acesso em: 8 ago. 2016.

PUDDU, P. et al. The putative role of mitochondrial dysfunction in hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 29, n. 7, p. 427-434, 2007. Disponível em: <10.1080/10641960701613852> Acesso em: 11 out. 2016.

RAMSAY, R.; ARDUINI, A. The carnitine acyltransferases and their role in modulating acyl-CoA pools. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 302, n. 2, p. 307-314, 1993. Disponível em: <10.1006/abbi.1993.1216> Acesso em: 18 ago. 2016.

RAMSAY, R. R.; GANDOUR, R. D.; VAN DER LEIJ, F. R. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1546, n. 1, p. 21-43, 2001. Disponível em: <10.1016/S0167-4838(01)00147-9> Acesso em: 18 ago. 2016.

RAMSAY, R. R.; ZAMMIT, V. A. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 25, n. 5-6, p. 475-493, 2004. Disponível em: <10.1016/j.mam.2004.06.002> Acesso em: 18 ago. 2016.

RAND, J. D.; GRANT, C. M. The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, n. 1, p. 387-401, 2006. Disponível em: <10.1091/mbc.E05-06-0520> Acesso em: 18 set. 2016.

REKIK, W.; DUFORT, I.; SIRARD, M. A. Analysis of the gene expression pattern of bovine blastocysts at three stages of development. *Molecular Reproduction and Development*, v. 78, n. 4, p. 226-240, 2011. Disponível em: <10.1002/mrd.21286> Acesso em: 22 out. 2016.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002. Disponível em: <10.1002/mrd.1153> Acesso em: 12 dez. 2015.

RIZOS, D. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocysts development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2003. Disponível em: <10.1095/biolreprod.102.007799> Acesso em: 10 out. 2016.

ROBINSON, J. J. et al. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*, v. 126, n. 3-4, p. 259-276, 2006. Disponível em: <10.1016/j.anifeedsci.2005.08.006> Acesso em: 12 set. 2015.

ROCHA, S. et al. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H₂O₂-induced oxidative stress. *Free Radical Research*, v. 49, n. 8, p. 990-1003, 2015. Disponível em: <10.3109/10715762.2015.1028402> Acesso em: 12 set. 2016.

ROMEK, M. et al. Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, n. 1, p. 24-32, 2009. Disponível em: <10.1111/j.1439-0531.2007.00984.x> Acesso em: 15 ago. 2016.

ROSE, R. D. et al. Regulation of sheep oocyte maturation using cAMP modulators. *Theriogenology*, v. 79, n. 1, p. 142-148, 2013. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2012.09.020> Acesso em: 22 nov. 2016.

ROY, V. K.; VERMA, R.; KRISHNA, A. Carnitine-mediated antioxidant enzyme activity and Bcl2 expression involves peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α in mouse testis. *Reproduction, Fertility and Development*, 2016. Disponível em: <10.1071/RD15336> Acesso em: 23 out. 2016.

SAENZ-DE-JUANO, M. D. et al. Effects of slow freezing procedure on late blastocyst gene expression and survival rate in rabbit. *Biology of Reproduction*, v. 87, n. 4, p. 1-9, 2012. Disponível em: <10.1095/biolreprod.112.100677> Acesso em: 12 out. 2016.

SAENZ-DE-JUANO, M. D. et al. Effect of embryo vitrification on rabbit foetal placenta proteome during pregnancy. *PLoS One*, v. 10, n. 4, e.0125157, 2015. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0125157> Acesso em: 22 set. 2015.

SAHIN, E.; DEPINHO, R. A. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature*, v. 464, n. 7288, p. 520-528, 2010. Disponível em: <10.1038/nature08982> Acesso em: 18 out. 2016.

SALUMETS, A. et al. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Human Reproduction*, v. 18, n. 4, p. 821-825, 2003. Disponível em: <10.1093/humrep/deg184> Acesso em: 20 ago. 2016.

SALZANO, S. et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2 which acts as a danger signal. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 33, p. 12157-12163, 2014. Disponível em: <10.1073/pnas.1401712111> Acesso em: 28 out. 2016.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by Slow freezing and vitrification. *Reproduction*, v. 141, n. 1, p. 1-19, 2011. Disponível em: <10.1530/REP-10-0236> Acesso em: 12 set. 2016.

SEILER, S. E. et al. Carnitine acetyltransferase mitigates metabolic inertia and muscle fatigue during exercise. *Cell Metabolism*, v. 22, n. 1, p. 65-76, 2015. Disponível em: <10.1016/j.cmet.2015.06.003> Acesso em: 15 set. 2016.

SENGODAN, R. et al. Peroxiredoxins (PRDX 1-6) expression pattern in immature, matured oocytes and various stages of *in vitro* fertilized and parthenogenetically activated preimplantation ovine embryos. *Journal of Science*, v. 4, n. 6, p. 382-389, 2014. Disponível em: <http://www.journalofscience.net/File_Folder/382-389(jos).pdf> Acesso em: 16 out. 2016.

SHARMA, S. et al. Altered carnitine homeostasis is associated with decreased mitochondrial function and altered nitric oxide signalling in lambs with pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular*, v. 294, n. 1, p. L46-56, 2008. Disponível em: <10.1152/ajplung.00247.2007> Acesso em: 14 set. 2016.

SHARMA, S. et al. Role of carnitine acetyl transferase in regulation of nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 1, p. 255-272, 2013. Disponível em: <10.3390/ijms14010255> Acesso em: 15 set. 2016.

SHAW, L. et al. Comparison of gene expression in fresh and frozen-thawed human preimplantation embryos. *Reproduction*, v. 144, n. 5, p. 569-582, 2012. Disponível em: <10.1530/REP-12-0047> Acesso em: 22 out. 2016.

SHIRAZI, A. et al. Vitrification of *in vitro* produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology*, v. 60, n. 2, p. 204-210, 2010. Disponível em: <10.1016/j.cryobiol.2009.11.002> Acesso em: 16 ago. 2016.

SHOUKIR, Y. et al. Early cleavage of *in vitro* fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Human Reproduction*, v. 12, n. 7, p. 1531-1536, 1997. Disponível em: <10.1093/humrep/12.7.1531> Acesso em: 20 ago. 2016.

SOMFAI, T. et al. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 23, n. 7, p. 912-920, 2011. Disponível em: <10.1071/RD10339> Acesso em: 16 ago. 2016.

SOMOSKOI, B. et al. Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 13, n. 22, p. 1-16, 2015. Disponível em: <10.1186/s12958-015-0018-z> Acesso em: 12 ago. 2016.

STINSHOFF, H. et al. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, v. 76, n. 8, p. 1433-1441, 2011. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2011.06.013> Acesso em: 7 ago. 2016.

STURMEY, R. G.; LEESE, H. J. Role of glucose and fatty acid metabolism in porcine early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, n. 1, p. 149-149, 2007. Disponível em: <10.1071/RDv20n1Ab137> Acesso em: 15 set. 2016.

STURMEY, R. G. et al. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, n. s3, p. 50-58, 2009. Disponível em: <10.1111/j.1439-0531.2009.01402.x> Acesso em: 18 out. 2016.

SUDANO, M. J. et al. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v. 75, n. 7, p. 1211-1220, 2011. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2010.11.033> Acesso em: 7 ago. 2016.

SUN, Y.; RIGAS, B. The thioredoxina system mediates redox-induced cell death in human colon cancer cells: implications for the mechanism of action of anticancer agents. *Cancer Research*, v. 68, n. 20, p. 8269-8277, 2008. Disponível em: <10.1158/0008-5472.CAN-08-2010> Acesso em: 18 set. 2016.

SUTTON-McDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*, v. 139, n. 4, p. 685-695, 2010. Disponível em: <10.1530/REP-09-0345> Acesso em: 18 set. 2016.

SUTTON-McDOWALL, M. L. et al. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, v. 77, n. 8, p. 1632-1641, 2012. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2011.12.008> Acesso em: 16 set. 2016.

TAN, Y-J et al. Aquaporin 7 plays a crucial role in tolerance to hyperosmotic stress and in the survival of oocytes during cryopreservation. *Scientific Reports*, v. 5, p. 1-13, 2015. Disponível em: <10.1038/srep17741> Acesso em: 14 ago. 2016.

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*, v. 26, n. 1, p. 90-100, 1990. Disponível em: <10.1002/mrd.1080260113> Acesso em: 22 ago. 2016.

THOMAS, R. E. et al. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biology of Reproduction*, v. 71, n. 4, p. 1142-1149, 2004. Disponível em: <10.1095/biolreprod.103.024828> Acesso em: 14 set. 2016.

THOMPSON, J. G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 263-275, 2000. Disponível em: <10.1016/S0378-4320(00)00096-8> Acesso em: 14 set. 2016.

TRUONG, T. T.; MAY SOH, Y.; GARDNER, D. K. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. *Human Reproduction*, v. 31, n. 7, p. 1445-1454, 2016. Disponível em: <10.1093/humrep/dew098> Acesso em: 12 out. 2016.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 357-364, 2000. Disponível em: <10.1016/S0378-4320(00)00097-X> Acesso em: 22 nov. 2015.

VAJTA, G. et al. Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology*, v. 45, n. 3, p. 683-690, 1996. Disponível em: <10.1016/0093-691X(95)00414-4> Acesso em: 22 nov. 2015.

VAJTA, G. et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 51, n. 1, p. 53-58, 1998. Disponível em: <10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V> Acesso em: 22 nov. 2015.

VAN BLERKOM, J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion*, v. 11, n. 5, p. 797-813, 2011. Disponível em: <10.1016/j.mito.2010.09.012> Acesso em: 15 set. 2016.

VARAGO, F. C. et al. Comparison of conventional freezing and vitrification with dimethylformamide and ethylene glycol for cryopreservation of ovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, n. 5, p. 839-844, 2014. Disponível em: <10.1111/rda.12376> Acesso em: 10 ago. 2016.

VAZ, F. M.; WANDERS, R. J. A. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal*, v. 361, pt. 3, p. 417-429, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222323/> Acesso em: 12 ago. 2016.

VEIGA-LOPEZ, A. et al. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology*, v. 63, n. 7, p. 1973-1983, 2005. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2004.09.055> Acesso em: 22 out. 2016.

WANG, H.; DEY, S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature Reviews: Genetics*, v. 7, n. 3, p. 185-199, 2006. Disponível em: <10.1038/nrg1808> Acesso em: 27 nov. 2015.

WANG, Q. et al. Effects of L-carnitine against H₂O₂-induced oxidative stress in grass carp ovary cells (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 42, n. 3, p. 845-857, 2016. Disponível em: <10.1007/s10695-015-0179-x> Acesso em: 18 out. 2016.

WILKINSON, R. F. et al. The use of neural networks in developing novel embryo culture media-formulations. *Theriogenology*, v. 45, n. 1, p. 41-49, 1996. Disponível em: <10.1016/0093-691X(95)00353-A> Acesso em: 12 jul. 2016.

WRENZYCKI, C. et al. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in preimplantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, n. 1, p. 8-18, 1999. Disponível em:

<10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K> Acesso em: 22 out. 2016.

WU, B.; ZAN, L. Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 47, n. 5, p. 865-871, 2012. Disponível em: <10.1111/j.1439-0531.2011.01945.x> Acesso em: 12 out. 2016.

WU, D. et al. Structure of human carnitine acetyltransferase. Molecular basis for fatty acyl transfer. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 15, p. 13159-13165, 2003. Disponível em: <10.1074/jbc.M212356200> Acesso em: 23 set. 2016.

WU, X. et al. Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), na organic cation/carnitine transporter. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 290, n. 3, p. 1492-1499, 1999. Disponível em: <http://jpet.aspetjournals.org/content/290/3/1482.long> Acesso em: 18 out. 2016.

YAO, Y-C et al. Long-term cryopreservation had no adverse effect on viability of embryos and their offspring in sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 1-2, p. 42-46, 2012. Disponível em: <10.1016/j.anireprosci.2012> Acesso em: 21 mar. 2016.

YOON, J. et al. Effects of oxygen tension and IGF-I on HIF-1 α protein expression in mouse blastocysts. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2013. Disponível em: <10.1007/s10815-012-9902-z> Acesso em: 22 out. 2016.

YOU, J. et al. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology*, v. 78, n. 2, p. 235-243, 2012. Disponível em: <10.1016/j.theriogenology.2012.02.027> Acesso em: 22 set. 2016.

ZAMMIT, V. A. Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Progress in Lipid Research*, v. 38, n. 3, p. 199-224, 1999. Disponível em: <10.1016/S0163-7827(99)00002-8> Acesso em: 22 set. 2016.

ZHANG, D. X.; GUTTERMAN, D. D. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, v. 292, n. 5, p. 2023-2031, 2007. Disponível em: <10.1152/ajpheart.01283.2006> Acesso em: 12 out. 2016.

ZHAO, X. et al. Effect of vitrification on the microRNA transcriptome in mouse blastocysts. *PLoS One*, v. 10, n. 4, e.0123451, 2015. Disponível em: <10.1371/journal.pone.0123451> Acesso em: 15 set. 2016.

ANEXOS

Protocolo de diluição da L-carnitina para suplementação dos meios de vitrificação e reaquecimento

- Pesar 60 mg de L-carnitina [Sigma C0158 (inner salt)] em tubo cônico previamente identificado. Cuidado na manipulação da L-carnitina é necessário, pois a mesma é altamente higroscópica;
- Diluir a L-carnitina em 500 μ L de meio base;
- Retirar 5 μ L de cada solução de vitrificação ou reaquecimento e acrescentar a mesma quantidade do meio base com L-carnitina em cada solução. Homogeneizar.