

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Adição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)
de cadeia longa ômega-3 na maturação de oócitos
suínos**

Barbara da Silva Alves

Pelotas, 2016

Barbara da Silva Alves

**Adição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de cadeia longa ômega-3 na
maturação *in vitro* de oócitos suínos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Thomaz Lucia Jr.

Coorientadores: Arnaldo Diniz Vieira
Rafael Gianella Mondadori

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas Catalogação
na Publicação

A314a Alves, Barbara da Silva

Adição de ácidos graxos poli-insaturados (pufas) de cadeia longa ômega-3 na maturação in vitro de oócitos suínos / Barbara da Silva Alves ; Thomaz Lucia Junior, orientador ; Rafael Gianella Mondadori, Arnaldo Diniz Vieira, coorientadores. — Pelotas, 2016.

31 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Maturação nuclear. 2. ácido graxo. 3. Miv. 4. Oócito. 5. Suíno. I. Lucia Junior, Thomaz, orient. II. Mondadori, Rafael Gianella, coorient. III. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. IV. Título.

CDD : 636.082

Elaborada por Maria Beatriz Vaghetti Vieira CRB: 10/1032

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Karina L. Goularte (Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS)

Dr^a Lígia M. Cantarelli Pegoraro (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas-RS)

Prof. Thomaz Lucia Jr., PhD (Orientador, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS)

Dedico este trabalho a minha família, por estar ao meu lado em todos momentos.

Agradecimentos

Agradeço a minha família e meu namorado pelo apoio constante e incentivo para chegar até aqui.

A todas minhas amigas que sempre estiveram ao meu lado, nos momentos felizes e dolorosos, pela amizade e compreensão.

Ao prof. Dr. Thomaz Lucia Jr. por acreditar no projeto e sempre estar disponível para esclarecer todas minhas dúvidas. Aos meus co-orientadores Dr. Arnaldo Diniz Vieira e Dr. Rafael Gianella Mondadori pelas explicações e auxílios dentro e fora do laboratório. As colaboradoras do laboratório de Embriologia que participaram das rotinas. Ao grupo ReproPEL pelas coletas nos frigoríficos.

À direção e funcionários dos frigoríficos Bonsul e Castro pela possibilidade de coletar ovários para realizar o projeto.

Por fim, gostaria de agradecer aos órgãos de fomento, Capes, CNPq e FAPERGS pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsa.

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se.”

Voltair

Resumo

ALVES, Barbara da Silva. **Adição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de cadeia longa ômega-3 na maturação *in vitro* de oócitos suínos**. 2016. 31f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A produção *in vitro* de embriões é uma das principais técnicas aplicadas a reprodução animal. A suplementação com ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA) da série ômega-3 nos meios de maturação *in vitro* (MIV) pode ser relevante para a diminuição de gotículas lipídicas que prejudicam a eficiência da produção *in vitro* e criopreservação de embriões suínos. O presente trabalho avaliou o efeito da suplementação do meio de MIV com dois PUFA, o eicosapentaenoico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA), sobre a maturação nuclear de oócitos suínos. Folículos com 3 a 6 mm de diâmetro foram aspirados de ovários de fêmeas suínas pré-púberes coletados em frigoríficos. O meio de maturação foi constituído de TCM-199 suplementado com 0,57 mM de cisteína, 0,91 mM de piruvato de sódio, 10 ng/mL de EGF, 0,5µg/mL de LH, 0,5µg/mL de FSH e 0,1% de PVA. A MIV foi avaliada para grupos com aproximadamente 30 complexos *cumulus*-oócitos, compondo quatro tratamentos, em meios suplementados com: 10% de fluido folicular suíno (FFS), considerado como controle; 50; 100 e 150µM de cada PUFA. Foi também realizada a suplementação com FFS e AMPc para avaliar a possível toxicidade desses ácidos graxo. Após as 44 h de MIV, os oócitos foram corados com Hoechst 33342. Houve diferença entre as taxas de MIV obtidas nos meios suplementados com diferentes níveis de EPA a partir de 100 µM, em comparação ao controle ($P > 0,05$). As taxas de MIV observadas nos meios suplementados com DHA em concentrações a partir de 100 µM foram inferiores às observadas para o controle ($P < 0,05$). Quando comparadas com meios suplementados FFS e AMPc, as taxas de MIV observas com 50 µM de EPA e DHA não diferiram ($P > 0,05$). Estes resultados indicam que a suplementação de meios para MIV com EPA e DHA influenciam de forma negativa as taxas de maturação *in vitro* nuclear, sugerindo um efeito tóxico para os oócitos suínos.

Palavras-chave: maturação nuclear, ácido graxo, MIV, oócito, suíno.

Abstract

ALVES, Barbara da Silva. **Addition of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for *in vitro* maturation of porcine oocytes**. 2016. 30f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The production of embryos *in vitro* (IVP) is one of the main techniques applied to animal reproduction. Supplementation of *in vitro* maturation (IVM) media with long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA) of the omega-3 series may be relevant to the decrease of lipid droplets which hinder efficient IVP and cryopreservation of porcine embryos. This study evaluated the effects of supplementation of IVM media with two PUFA, the eicosapentaenoic (EPA) and the docosahexaenoic (DHA) on the nuclear maturation of pig oocytes. Follicles with 3-6 mm diameter were aspirated from ovaries collected at abattoirs from prepubertal gilts. The IVM medium was TCM-199 supplemented with 0.57 mM cysteine, 0.91 mM sodium pyruvate, 10 ng/mL EGF, 0.5 µg/mL LH, 0.5 µg/mL FSH and 0.1% PVA. The IVM rates were evaluated for groups having nearly 30 *cumulus*-oocyte complexes in four treatments, including media supplemented with: 10% porcine follicular fluido (PFF), as a control; 50; 100 and 150µM of each PUFA. FOS supplementation and cAMP was also performed to evaluate the possible toxicity of these fatty acids. After 44 h of IVM, oocytes were stained with Hoechst 33342. Differences were observed between IVM rates obtained in media supplemented with different levels of EPA from 100 uM, compared to the control ($P > 0.05$). The IVM rates observed in media supplemented with DHA at concentrations from 100 uM were lower than those in the control ($P < 0.05$). When compared with supplemented FFS and cAMP means IVM rates swarming with 50 mM of EPA and DHA did not differ ($P > 0.05$). These results indicate that supplementation of IVM medium with EPA and DHA influenced negatively the rate of nuclear maturation, suggesting a toxic effect for swine oocytes.

Keywords: nuclear maturation, fatty acid, MIV, oocyte, porcine.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos após 44 h em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido eicosapentaenoico (EPA)21

Tabela 2. Taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos após 44 h em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido docosahexaenoico (DHA).....21

Tabela 3. Taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos após 44 h em meio suplementado com os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) e AMPc.....22

Lista de Abreviaturas

ALA: Ácido α -linolênico
AMPc: Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
CCO: Complexo *Cumulus*-Oócito
CIV: Cultivo *in vitro*
DHA: Ácido Docosaheptaenoico
DMSO: Dimetilsulfóxido
EGF: Fator de Crescimento Epidermal
EPA: Ácido Eicosapentaenoico
FFS: Fluido Folicular Suíno
FIV: Fertilização *in vitro*
FSH: Hormônio Folículo Estimulante
LH: Hormônio Luteinizante
MI: Metáfase I
MII: Metáfase II
MIV: Maturação *in vitro*
MPF: Fator Promotor da Maturação
PBS: Tampão Fosfato-Salino
PIV: Produção *in vitro*
PUFA: Ácido Graxo Poliinsaturado
PVA: Álcool Polivinílico
QVG: Quebra da Vesícula Germinativa
ROS: Espécie Reativa de Oxigênio
VG: Vesícula Germinativa

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Evolução da produção <i>in vitro</i> de embriões suínos	13
2.2 Maturação oocitária	14
2.3 Papel dos lipídeos em oócitos e embriões.....	16
2.4 Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série ômega-3	17
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	18
3.1 Hipótese.....	18
3.2 Objetivo Geral.....	18
3.3 Objetivos específicos	18
4 CAPÍTULOS	18
4.1.1 Material e métodos	18
4.1.1.1 Reagentes químicos	19
4.1.1.2 Coleta e maturação <i>in vitro</i> dos CCO	19
4.1.1.3 Delineamento experimental	20
4.1.1.4 Avaliações da maturação nuclear	20
4.1.1.5 Análise estatística	21
4.1.2 Resultados.....	21
4.1.3 Discussão	23
4.1.4 Conclusão.....	24
5. REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões começou a evoluir na década de 1970, mas essa técnica alcançou resultados mais eficientes nas espécies bovina e ovina somente nos anos 1980 (Gruppen, 2014). Somente nos anos 1990 houveram os primeiros nascimentos de suínos provenientes de PIV (Yoshida, et al., 1993).

Em função destes avanços, surgiu o interesse de utilizar um meio de composição definida em substituição aos meios que utilizavam fluido folicular, uma vez que este fluido possui metabólitos ainda não totalmente caracterizados e apresenta considerável variação (Somfai, et al., 2014). Uma das macromoléculas que vem sendo usadas para substituir as proteínas fornecidas pelo fluido folicular é o álcool polivinílico (PVA), pois este composto não é metabolizado pelo complexo *cumulus*-oócito (CCO) (Yoshioka, 2011). Assim sendo, o uso do PVA torna o meio quimicamente definido, permitindo que sejam avaliados os efeitos de outras moléculas usadas no meio de maturação.

A maturação *in vitro* (MIV) é a primeira etapa e uma das mais importantes para a PIV de embriões. A utilização de um meio de maturação eficiente é fundamental para a ocorrência da maturação nuclear, citoplasmática e molecular. Assim, a suplementação de meios de maturação é utilizada para possibilitar um ambiente artificial mais próximo do fisiológico. As taxas de MIV de oócitos suínos utilizando meios de composição química definida atualmente estão em torno de 70% (Casillas, et al., 2014; Somfai, et al., 2014).

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de cadeia longa da série ômega-3 são baseados no ácido α -linolênico (ALA), que é obtido pela dieta e sintetiza os demais ácidos graxos ômega-3 através de reações enzimáticas (revisado por Tanghe e Smet, 2013). Os PUFA da série ômega-3 podem estar envolvidos no metabolismo e na produção de prostaglandinas, hormônios e citoquinas que influenciarão o sucesso da reprodução (Gulliver, et al., 2012). Além disso, ácidos graxos adicionados ao meio de maturação *in vitro* podem melhorar as taxas de maturação nuclear (Marei, et al., 2009), influenciar no metabolismo lipídico e auxiliar no desenvolvimento de embriões de melhor qualidade (Lapa, et al., 2011). Levando em consideração estes resultados, pode-se esperar que a suplementação de meios de MIV com diferentes níveis do ácido eicosapentaenoico (EPA) e do ácido docosahexaenoico (DHA) podem beneficiar as taxas de maturação nuclear de

oócitos suínos. No entanto, até o momento não foi demonstrado estudos sobre os efeitos de EPA e DHA na suplementação de meios na MIV de suínos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Evolução da produção *in vitro* de embriões suínos

Atualmente tem-se utilizado a espécie suína como modelo para a aplicação de diversas tecnologias como, a clonagem e a transgenia, e também para fins reprodutivos. Devido a sua semelhança com humanos, os suínos servem como potenciais doadores de tecidos e órgãos para xenotransplantes (Barros, et al., 2015). No entanto, diversos mecanismos fisiológicos que controlam este processo ainda não são totalmente conhecidos, fazendo com que sejam necessários muitos estudos acerca do assunto.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) envolve quatro etapas fundamentais: coleta dos ovários e aspiração dos oócitos; maturação *in vitro* dos oócitos (MIV); fertilização *in vitro* (FIV); e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio em que as estruturas estarão aptas a serem transferidas para as fêmeas (Somfai e Hirao, 2011). Em espécies como bovinos e ovinos esta técnica está estabelecida. No entanto, na espécie suína ainda existem etapas a serem aperfeiçoadas, uma vez que as atuais taxas de desenvolvimento até blastocisto não ultrapassam os 30% (Dang-Nguyen, et al., 2011; Liu, et al., 2012), tornando as taxas de desenvolvimento embrionário instáveis e baixa qualidade do embrião, limitando a sua utilização em larga escala (Nagashima, et al., 2012).

Além disso, outro principal impasse que inviabiliza a PIV de embriões suínos é as anormalidades cromossômicas causadas pelas altas taxas de polispermia e a incapacidade dos embriões para concluir a eclosão (Dang-Nguyen, 2011).

Os ovários utilizados para PIV de embriões costumam ser obtidos em frigoríficos comerciais, o que resulta na coleta de oócitos em diversas fases do ciclo estral. Estes oócitos são selecionados usando o critério de morfologia, baseados na estrutura das camadas de células do *cumulus oophorus* e do seu citoplasma. No entanto, além da maturação nuclear, é necessário que haja uma série de processos

durante a maturação citoplasmática para que o oócito adquira a capacidade de tornar-se apto a ser fecundado e desenvolva um embrião viável (Uhm, et al., 2007).

Na FIV, os embriões devem ser produzidos utilizando oócitos maduros, que poderão ser fertilizados com espermatozoides do epidídimo, frescos ou congelados/descongelados (Rath e Niemann, 1997). Para que este processo ocorra com eficiência, a melhor estratégia que vem sendo utilizada é a adição de fluidos do útero e do oviduto de fêmeas para obtenção de melhores taxas de fertilização *in vitro* (Romar, et al., 2001).

Após a FIV, é necessário um meio de cultivo para que os possíveis embriões se desenvolvam até o estágio de blastocisto. Um dos motivos para estas diferenças seria a modificação no metabolismo dos lipídeos (Prates, Nunes e Pereira, 2014), o que altera a fluidez da membrana plasmática.

Diversos fatores influenciam nas baixas taxas obtidas na PIV de embriões suínos. Primeiramente, devido ao fato de que a maioria dos oócitos obtidos em abatedouros são originários de fêmeas pré-púberes, exibindo uma reduzida competência para o desenvolvimento *in vitro* (Peters, Milliken e Davis, 2001). Outro fator que pode afetar a maturação seria o estresse térmico, que afeta a competência meiótica dos oócitos suínos, reduzindo as taxas de formação de blastocisto (Do, et al., 2015). Além disso, a maturação citoplasmática é essencial para a competência de desenvolvimento dos oócitos, devido a maior concentração de ácidos graxos (Pawlak, et al., 2012).

2.2 Maturação oocitária

Durante a foliculogênese, o oócito é mantido na fase nuclear de prófase I, ou estágio de vesícula germinativa (VG), pelo ambiente folicular. Para que seja retomada a meiose, é necessário um pico de hormônio luteinizante (LH) liberado pela hipófise, que desencadeará a ovulação. Após, será reiniciada a meiose até a fase competente de metáfase II, na qual ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Areekijseeree e Chuen-Im, 2012).

O processo de MIV é dependente da qualidade dos oócitos imaturos, assim como do ambiente de maturação nuclear, citoplasmática e molecular, modulando a competência final dos oócitos (Ali, Benkhalifa e Miron, 2006). Além disso, o processo de maturação é coordenado pela ação conjunta das células somáticas que

102 circundam o oócito, a granulosa e o *cumulus oophorus*, através de junções
103 comunicantes mantidas entre essas estruturas (Mermillod, et al., 2008).

104 A heterogeneidade dos oócitos obtidos representa um grande desafio na PIV
105 de embriões. A avaliação de critérios morfológicos como citoplasma e número de
106 complexos *cumulus*-oócitos é a forma mais simples para a escolha das estruturas
107 aptas para este processo (Wurth e Kriup, 1992), já que outras técnicas, como
108 avaliação da expressão gênica, exigem o comprometimento do oócito (Ouandaogo,
109 et al., 2011). No entanto, vem sendo utilizado o corante Brilliant Cresyl Blue, uma
110 técnica não-invasiva, que avalia as funções mitocondriais e tem sido utilizado na
111 tentativa de avaliar a maturação e não comprometer os oócitos (Santos, et al.,
112 2013).

113 A adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC) é uma molécula sinalizadora
114 intracelular que exerce controle na meiose de mamíferos (Bilodeau-Goeseels, 2003).
115 A produção do AMPC se dá tanto pelas células da granulosa, sendo passado para o
116 oócito através das junções comunicantes (Edry, et al., 2006), quanto pela síntese
117 através da adenilato ciclase no interior do oócito (Mehlmann, et al., 2005). Altos
118 níveis de AMPC no interior do oócito mantem inativo o fator promotor da maturação
119 (MPF), mantendo o oócito bloqueado no estágio de VG (Duckworth, et al., 2002). A
120 remoção do oócito do folículo resulta na retomada espontânea da meiose,
121 provocando uma interrupção do período que o oócito necessitaria para realizar a
122 capacitação. A inibição da meiose pode ser prolongada pela manutenção dos níveis
123 basais de MPF (Goren e Dekel, 1994), mantendo altos níveis de AMPC. Quando os
124 níveis de AMPC no oócito decaem, ocorre a maturação (Conti, et al, 2002), pois o
125 MPF controla a retomada da meiose nos oócitos, podendo induzir a condensação
126 cromossômica, o rompimento da VG e a formação do fuso (Thibault, Szöllösi e
127 Gérard, 1987), caracterizando-se, assim, a maturação nuclear. No entanto, ainda
128 existem diversos caminhos relacionados com a maturação que também são
129 ativados.

130 Durante a maturação citoplasmática, existe uma modificação na maquinaria
131 de transcrição e tradução, afetando a síntese de RNA e proteínas (Fair, Hyttel e
132 Greve, 1995), além de ocorrer uma redistribuição de organelas (Assey, et al., 1994).
133 Já a maturação molecular está relacionada com a capacidade intrínseca do oócito
134 de se desenvolver, sendo que este tipo de maturação está relacionado com o estado
135 do oócito ainda dentro do folículo (Sirard, et al., 2006). Na maturação molecular

existirá um acúmulo de moléculas específicas, ainda não identificadas totalmente (Humblot, et al., 2005).

Meios quimicamente definidos podem auxiliar na padronização das condições de PIV de embriões, proporcionando melhor confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados e permitindo a avaliação exata dos efeitos dos diferentes componentes utilizados durante o processo até o desenvolvimento do embrião. O fluido folicular suíno (FFS) é muito utilizado por conter altas concentrações de superóxido dismutase, que promove o desenvolvimento dos oócitos por desempenhar um papel na sua proteção contra o estresse oxidativo (Tatemoto, et al., 2004). No entanto, o fluido folicular é obtido apenas da preparação de ovários, podendo apresentar variabilidade, em diferentes coletas. Além disso, o FFS contém diversos fatores indefinidos e pode apresentar risco de contaminação com agentes patogênicos (Sur, et al., 2001). Embora forneça um ambiente benéfico para o oócito imaturo (Ito, et al., 2008; Bijttebier, et al., 2008), embriões PIV que foram produzidos com a adição de FFS podem transferir infecções aos destinatários ou para a sua prole.

Além disso, o meio de cultura que é utilizado para a maturação *in vitro* afeta diretamente a maturação nuclear e citoplasmática. O Meio de Cultura de Tecido (TCM-199) é o meio de cultura mais comum que vem sendo utilizado para a MIV (Abeydeera, et al., 2000; Yoon, et al., 2015). No entanto, este meio foi originalmente desenvolvido para estudos em fibroblastos, tornando-o não ideal para a MIV. Apesar disso, considerando que ainda não há conhecimento suficiente sobre o metabolismo de oócitos e embriões e suas necessidades metabólicas, os meios de cultura ainda necessitam suprir o déficit do sistema de MIV devido as exigências nutricionais do oócito.

2.3 Papel dos lipídeos em oócitos e embriões

Os oócitos suínos são conhecidos como um dos oócitos que possuem altos índices de lipídeos intracelulares entre as espécies. As gotículas lipídicas presentes nesses oócitos estão constantemente mudando sua forma, tamanho e volume durante a maturação (Prates, et al., 2012).

O elevado conteúdo de lipídeos intracelulares, principalmente na forma de gotículas, é considerado o principal fator limitante para a criopreservação de oócitos

e embriões suínos (Kikuchi, et al., 2002; Romek, et al., 2011; Zhang, et al., 2012). A quantidade dessas gotículas depende do estágio em que se encontram as estruturas, sendo que a partir do estágio de mórula, esses volumes diminuem (Romek, et al., 2011), o que se reflete em uma elevação das taxas de criossobrevivência (Zhang, et al., 2012). Apesar destas limitações, os lipídeos intracelulares se constituem na fonte primária de energia para o desenvolvimento e competência dos oócitos e embriões (Sturmey e Leese, 2003).

2.4 Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série ômega-3

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) são classificados com base na posição da primeira ligação dupla relativa a terminação metil (terminação ômega; Ω). Os PUFA da série ômega-6 tem o ácido linoleico como precursor, enquanto os PUFA da série ômega-3 tem o ácido α -linolênico como precursor (revisado por Tanghe e De Smet, 2013). Segundo Kurlak e Stephenson (1999), juntamente com o ácido aracdônico, os PUFAs da série ômega-3 com maior importância fisiológica são o ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3, EPA) e o ácido docosahexaenoico (C22:6n-3, DHA).

Além de servirem como fontes de energia, esses PUFA possuem papel estrutural importante como parte da bicamada fosfolipídica das membranas, afetando a sua fluidez e, por conseguinte, os mecanismos de transmissão intracelular de sinais (Stillwell e Wassall, 2003). Além disso, estes PUFA possuem um papel na adipogênese e em outros eventos fisiológicos, regulando a transcrição gênica (Jump, 2008), provocando redução da expressão de genes que codificam diversas enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídeos (Barber, et al., 2013). Os animais carecem dessas moléculas, já que não conseguem sintetizar os ácidos graxos, tendo que obtê-los pela dieta.

Em ovinos, dietas ricas em PUFA alteraram a composição lipídica de células da granulosa e de oócitos, além de aumentar a concentração de progesterona no fluido folicular (Wonnacott, et al., 2010). Em relação a aplicação desses PUFA no meio de MIV, a suplementação com ácidos graxos melhorou as taxas de blastocistos em bovinos (Lapa, et al., 2011). No entanto, a suplementação do meio de MIV com ácidos graxos demonstra que as taxas de maturação variam conforme a concentração usada, sendo que concentrações superiores as encontradas no fluido

folicular podem ser prejudiciais (Carro, et al., 2013). Assim, o resultado depende do tipo de ácido graxo e da concentração em que os oócitos serão expostos (Aardema, et al., 2011).

Em bovinos, há um aumento das taxas de MII com 50 μ M de ácido linolênico, já concentrações maiores demonstraram inibição da expansão do *cumulus* (Marei, et al., 2009). Resultados semelhantes foram demonstrados em ovinos com esse mesmo ácido graxo (Ghaffarilaleh, Nashta e Paramio, 2014).

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A adição de EPA e DHA ao meio de maturação *in vitro* irá contribuir para melhores taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar as taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos obtidas com a adição de DHA e de EPA ao meio de maturação.

3.3 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de EPA e DHA sobre a taxa de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos;
- Avaliar se existe efeito de toxicidade do EPA e DHA durante a maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos.

4 CAPÍTULOS

4.1.1 Material e métodos

4.1.1.1 Reagentes químicos

Todos produtos químicos e reagentes utilizados no presente trabalho foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company®, a menos que esteja indicado de outra forma.

4.1.1.2 Coleta e maturação *in vitro* dos CCO

Ovários de fêmeas suínas pré-púberes foram coletados nos frigoríficos Castro e Bonsul na cidade de Pelotas-RS. Os ovários foram transportados em solução de NaCl 0,9% aquecida a 35°C para o laboratório ReproPel, da Faculdade de Veterinária da UFPel. Após os ovários terem sido lavados com NaCl 0,9% a 35°C, estes foram colocados em frascos de vidro e mantidos em banho-maria com temperatura constante.

Folículos com 3 a 6 mm de diâmetro foram aspirados com agulha calibre 18G acoplada ao sistema de bomba de vácuo. O líquido folicular aspirado foi colocado em tubos cônicos de 15 mL, que foram mantidos em banho-maria por 10 minutos para sedimentação.

Para a recuperação dos CCO, o sobrenadante foi retirado e centrifugado por 3 min a 5000 rpm. O FFS recém aspirado foi centrifugado e colocado em placas de Petri juntamente com o sedimento restante do tubo cônico.

Os CCO foram selecionados e lavados por duas vezes no meio de maturação TCM-199 HEPES, em uma capela de fluxo laminar e usando estereoscópio (aumento entre 10 a 60x). O meio de maturação foi constituído de TCM-199 (Gibco Life Technologies) suplementado com 0,57 mM de cisteína, 0,91 mM de piruvato de sódio, 10 ng/mL de EGF, 0,5µg/mL de LH, 0,5µg/mL de FSH e 0,1% de PVA (Casillas, et al., 2014). Foram selecionados somente CCO apresentando oócitos com citoplasma homogêneo e células do *cumulus oophorus* compactas (Wurth e Kriup, 1992).

Em torno de 30 CCO foram maturados em cada poço de uma placa de quatro poços (Nunc®) contendo 400µL de meio. Os CCO foram incubados por 44 h a 38,5°C, em 5% de CO₂ em ar com umidade saturada. Após 22 h, os CCO foram trocados para outra placa, sem a inclusão de gonadotrofinas no meio de maturação.

Para a suplementação do meio de maturação foi utilizado FFS coletado de folículos com 3 a 6 mm de diâmetro, aspirados de ovários de fêmeas púberes, seguindo o mesmo procedimento descrito acima. O pool de FFS foi centrifugado, fracionado e mantido a -20°C até o momento do uso.

4.1.1.3 Delineamento experimental

Para avaliar o efeito de DHA e EPA sobre a maturação oocitária, o meio foi suplementado com três diferentes concentrações de cada PUFA: 50µM; 100µM (Al Darwich, et al., 2010); e 150µM. Ambos os PUFA foram diluídos em etanol (Manickam, et al., 2010), acondicionado em botijão de nitrogênio líquido até o momento do uso. O grupo controle foi suplementado com 10% FFS.

Os quatro tratamentos foram distribuídos entre os poços em uma placa de quatro poços.

4.1.1.4 Avaliações da maturação nuclear

Após o período de maturação, os oócitos foram desnudados por pipetagem e lavados duas vezes em PBS, fixados por 20 minutos em paraformaldeído e lavados novamente mais duas vezes em PBS.

Os oócitos foram corados com 30µg/mL de Hoechst 33342 por 15 minutos (Uhm, et al., 2007). Após, foram colocados em lâminas de vidro e lamínulas, para avaliação da taxa de maturação nuclear, através de microscopia de epifluorescência. Os oócitos foram classificados segundo a disposição do material genético, nas seguintes categorias:

a) Vesícula Germinativa (VG): núcleo definido, com ou sem nucléolo, sem condensação da cromatina;

b) Quebra de vesícula (QVG): núcleo desintegrado e cromossomos condensados;

c) Metáfase I (MI): cromossomos formando a placa equatorial;

d) Metáfase II (MII): cromossomos na placa equatorial com o primeiro corpúsculo polar já exteriorizado.

Apenas oócitos classificados na categoria MII foram considerados maturados. Para a avaliação do efeito dos ácidos graxos foram avaliados 1206 oócitos para o tratamento EPA (8 rotinas) e 1339 oócitos para o tratamento DHA (11 rotinas).

Posteriormente, foram realizadas 2 rotinas de MIV (n = 551) onde os oócitos foram alocados em meios de maturação suplementados com EPA e DHA, ambos na concentração de 50 µM, sendo comparados com o meio controle suplementado com FFS (10%) e com AMP cíclico (20 µM) como bloqueador da meiose.

4.1.1.5 Análise estatística

O percentual de oócitos nas categorias de VG, QVG, MI e MII foi calculado para cada poço. As frequências médias calculadas para todas as categorias, após a conclusão de todas as rotinas, foram comparadas entre os tratamentos através de análise de variância de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos (Statistix®, 2013).

4.1.2 Resultados

As taxas de MII observadas com inclusão de EPA no meio de maturação foram diferentes ($P > 0,05$) em comparação ao controle a partir de 100 µM (Tabela 1). A taxa de VG a partir de 50 µM foi superior à observada para o controle ($P < 0,05$). As taxas de QVG a partir da concentração de 100 µM e de MI com 100 µM e 50 µM também foram superiores às taxas do controle. Do total de 1216 oócitos, 0,82% apresentaram-se degenerados.

Tabela 1: Taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos após 44 h em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido eicosapentaenoico (EPA)

Tratamentos	N	Estágios de meiose*			
		VG	QVG	MI	MI
FFS	302	$5,9 \pm 3,3^B$	$9,5 \pm 4,4^B$	$7,4 \pm 3,8^B$	$76,3 \pm 2,8^A$
EPA 50µM	303	$25,6 \pm 11,4^A$	$20,0 \pm 6,7^{AB}$	$28,8 \pm 11,3^A$	$25,0 \pm 22,5^{AB}$
EPA 100µM	300	$28,0 \pm 11,4^A$	$29,7 \pm 14,4^A$	$21,5 \pm 9,0^A$	$19,6 \pm 25,0^B$

EPA 150µM 301 25,3 ± 12,3^A 34,6 ± 14,7^A 19,6 ± 8,2^{AB} 19,2 ± 24,4^B

*VG = Vesícula germinativa; QVG = Quebra da vesícula germinativa; MI= Metáfase I;

MII = Metáfase II; FFS = Fluído folicular suíno

^{A,B}: Frequências (média ± DP) com expoentes distintos nas colunas (P < 0,05)

Com inclusão de DHA, as taxas de MII observadas nas concentrações a partir de 50µM foram inferiores (P < 0,05) às observadas no controle (Tabela 2). A taxa de MI no controle foi inferior às taxas observadas com todas as concentrações de DHA (P < 0,05). As taxas de VG e QVG no controle foram menores (P < 0,05) que as taxas observadas com DHA nas concentrações de 100 e 150 µM. De um total de 1355 oócitos avaliados, 1,18% apresentaram-se degenerados.

Tabela 2: Taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos após 44 h em meio suplementado com diferentes concentrações de ácido docosahexaenoico (DHA)

Tratamentos	N	Estágios de meiose*			
		VG	QVG	MI	MI
FFS	336	4,2 ± 2,1 ^B	9,4 ± 5,0 ^B	8,5 ± 5,0 ^B	77,3 ± 2,5 ^B
DHA 50µM	338	16,9 ± 11,3 ^{AB}	23,9 ± 3,9 ^{AB}	33,6 ± 22,3 ^A	24,3 ± 31,0 ^A
DHA 100µM	332	26,6 ± 12,1 ^A	28,9 ± 8,6 ^A	26,6 ± 11,2 ^A	16,3 ± 22,9 ^A
DHA 150µM	333	23,8 ± 10,2 ^A	32,0 ± 10,3 ^A	27,9 ± 10,3 ^A	15,9 ± 20,4 ^A

*VG = Vesícula germinativa; QVG = Quebra da vesícula germinativa; MI= Metáfase I;

MII = Metáfase II; FFS = Fluído folicular suíno

^{A,B}: Frequências (média ± DP) com expoentes distintos nas colunas (P < 0,05)

As taxas de maturação com inclusão de 50 µM de EPA e DHA foram semelhantes (P > 0,05) as observadas com inclusão de FFS e AMPc (Tabela 3). Além disso, de um total de 562 oócitos que foram avaliados, 1,96% apresentaram-se degenerados.

Tabela 3: Taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos após 44 h em meio suplementado com os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) e AMPc.

Tratamentos	N	Estágios de meiose*			
-------------	---	---------------------	--	--	--

		VG	QVG	MI	MII
FFS	130	4,1 ± 3,8	13,7 ± 2,6	7,6 ± 1,2	73,9 ± 0,9
AMPc	138	4,4 ± 0,2	12,4 ± 1,5	26,0 ± 3,0	55,8 ± 1,3
EPA 50µM	141	14,7 ± 6,0	28,6 ± 13,0	43,8 ± 14,1	7,9 ± 3,6
DHA 50µM	142	20,1 ± 9,4	27,4 ± 2,8	41,7 ± 4,3	10,2 ± 8,8

*VG = Vesícula germinativa; QVG = Quebra da vesícula germinativa; MI= Metáfase I;

MII = Metáfase II; FFS = Fluído folicular suíno

Frequências (média ± EP) não diferem (P > 0,05)

Além desses resultados, pode ser observado que durante as 44h de maturação *in vitro* os CCO que foram tratados com ambos ácidos graxos apresentavam uma degradação de suas camadas de células de *cumulus oophorus*, sendo que conforme as concentrações aumentam, essa observação morfológica tornava-se mais evidente.

4.1.3 Discussão

Este é o primeiro estudo a identificar redução nas taxas de maturação em oócitos suínos com inclusão de EPA e DHA no meio de maturação, contradizendo a hipótese de que a inclusão destes PUFA traria benefícios, ainda que PUFA, em geral, sejam indispensáveis para o oócito, gerando ATP necessário para o seu desenvolvimento (Dunning, Russel e Robker, 2014). Segundo Jia, et al. (2014), o ácido linoleico, PUFA diferentes daqueles testados no presente estudo, não apresentam efeito prejudicial para os oócitos, evidenciando algum benefício para as taxas de MIV de oócitos suínos, porém utilizando concentrações inferiores às testadas nesse trabalho. Em relação aos ovinos, concentrações acima de 100 µM de DHA resultaram em redução na taxa de MII (Ghaffarilaleh, Nashta e Paramio, 2014), associando concentrações mais elevadas com queda na taxa de MII, evidenciando associações negativas entre a inclusão de PUFA e a maturação nuclear, assim como o subsequente desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Leroy, et al., 2005; Marei, 2009, 2010; Jorritsma, 2004). Considerando que as taxas de MIV observadas nos grupos controle com FFS são semelhantes as encontradas em outros trabalhos (Tatemoto, et al., 2004; Yoon, et al., 2015), as reduzidas taxas

de MIV observadas com ambos os PUFA em todas as concentrações testadas sugerem um efeito tóxico.

Neste trabalho, o possível efeito tóxico pode ser visto a partir da concentração de 50 μ M, apresentando dados significativos em ambos ácidos graxos. Em relação ao AMPc, mesmo havendo bloqueio da meiose durante as primeiras 22h, as taxas de MIV foram em torno de 55%. Apesar de não haver diferença significativa, as taxas de MIV obtidas com os PUFA em qualquer concentração foram muito inferiores. Essas taxas abaixo do esperado podem ser justificadas, pois as concentrações empregadas estão muito acima das encontradas no fluido folicular de suínos (McEvoy, et al., 2000). De acordo com Paczkowski, Strauss e Krisner (2011) testando o efeito de outro PUFA (ácido palmítico) em oócitos de ratos, houve inibição da maturação, da clivagem e do desenvolvimento embrionário de oócitos das ratas. Este fato sugere que os oócitos não utilizam eficientemente o ácido graxo do meio externo, mesmo com níveis baixos.

Também é possível que as taxas insatisfatórias de MIV observadas com a inclusão de EPA e DHA tenham sido consequência da forma com a qual os ácidos graxos foram diluídos. Outros trabalhos utilizam o DMSO como diluente para outros ácidos graxos ao invés do etanol, obtendo taxas de MIV inferiores com inclusão de PUFA nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M (Marei, et al., 2009; Ghaffarilaleh, et al., 2014). Com isso, a diluição em etanol pode ter prejudicado as taxas de MII, auxiliando na toxicidade observada desde a concentração mais baixa de 50 μ M. O conjunto de nossos resultados sugere que futuros trabalhos testem a inclusão de EPA e DHA em concentrações menores ou com outras formas de diluição, para esclarecer os mecanismos relacionados com o seu potencial efeito tóxico.

4.1.4 Conclusão

A inclusão de ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) no meio de maturação resultou na redução nas taxas de maturação nuclear *in vitro* de oócitos suínos. Existem evidências de toxicidade com a inclusão de EPA e DHA nos meios de maturação a partir da concentração de 50 μ M.

5. REFERÊNCIAS

- 417 Aardema, H., Vos, P. L., Lolicato, F., Roelen, B. A., Knijn, H. M., Vaandrager, A. B. &
 418 Gadella, B. 2011. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on
 419 bovine oocyte developmental competence. *Biology of Reproduction*, 85(1), 62-69.
 420
- 421 Al Darwich, A., Perreau, C., Petit, M. H., Papillier, P., Dupont, J., Guillaume, D. &
 422 Guignot, F. 2010. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression. And
 423 AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. *Prostaglandins & Other*
 424 *Lipid Mediators*, 93(1), 30-36.
 425
- 426 Ali, A., Benkhalifa, M. & Miron, P. 2006. In-vitro maturation of oocytes: biological
 427 aspects: biological aspects. *Reproductive Biomedicine Online*, 13(3), 437-446.
 428
- 429 Areekijseeree, M. & Chuen-Im, T. 2012. Effects of porcine follicle stimulating hormone,
 430 luteinizing hormone and estradiol supplementation in culture medium on
 431 ultrastructures of porcine cumulus oocyte complexes (PCOCS). *Micron*, 43(2), 251-
 432 257.
 433
- 434 Assey, R. J., Hyttel, P., Greve, t. & Purwantara, B. 1994. Oocyte morphology in
 435 dominant and subordinate follicles. *Molecular Reproduction Development*, 37(3), 35-
 436 44.
 437
- 438 Barber, E., Sinclair, A. J. & Cameron-Smith, D. 2013. Comparative actions of ω -3
 439 fatty acids on in-vitro lipid droplet formation. *Prostaglandins, Leukotrienes and*
 440 *Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 89(5), 359-366.
 441
- 442 Barros, F. F. P. D. C., Teixeira, P. P. M., Vrisman, D. P., Macedo, M. F., Bezerra, M.
 443 B. & Vicente, W. R. R. 2015. Xenotransplante de tecido reprodutivo para
 444 conservação de gametas-revisão de literatura. *Agropecuária Científica no Semiárido*,
 445 10(4), 49-54.
 446
- 447 Bijttebier, J., Van Soom, A., Meyer, E., Mateusen, B. & Maes, D. 2008. Preovulatory
 448 follicular fluid during in vitro maturation decreases polyspermic fertilization of
 449 cumulus-intact porcine oocytes: in vitro maturation of porcine oocytes.
 450 *Theriogenology*, 70(4), 715-724.
 451
- 452 Bilodeau-Goeseels, S. 2003. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous
 453 nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology*,
 454 60(9), 1679-1690.
 455
- 456 Carro, M., Buschiazzi, J., Ríos, G. L., Oresti, G. M. & Alberio, R. H. 2013. Linoleic
 457 acid stimulates neutral lipid accumulation in lipid droplets of maturing bovine oocytes.
 458 *Theriogenology*, 79(4), 687-694.

- 459
- 460 Casillas, F., Teteltila-Silvestre, M., Ducolomb, Y., Lemus, A. E., Salazar, Z., Casas,
 461 E. & Betancourt, M. 2014. Co-culture with granulosa cells improve the in vitro
 462 maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock. *Cryobiology*,
 463 69(2), 299-304.
- 464
- 465 Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A. M. & Oh, J. S. 2012. Novel signaling mechanisms in
 466 the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular*
 467 *Endocrinology*, 356(1), 65-73.
- 468
- 469 Dai, J., Wu, C., Muneri, C. W., Niu, Y., Zhang, S., Rui, R. & Zhang, D. 2015.
 470 Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their
 471 impacts on apoptosis and developmental ability. *Cryobiology*, 71(2), 291-298.
- 472
- 473 Dang-Nguyen, T. Q., Somfai, T., Haraguchi, S., Kikuchi, K., Tajima, A., Kanai, Y. &
 474 Nagai, T. 2011. In vitro production of porcine embryos: current status, future
 475 perspectives and alternative applications. *Animal Science Journal*, 82(3), 374-382.
- 476
- 477 Do, L. T. K., Luu, V. V., Morita, Y., Taniguchi, M., Nii, M., Peter, A. T. & Otoi, T. 2015.
 478 Astaxanthin presente in the maturation médium reduces negative effects of heat
 479 shock on the developmental competence of porcine oocytes. *Reproductive Biology*,
 480 15(2), 86-93.
- 481
- 482 Duckworth, B. C., Weaver, J. S. & Rudeman, L. V. 2002. G2 arrest in *Xenopus*
 483 oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proceedings of*
 484 *the National Academy of Sciences*, 99(26), 16794-16799.
- 485
- 486 Dunning, K. R., Russell, D. L. & Robker, R. L. 2014. Lipids and oocyte developmental
 487 competence: the role of fatty acids and b-oxidation. *Reproduction*, 148(1), R15-R27.
- 488
- 489 Edry, I., Sela-Abramovich, S. & Dekel, N. 2006. Meiotic arrest of oocytes depends on
 490 cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Molecular and Celular*
 491 *Endocrinology*, 252(1), 102-106.
- 492
- 493 Fair, T., Hyttel, P. & Greve, T. 1995. Bovine oocyte diameter in relation to
 494 maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and*
 495 *Development*, 42(4), 437-442.
- 496
- 497 Ghaffarilaleh, V., Fouladi-Nashta, A. & Paramio, M. T. 2014. Effect of α -linolenic acid
 498 on oocyte maturation and embryo development of prepubertal sheep oocytes.
 499 *Theriogenology*, 82(5), 686-696.

500

501 Goren, S. & Dekel, N. 1994. Maintenance of meiotic by a phosphorylated p34cdc2 is
 502 independent of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *Biology of Reproduction*,
 503 51(5), 956-962.

504

505 Gulliver, C. E., Friend, M. A., King, B. J. & Clayton, E. H. 2012. The role of omega-3
 506 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Animal Reproduction
 507 Science*, 131(1), 9-22.

508

509 Grupen, C. G. 2014. The evolution of porcine embryo in vitro production.
 510 *Theriogenology*, 81(1), 24-37.

511

512 Humblot, P., Holm, P., Lonergan, P., Wrenzycki, C., Leguarré, A. S., Joly, C. G. &
 513 Callesen, H. 2005. Effect of stage of follicular growth during superovulation on
 514 developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, 63(4), 1149-1166.

515

516 Ito, M., Iwata, H., Kitagawa, M., Kon, Y., Kuwayama, T. & Monji, Y. 2008. Effect of
 517 follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear
 518 maturation and developmental competence of pig oocytes. *Animal Reproduction
 519 Science*, 106(3), 421-430.

520

521 Jorritsma, R., Cesar, M. L., Hermans, J. T., Kruitwagen, C. L. J. J., Vos, P. L. A. M. &
 522 Kruip, T. A. M. 2004. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells
 523 and developmental potential of oocytes in vitro. *Animal Reproduction Science*, 81(3),
 524 225-235.

525

526 Jia, B., Wu, G., Fu, X., Mo, X., Du, M., Hou, Y. & Zhu, S. 2014. Trans-10, cis-12
 527 conjugated linoleic acid enhances in vitro maturation of porcine oocytes. *Molecular
 528 Reproduction and Development*, 81(1), 20-30.

529

530 Jump, D. B. 2008. Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription.
 531 *Current Opinion in Lipidology*, 19(3), 242.

532

533 Kikuchi, K., Ekwall, H., Tienthai, P., Kawai, Y., Noguchi, J., Kaneko, H. & Rodriguez-
 534 Martinez, H. 2002. Morphological features of lipid droplet transition during porcine
 535 oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro.
 536 *Zygote*, 10(04), 355-366.

537

538 Kurlak, L. O. & Stephenson, T. J. 1999. Plausible explanations for effects of long
 539 chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) on neonates. *Archives of Disease in
 540 Childhood – Fetal Neonatal*, 80, 148-154.

541

542 Lapa, M., Marques, C. C., Alves, S. P., Vasques, M. I., Baptista, M. C., Carvalhais, I.,
 543 Silva, M. P., Horta, A. E., Bessa, R. J. & Pereira, R. M. 2011. Effect of trans-10 cis-12
 544 conjugated linoleic acid bovine oocyte competence and fatty acid composition.
 545 *Reproduction Domestic Animals*, 46, 904-910.

546

547 Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., De
 548 Kruif, A. & Van Soom, A. 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy
 549 cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro.
 550 *Reproduction*, 130(4), 485-495.

551

552 Liu, L., Song, G., Gao, F., Guan, J., Tang, B. & Li, Z. 2012. Transient exposure to
 553 sodium butyrate after germinal vesicle breakdown improves meiosis but not
 554 developmental competence in pig oocytes. *Cell Biology International*, 36(5), 483-490.

555

556 Manickam, E., Sinclair, A. J. & Cameron-Smith, D. 2010. Suppressive actions of
 557 eicosapentaenoic acid on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids in*
 558 *Health and Disease*, 9(1), 57.

559

560 Marei, W. F., Wathes, D. C. & Fouladi-Nashta, A. A. 2009. The effect of linolenic acid
 561 on bovine oocyte maturation and development. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1064-
 562 1072.

563

564 Marei, W. F., Whates, D. C & Fouladi-Nashta, A. A. 2010. Impact of linoleic acid on
 565 bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction*, 139(6), 979-988.

566

567 McEvoy, T. G., Coull, G. D., Broadbent, P. J., Hutchinson, J. S. & Speake, B. K.
 568 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with
 569 intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118 (1), 163-170.

570

571 Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recente advances in
 572 understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*,
 573 130(6), 791-799.

574

575 Mermillod, P., Dalbies-Tran, R., Uzbekova, S., Thelie, A., Traverso, J. M., Perreau,
 576 C. & Monget, P. 2008. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle?.
 577 *Reproduction in domestic animals*, 43(S2), 393-400.

578

579 Nagashima, H., Da Cameron, R., Kuwayama, M., Young, M., Beebe, L., Blackshaw,
 580 A. & Nottle, M. 1999. Survival of porcine delipated oocytes and embryos after
 581 cryopreservation by freezing or vitrification. *Journal of Reproduction and*
 582 *Development*, 45(2), 167-176.

583

584 Nagashima, H., Matsunari, H., Nakano, K., Watanabe, M., Umeyama, K. & Nagaya,
585 M. 2012. Advancing pig cloning Technologies towards application in regenerative
586 medicine. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(S4), 120-126.

587

588 Niu, Y., Wang, C., Xiong, Q., Yang, X., Chi, D., Li, P. & Huang, R. 2015. Distribution
589 and content of lipid droplets and mitochondria in pig parthenogenetically activated
590 embryos after depilation. *Theriogenology*, 83(1), 131-138.

591

592 Ouandaogo, Z. G., Haouzi, D., Assou, S., Dechaud, H., Kadoch, I. J., De Vos, J. &
593 Hamamah, S. 2011. Human cumulus cells molecular signature in relation to oocyte
594 nuclear maturity stage. *PLoS ONE*, 6(11), e27179.

595

596 Paczkowski, M., Strauss, K. J. & Krischer, R. L. 2011. Fatty acid oxidation during in
597 vitro maturation of mouse oocytes is essential for subsequent embryo development.
598 *Fertility and Sterility*, 96(3), S60.

599

600 Pawlak, P., Cieslak, A., Warzych, E., Zejden, Z., Szumacher-Strabel, M., Molinska-
601 Glura, M. & Lechniak, D. 2012. No single way to explain cytoplasmic maturation of
602 oocytes from prepubertal and cyclic gilts. *Theriogenology*, 78(9), 2020-2030.

603

604 Peters, J. K., Milliken, G. & Davis, D. L. 2011. Development of porcine embryos in
605 vitro: effects of culture medium and donor age. *Journal of Animal Science*, 79(6),
606 1578-1583.

607

608 Prates, E. G., Marques, C. C., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Carolino, N., Horta, A.
609 E. M. & Pereira, R. M. 2012. Fat area and lipid droplet morphology of porcine oocytes
610 during in vitro maturation with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and forskolin.
611 *Animal*, 1A8.

612

613 Prates, E. G., Nunes, J. T. & Pereira, R. M. 2014. A role of lipid metabolism during
614 cumulus-oocyte complex maturation: impact of lipid modulators to improve embryo
615 production. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1-11.

616

617 Rath, D. & Niemann, H. 1997. In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and
618 frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical
619 boars. *Theriogenology*, 47(4), 785-793.

620

621 Romar, R., Coy, P., Campos, I., Gadea, J., Matas, C. & Ruiz, S. 2001. Effect of co-
622 culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro
623 fertilization. *Animal Reproduction Science*, 68(1), 85-98.

- 624
- 625 Romek, M., Gajda, B., Krzysztofowicz, E., Kepczynski, M. & Smorag, Z. 2011. New
626 technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and
627 pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology*, 75(1),
628 42-54.
- 629
- 630 Santos, E. C. S., Sato, D, Lucia, T. & Iwata. 2015. Brilliant cresyl blue staining
631 negatively affects mitochondrial functions in porcine oocytes. *Zygote*, 23(3), 352-359.
- 632
- 633 Sirard, M. A., Richard, F., Blodin, P. & Robert, C. 2006. Contribution of the oocyte to
634 embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136.
- 635
- 636 Somfai, T., Yoshioka, K., Tanihara, F., Kaneko, H., Noguchi, J., Kashiwazaki, N. &
637 Kikuchi, K. 2014. Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first
638 time using a defined system for in vitro embryo production. *PloS One*, 9(5), e97731.
- 639
- 640 Somfai, T. & Hirao, Y. 2011. Synchronization of in vitro maturation in porcine
641 oocytes. *Cell Cycle Synchronization: Methods and Protocols*, 211-225.
- 642
- 643 Statistix®. 2013. Statistix® 10 analytical software. Tallahassee, FL, EUA.
- 644
- 645 Stillwell, W. & Wassall, S. R. 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a
646 unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, 126(1), 1-27.
- 647
- 648 Sturmey, R. G. & Leese, H. J. 2003. Energy metabolism in pig oocytes and early
649 embryos. *Reproduction*, 126(2), 197-204.
- 650
- 651 Sur, J. H., Doster, A. R., Galeota, J. A. & Osorio, F. A. 2001. Evidence for the
652 localization of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)
653 antigen and RNA in ovarian follicles in gilts. *Veterinary Pathology Online*, 38(1), 58-
654 66.
- 655
- 656 Tanghe, S. & De Smet, S. 2013. Does sow reproduction and piglet performance
657 benefit from the addition of N-3 polyunsaturated fatty acids to the maternal diet?. *The*
658 *Veterinary Journal*, 197(3), 560-569.
- 659
- 660 Tatemoto, H., Muto, N., Sunagawa, I., Shinjo, A. & Nakada, T. 2004. Protection of
661 porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during in vitro
662 maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biology of*
663 *Reproduction*, 71(4), 1150-1157.
- 664

- 665 Tatone, C., Di Emidio, G., Vento, M., Ciriminna, R. & Artini, P. G. 2010.
 666 Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecological*
 667 *Endocrinology*, 26(8), 563-567.
- 668
- 669 Thibault, C., Szöllösi, D. & Gérard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation.
 670 *Reproduction Nutrition Development*, 27(5), 865-896.
- 671
- 672 Uhm, S. J., Gupta, M. K., Kim, T. & Lee, H. T. 2007. Expression of enhanced green
 673 fluorescent protein in porcine-and bovine-cloned embryos following interspecies
 674 somatic cell nuclear transfer of fibroblasts transfected by retrovirus vector.
 675 *Molecular Reproduction and Development*, 74(12), 1538-1547.
- 676
- 677 Uyar, A., Torrealday, S. & Seli, E. 2013. Cumulus and granulosa cell markers of
 678 oocyte and embryo quality. *Fertility and Sterility*, 99(4), 979-997.
- 679
- 680 Wonnacott, K. E., Kwong, W. Y., Hughes, J., Salter, A. M., Lea, R. G., Garnsworthy,
 681 P. C. & Sinclair, K. D. 2010. Dietary omega-3 and-6 polyunsaturated fatty acids affect
 682 the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos.
 683 *Reproduction*, 139(1), 57-69.
- 684
- 685 Yoon, J. D., Jeon, Y., Cai, L., Hwang, S. U., Lee, E. & Hyun, S. H. 2015. Effects of
 686 co-culture with cumulus-derived somatic cells on in vitro maturation of porcine
 687 oocytes. *Theriogenology* 83(2), 294-305.
- 688
- 689 Yoshida, M. I. T. S. U. T. O. S. H. I., Ishigaki, K. O. J. I, Nagai, T. A. K. U, Chikyu, M.
 690 I. K. I. O. & Pursel, V. G. 1993. Glutathione concentration during maturation and after
 691 fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male
 692 pronucleus. *Biology of Reproduction*, 49(1), 89-94.
- 693
- 694 Yoshioka, K. 2011. Development and application of a chemically defined medium for
 695 the in vitro production of porcine embryos. *Journal of Reproduction and*
 696 *Development*, 57(1), 9-16.
- 697
- 698 Zhang, W., Yi, K., Yan, H. & Zhou, X. 2012. Advances on in vitro production and
 699 cryopreservation of porcine embryos. *Animal Reproduction Science*, 132(3), 115-
 700 122.
- 701
- 702 Wuth, Y. A., Kriup, T. H. A. M. 1992 Bovine embryo production in vitro after selection
 703 of the follicles and oocytes. *Proceedings of the 12th International Congress on*
 704 *Animal Reproduction*, 1, 387-389.