



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JENNIFER CARDOSO COUTO

**A ADIÇÃO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) DURANTE A
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DIMINUI A EXPRESSÃO DO GENE SCD EM
OÓCITOS BOVINOS**

Presidente Prudente-SP
2019



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JENNIFER CARDOSO COUTO

**A ADIÇÃO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) DURANTE A
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DIMINUI A EXPRESSÃO DO GENE SCD EM
OÓCITOS BOVINOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciência animal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Caliê Castilho

Presidente Prudente - SP
2019

636.089
C871a

Couto, Jennifer Cardoso.

A Adição de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) durante a Maturação *In Vitro* (MIV) diminui a expressão do gene SCD em oócitos bovinos / Jennifer Cardoso Couto. – Presidente Prudente, 2020.

31f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Caliê Castilho

1. Palavras chave. 2. Palavras chave. 3. Palavras chave. I. Título.

JENNIFER CARDOSO COUTO

**A ADIÇÃO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) DURANTE A
MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DIMINUI A EXPRESSÃO DO GENE SCD EM
OÓCITOS BOVINOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciência animal.

Presidente Prudente, 26 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Caliê Castilho
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a Dr^a Sheila Merlo Garcia Fieretti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a Dr^a Claudia Maria Bertan Membrive
Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- UNESP
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas
Dracena-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que me fizeram acreditar que seria possível chegar aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter permitido e me dado forças para conseguir chegar aqui. Agradeço à minha família que com tão pouco fizeram grandes coisas por mim e acreditaram que eu poderia vencer. Agradeço em especial à minha orientadora Caliê Castilho, por todo o ensinamento, a paciência e atenção para comigo, além de sempre ter me dado forças e motivação para que eu pudesse concluir este feito. Também é imenso meu agradecimento a instituição de ensino UNOESTE, ao programa de pós-graduação em Ciência Animal e à CAPES pelo apoio financeiro. E a toda a equipe de pesquisa que tanto contribuíram para que tudo pudesse ser realizado.

*“Apenas podemos saber que não sabemos nada.
“E este é o mais alto grau de sabedoria humana” (Leon Tolstoi).*

RESUMO

A adição de ácido linoleico conjugado (CLA) durante a maturação *in vitro* (MIV) diminui a expressão do gene SCD em oócitos bovinos

Um dos grandes entraves da produção *in vitro* de embriões (PIVE) é a criopreservação dos embriões, uma vez que a taxa de prenhes se apresenta reduzida após esse processo. Sugere-se que este comprometimento decorra do acúmulo de lipídios resultante do uso de soro fetal bovino (SFB) nos meios de cultivo *in vitro*. A adição de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), sobretudo o ácido linoleico (CLA) nos meios de cultivo *in vitro* de oócitos e embriões tem demonstrado resultados promissores na redução dos lipídios. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito da adição de ácido linoléico conjugado CLA no meio de maturação *in vitro* (MIV) na presença de soro fetal bovino (SFB), sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Os oócitos de ovários coletados em abatedouro foram aspirados, selecionados e a seguir separados em dois grupos experimentais para a maturação: MIV (controle) e MIV + CLA. Após o período de maturação, foram investigados os padrões de expressão dos genes (FADS2, GREM1, SCD, SREBP1, AREG, COX2) em oócitos e células do *cumulus*. Houve menor ($p < 0,05$) expressão gênica do SCD em oócitos maturados na presença de CLA ($0,63 \pm 0,12$) quando comparada ao grupo controle ($1,04 \pm 0,15$), já nas células do *cumulus* não houve efeito neste gene. A adição de CLA não influenciou ($p > 0,05$) a expressão dos outros genes avaliados (FADS2, GREM1, SREBP1, AREG, COX2) no oócito ou nas células do *cumulus*. Concluímos assim que, a adição de CLA em meios de cultivo pode ser uma alternativa para melhorar a maturação *in vitro*, pois diminui a expressão do gene SCD, que está relacionado ao metabolismo lipídico em oócitos bovinos.

Palavras-Chaves: Ácido graxo poli-insaturado. Criopreservação. Gene S. CD. Soro fetal bovino. Vacas zebuínas

ABSTRACT

The addition of conjugated linoleic acid (CLA) during in vitro maturation (IVM) decreases the expression of the SCD gene in bovine oocytes

One of the major obstacles to in vitro embryo production (PIVE) is the cryopreservation of embryos, since the rate of pregnancies is reduced after this process. It is suggested that this impairment results from the accumulation of lipids resulting from the use of fetal bovine serum (SFB) in in vitro culture media. The addition of polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially linoleic acid (CLA) in the in vitro culture medium of oocytes and embryos has shown promising results in reducing lipids. Thus, the objective was to evaluate the effect of adding conjugated linoleic acid CLA to the in vitro maturation medium (IVM) in the presence of fetal bovine serum (SFB), on the expression of genes related to lipid metabolism. The oocytes from ovary collected in the slaughterhouse were aspirated, selected and then separated into two experimental groups for maturation: MIV (control) and MIV + CLA. After the maturation period, gene expression patterns (FADS2, GREM1, SCD, SREBP1, AREG, COX2) in oocytes and cumulus cells were investigated. There was less ($p < 0.05$) SCD gene expression in oocytes matured in the presence of CLA (0.63 ± 0.12) when compared to the control group (1.04 ± 0.15), whereas in *cumulus* cells there was no effect on this gene. The addition of CLA did not influence ($p > 0.05$) the expression of the other evaluated genes (FADS2, GREM1, SREBP1, AREG, COX2) in the oocyte or in the *cumulus* cells. We conclude, therefore, that the addition of CLA in culture media may be an alternative to improve maturation in vitro, since it reduces the expression of the SCD gene, which is related to lipid metabolism in bovine oocytes.

Keywords: Polyunsaturated fatty acid. Cryopreservation. SCD gene. Fetal calf serum. Zebu cows.

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
ANEXO – NORMAS DE PUBLICAÇÃO.....	26

1 **ARTIGO CIENTÍFICO**

2

3 **A adição de ácido linoleico conjugado (CLA) durante a maturação *in vitro* (MIV) diminui a**
4 **expressão de gene SCD em oócitos bovinos**

5

6 *The addition of conjugated linoleic acid (CLA) during in vitro maturation (IVM) decreases the*
7 *expression of the SCD gene in bovine oocytes*

8

9 Jennifer Cardoso Couto¹; Adriano Felipe Mendes²; Gabriela Azenha Milani Soriano³; Anthony
10 Castilho⁴; Ines Cristina Giometti⁵; Lauren Chrys Soato Marin Schaffer⁶, Caliê Castilho^{7*};

11

12 Autor para correspondência *:

13 Rodovia Raposo Tavares, km 572, Bairro Limoeiro, Presidente Prudente (SP), Brasil.

14 E-mail: calie@unoeste.br

15 Fone: 55-18-3229-2033 / Fax: 55-18-2007.

16

17 **RESUMO**

18 Um dos grandes entraves da produção *in vitro* de embriões (PIVE) é a criopreservação dos embriões,
19 uma vez que a taxa de prenhes se apresenta reduzida após esse processo. Sugere-se que este
20 comprometimento decorra do acúmulo de lipídios resultante do uso de soro fetal bovino (SFB) nos
21 meios de cultivo *in vitro*. A adição de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), sobretudo o ácido
22 linoleico (CLA) nos meios de cultivo *in vitro* de oócitos e embriões tem demonstrado resultados
23 promissores na redução dos lipídios. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito da adição de ácido
24 linoléico conjugado CLA no meio de maturação *in vitro* (MIV) na presença de soro fetal bovino (SFB),
25 sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico. Os oócitos de ovários coletados
26 em abatedouro foram aspirados, selecionados e a seguir separados em dois grupos experimentais
27 para a maturação: MIV (controle) e MIV + CLA. Após o período de maturação, foram investigados os

28 padrões de expressão dos genes (FADS2, GREM1, SCD, SREBP1, AREG, COX2) em oócitos e células do
29 *cumulus*. Houve menor ($p < 0,05$) expressão gênica do SCD em oócitos maturados na presença de CLA
30 ($0,63 \pm 0,12$) quando comparada ao grupo controle ($1,04 \pm 0,15$), já nas células do *cumulus* não houve
31 efeito neste gene. A adição de CLA não influenciou ($p > 0,05$) a expressão dos outros genes avaliados
32 (FADS2, GREM1, SREBP1, AREG, COX2) no oócito ou nas células do *cumulus*. Concluímos assim que, a
33 adição de CLA em meios de cultivo pode ser uma alternativa para melhorar a maturação *in vitro*, pois
34 diminui a expressão do gene SCD, que está relacionado ao metabolismo lipídico em oócitos bovinos.

35 **Palavras-Chaves:** Ácido graxo poli-insaturado. Criopreservação. Gene SCD. Soro fetal bovino. Vacas
36 zebuínas.

37

38 **ABSTRACT**

39 One of the major obstacles to in vitro embryo production (PIVE) is the cryopreservation of embryos,
40 since the rate of pregnancies is reduced after this process. It is suggested that this impairment results
41 from the accumulation of lipids resulting from the use of fetal bovine serum (SFB) in in vitro culture
42 media. The addition of polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially linoleic acid (CLA) in the in vitro
43 culture medium of oocytes and embryos has shown promising results in reducing lipids. Thus, the
44 objective was to evaluate the effect of adding conjugated linoleic acid CLA to the in vitro maturation
45 medium (IVM) in the presence of fetal bovine serum (SFB), on the expression of genes related to lipid
46 metabolism. The oocytes from ovary collected in the slaughterhouse were aspirated, selected and
47 then separated into two experimental groups for maturation: MIV (control) and MIV + CLA. After the
48 maturation period, gene expression patterns (FADS2, GREM1, SCD, SREBP1, AREG, COX2) in oocytes
49 and cumulus cells were investigated. There was less ($p < 0.05$) SCD gene expression in oocytes
50 matured in the presence of CLA (0.63 ± 0.12) when compared to the control group (1.04 ± 0.15),
51 whereas in *cumulus* cells there was no effect on this gene. The addition of CLA did not influence ($p >$
52 0.05) the expression of the other evaluated genes (FADS2, GREM1, SREBP1, AREG, COX2) in the
53 oocyte or in the *cumulus* cells. We conclude, therefore, that the addition of CLA in culture media may
54 be an alternative to improve maturation in vitro, since it reduces the expression of the SCD gene,
55 which is related to lipid metabolism in bovine oocytes.

56 **Keywords:** Polyunsaturated fatty acid. Cryopreservation. SCD gene. Fetal calf serum. Zebu cows.

57

58 INTRODUÇÃO

59 A sensibilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIVE) à congelação ou vitrificação é
60 o principal obstáculo à expansão da tecnologia de criopreservação (LEÃO et al, 2015). A presença do
61 soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo aumenta a concentração de lipídios no citoplasma dos
62 blastômeros e está diretamente ligado à sensibilidade dos embriões produzidos *in vitro* à
63 criopreservação (RAHME, 2012). No entanto, a substituição total do SFB por outras fontes proteicas
64 resulta em baixas taxas de produção embrionária (DUQUE et al., 2003), pois o soro contém
65 substâncias que são benéficas para o desenvolvimento embrionário (LEÃO et al, 2015).

66 Desta forma o grande intuito das pesquisas atuais é desenvolver um sistema de produção
67 eficiente que gere embriões criotolerantes e a adição de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) aos
68 meios de cultivo *in vitro* tem demonstrado efeitos promissores. Entre estes AGPI, destacamos o ácido
69 linoleico conjugado (CLA) que adicionado ao meio de cultivo de embriões contendo soro fetal bovino
70 (SFB), reduz o acúmulo de lipídios embrionários e melhora significativamente a sobrevivência pós-
71 criopreservação.

72 A adição de AGPI diretamente no meio de cultivo *in vitro* de oócitos visa contribuir com o
73 metabolismo lipídico, melhorando assim, a qualidade oocitária (MAREI; WHATES; FOULADI-NASHTA,
74 2009; LAPA et al., 2011; AARDEMA et al, 2017). Os AGPI são armazenados como gotículas lipídicas e
75 agem na estrutura das membranas celulares, destacando-se que o metabolismo lipídico é
76 fundamental para o Complexo *cumulus ophorus* (COC) e o processo de degradação dos ácidos graxos
77 é importante para a maturação oocitária (DUNNING et al., 2010). Por meio dos oócitos, as células do
78 *cumulus* conseguem regular a captação dos ácidos graxos durante a MIV (LOLICATO et al., 2015).

79 A adição de 100 µM de CLA em meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos não
80 alterou a maturação do oócito nem as taxas de produção de blastocitos, mas aumentou a
81 porcentagem de sobrevivência embrionária após o descongelamento dos embriões vitrificados (LEÃO
82 et al., 2015).

83 A análise da expressão gênica é uma ferramenta metodológica para inferir funcionalidade
84 dos processos biológicos (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004; SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST;
85 THOMPSON, 2010). As proteínas cicloxigenase-2 e gremlin, codificadas pelos genes COX2 e GREM1,
86 respectivamente agem no reinício do ciclo meiótico, estimulando a expansão das células do *cumulus*
87 (SHIMADA et al., 2006). A Anfiregulina é um fator de crescimento codificado pelo gene AREG, que
88 atua na regulação da ovulação e expansão das células do *cumulus* (ROMERO; SMITZ, 2009). A

89 proteína 1 de ligação do elemento regulatório de esterol codificada pelo gene, a enzima Esteroil-
90 CoA Dessaturase codificada pelo gene SCD e a dessaturase de ácidos graxos codificadas pelo gene
91 FADS2, apresentam papel fundamental no metabolismo lipídico através da transcrição de genes
92 responsáveis pela síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002) e
93 conversão de ácidos graxos saturados em monoinsaturados, alterando assim a composição dos
94 fosfolipídios e consequentemente a fluidez das membranas (NTAMBI; MIYAZAKI, 2003). O CLA possui
95 ação inibidora na expressão de genes codificadores de enzimas responsáveis pela lipogênese,
96 resultando em menor depósito lipídico intracelular nas células, melhorando o processo de
97 criopreservação (HOCHI; KIMURA; HANADA, 1999; PEREIRA et al, 2007; PEREIRA; CARVALHAIS;
98 PIMENTA, 2008; RAHME, 2012).

99 Diante deste contexto, nós estudamos a expressão de genes relacionados com o
100 metabolismo lipídico em complexos *cumulus oophorus* (COC`s) maturados, suplementado com ácido
101 linoleico conjugado (CLA) na presença de soro fetal bovino (SFB).

102

103 MATERIAL E MÉTODOS

104

105 *Obtenção dos Oócitos*

106 O experimento foi realizado com ovários de fêmeas bovinas, predominantemente da raça
107 Nelore, provenientes de abatedouro. Os ovários foram coletados e imediatamente transportados
108 para o laboratório, em um recipiente térmico contendo solução fisiológica (0,9% NaCl) previamente
109 aquecida à 37°C, sendo os ovários manipulados em até 2 horas. Os oócitos foram, aspirados,
110 selecionados e colocados para maturar *in vitro* (MIV). Os grupos experimentais foram Grupo 1: G-
111 MIV (meio de maturação padrão, controle) e Grupo 2:G-MIV + CLA (suplementado com 100 µM de
112 CLA), foram feitas 5 repetições com 20 COC's para cada grupo.

113

114 *Maturação in vitro (MIV)*

115 A aspiração folicular foi realizada com agulha 40x12 acoplada à seringa de 10 mL para obter o
116 fluido folicular que em seguida foi transferido para tubos Falcon mantido em decantação por 15
117 minutos em banho maria a 35°C. O sedimento era depositado em placas de Petri para recuperação e

118 classificação dos oócitos com auxílio de uma lupa esteromicroscópica (Forty, American Optical
119 Corporation) com aumento de 4,5x. A classificação adotada foi de acordo com Goodhand et al.
120 (1999) que considera quatro graus de qualidade: I – Complexo *cumulus* presente contendo mais de
121 três camadas de células; II – Complexo *cumulus* parcialmente compacto em volta do oócito com
122 menos de três camadas de células; III – Complexo *cumulus* com apenas uma camada de célula; IV -
123 Desnudo (D) – Ausência de camadas celulares de *cumulus* ao redor do oócito.

124 Apenas oócitos graus I e II, foram utilizados no presente estudo. Até 20 oócitos foram
125 depositados em cada gota contendo 100µL de meio de maturação contendo TCM-199 (M-3769,
126 Sigma Co., St. Louis, EUA), 2,2 mg/mL de solução de bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de piruvato de
127 sódio, 50 µg/mL de sulfato de gentamicina suplementado com 1 µg/mL de FSH (Folltropin®-V
128 Bioniche, Inc., Canadá), 5 µg / mL de LH (Lutropin® Bioniche, Inc., Canadá) e 10% de soro fetal
129 bovino(SFB) (Nutricell Ltda, Brasil). As placas de Petri foram incubadas à temperatura de 39°C em
130 atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar e com máxima umidade por um período de 22 horas a 24
131 horas. Optamos por usar 10% de SFB ao invés de BSA (albumina sérica bovina) visando mimetizar as
132 condições de cultivo in vitro, rotineiramente utilizadas em laboratórios comerciais de PIVE.

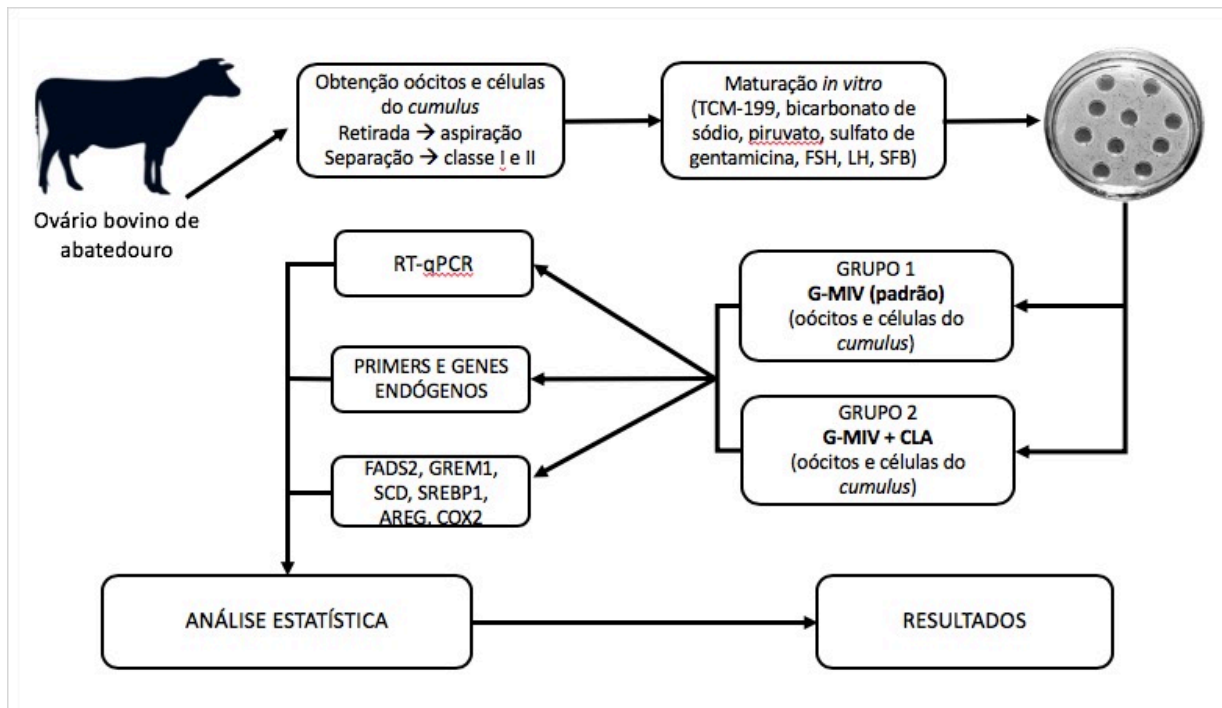
133

134 *Preparação para a expressão gênica*

135 Após o período de maturação, para avaliar o padrão de expressão dos genes dessaturase de
136 ácidos graxos (FADS2), gremlin (GREM1), Esteroil-CoA Dessaturase (SCD), fator de transcrição de
137 ligação ao elemento regulador de esteroil 1 (SREBP1), Anfiregulina (AREG), ciclo-oxigenase-2 (COX2)
138 nos oócitos e nas células do *cumulus*, as amostras foram processadas como descrito a seguir: os
139 oócitos foram pipetados e separados dos COC's maturados, passando por meio de lavagem de 60 a
140 100 ul para que se soltassem das células do *cumulus*. Após esta etapa, os oócitos foram pipetados
141 em microtubos com 30ul de meio de lavagem e colocados no vórtex em velocidade 5 por 1 minuto.
142 Em seguida, acrescentou-se 500 ul de meio de lavagem e este conteúdo foi posto na placa para
143 visualização em Lupa. Foi feita a separação de 20 oócitos e estes foram congelados à temperatura de
144 -80°C. Para as células do *cumulus*, foram pipetados e separados dos oócitos maturados
145 acrescentando 100ul de meio de lavagem e centrifugados durante 5 minutos a 10.000 rpm. Foram
146 retirados através de pipeta os sobrenadantes, restando apenas os pellets nos microtubos. Em
147 seguida, foram congelados à temperatura de -80°C.

148 A figura 1 exemplifica o delineamento experimental do presente experimento.

149



150

151

152 Figura 1. Delineamento experimental com as etapas envolvimentos para a obtenção dos resultados
 153 apresentados.

154

155 *Análise da Expressão Gênica*

156 Em primeiro momento as amostras foram submetidas à extração de RNA, através do
 157 PicoPure™ RNA Isolation Kit (AppliedBiosystems™) conforme instruções do fabricante.
 158 Posteriormente, foi mensurada a concentração total de RNA através da espectrofotometria usando
 159 um Nanodrop (ND-2000®).

160 O RNA total das amostras (1µg) foi incubado com DNase (1U / µg; Invitrogen, Carlsbad, CA,
 161 EUA) afim de evitar contaminações com DNA genômico e em seguida foi realizada a transcrição
 162 reversa por meio de um primer aleatório de acordo com o protocolo fornecido pelas instruções do
 163 High Capacity Kit (AppliedBiosystems, Foster City , CA, EUA).

164 A análise RT-qPCR foi realizada para os seguintes genes alvo: FADS2, GREM1, SCD, SREBP1,
 165 AREG e COX2 através do QuantStudio™ 7 Flex utilizando o sistema Power Sybr® Green PCR Master

166 Mix (Applied Biosystems). A abundância de mRNA de genes-alvo foi avaliada com um volume total de
 167 reação de 25 μ L, com 1,0 μ L de cada amostra e 24 μ L de primers de acordo com os métodos de genes
 168 para manutenção e para os genes-alvo. Os ciclos térmicos foram de 95°C por um tempo de 10
 169 minutos, seguindo assim 40 ciclos de desnaturação a 95 durante 10 segundos, o emparelhamento e
 170 extensão por 1 minuto, com diferentes temperaturas utilizadas para diferentes genes. Suas ações
 171 foram otimizadas para fornecer a máxima eficiência de amplificação para cada gene. A especificidade
 172 de cada produto de PCR foi determinada por análise de curva de fusão. Cada amostra foi analisada
 173 em duplicado e controles negativos foram executados para cada placa (Tabela 1).

174 Para escolher o gene de referência mais estável para analisar os oócitos e células do
 175 *cumulus*, os perfis de amplificação de PPIA (*Peptidylprolyl Isomerase A*), GAPDH (*Glyceraldehyde-3-*
 176 *Phosphate Dehydrogenase*) e RPL15 (*Ribosomal Protein L15*) foram comparados utilizando o geNorm
 177 applet para Microsoft Excel (medgen.ugent.be/genorm). O gene *housekeeping* mais estável para os
 178 oócitos e células do *cumulus* foi o PPIA. O método $\Delta\Delta$ Ct com correção de eficiência foi utilizado para
 179 calcular os valores relativos de expressão (genes alvo/PPIA) para cada gene alvo, usando uma
 180 amostra de controle como calibrador. As características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados
 181 estão apresentadas na Tabela 1.

182

183 Tabela 1. Detalhes dos ensaios de miRNA usados no RT-qPCR

184

Gene	Sequência do oligonucleotídeo iniciador	Temperatura de anelamento (°C)	Concentração final (μ M)
PPIA (endógeno)	F: 5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3'	60	300
	R: 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'		
AREG (alvo)	F: 5'-CTTTCGTCTCTGCCATGACCTT-3'	60	300
	R: 5'-CGTTCTTCAGCGACACCTTCA-3'		
GREM1 (alvo)	F: 5'-TGGTGCAAGGGCAAGAAGGATAGA-3'	60	300
	R: 5'-CACTGTGTTTGGAGGTTGGCCTTT-3'		
COX2 (alvo)	F: 5'-AAGCCTAGCACTTTGGGTGGAGAA-3'	60	300
	R: 5'-TCCAGAGTGGGAAGAGCTTGCATT-3'		

	F: 5'-GGGTGATGATGTGCTGGATT-3'		
FADS2 (alvo)		60	300
	R: 5'-CCCTGGACATCTGAAGAGAAAG-3'		
	F: 5'-GACCCTGGGCAAGTCATTTA-3'		
SCD1 (alvo)		60	300
	R: 5'-AAACTGCCCTTTGAGGTAGG-3'		
	F: 5'-GACTACATCCGCTTCCTTCAG-3'		
SREBP1 (alvo)		60	300
	R: 5'-CCAGGTCCTTCAGCGATTT-3'		
	F: 5'-GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA-3'		
GAPDH (endógeno)		60	200
	R: 5'-CCCTCCACGATGCCAAAGT-3'		
	F 5'-CTCATCGTTGGTCCAATGCAAGT-3'		
RPL15 (endógeno)		60	300
	R 5'-TCACATCCACCCTGGGAAACAGAA-3'		

185

186

187 *Análise estatística*

188 A análise estatística foi realizada através do teste t de Student. Os dados foram
 189 transformados em log, conforme necessário para se ajustar à distribuição normal e todos os dados
 190 mostraram uma distribuição normal. As análises foram realizadas utilizando o software JMP (SAS
 191 Institute Cary, NC). Os dados são apresentados como média \pm SEM. Diferenças foram consideradas
 192 significantes quando $p < 0,05$.

193

194 **RESULTADOS**

195

196 A adição de CLA no meio de maturação não alterou a expressão dos genes: FADS2, GREM1,
 197 SREBP1, AREG e COX2 em oócitos ou células do *cumulus* de bovinos (Tabela 2 e 3). Já a adição de CLA
 198 diminuiu a expressão do gene SCD ($p < 0,05$) em oócitos, embora nas células do *cumulus* não houve
 199 efeito (Figura 2 e tabela 2). Houve menor ($p < 0,05$) expressão gênica do SCD em oócitos maturados
 200 na presença de CLA (média \pm EPM) quando comparado ao controle (média \pm EPM, Figura 2).

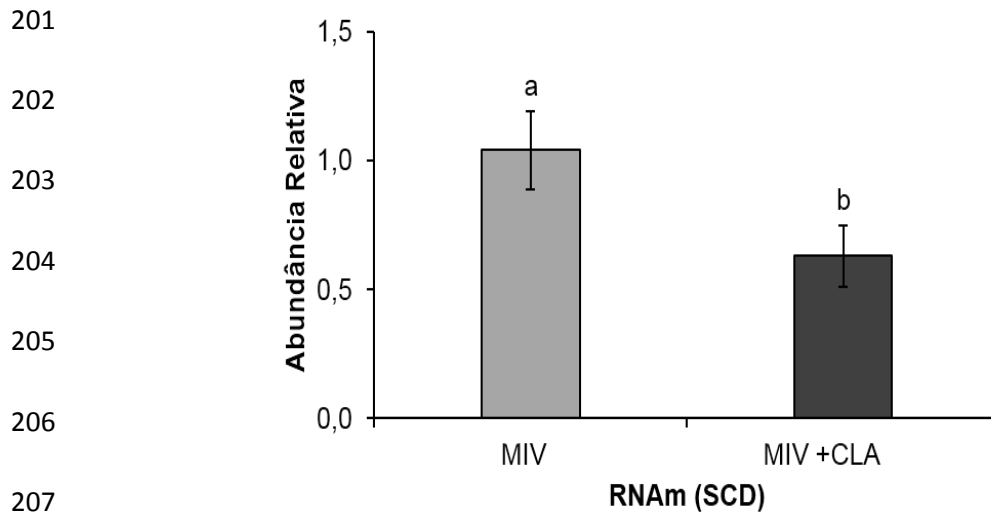


Figura 2. Adição de ácido linoleico (CLA) na maturação *in vitro* MIV e níveis de RNAm que codifica o SCD e sua abundância relativa em oócitos maturados com a presença de MIV e MIV+CLA. Barras com letras distintas (a; b) diferem entre si ($p < 0,05$).

Tabela 2. Expressão dos genes FADS2, GREM1, SREBP1, AREG e COX2, e sua abundância relativa em células do *cumulus* e oócitos maturados com e sem a presença de CLA. Os resultados foram obtidos de 5 replicatas de 20 oócitos cada (Média ± EPM).

	Oócito		Cumulus	
	MIV	MIV+CLA	MIV	MIV+CLA
FADS2	1,03±0,17 ^a	0,68±0,17 ^a	0,75±0,14 ^a	0,61±0,11 ^a
GREM1	1,19±0,13 ^a	1,73±0,37 ^a	1,45±0,43 ^a	2,12±0,54 ^a
SCD	1,04±0,15 ^a	0,63±0,12 ^b	0,76±0,16 ^a	0,55±0,06 ^a
SREBP1	0,86±0,05 ^a	1,07±0,21 ^a	0,83±0,18 ^a	0,61±0,04 ^a
AREG	1,30±0,37 ^a	1,63±0,68 ^a	0,77±0,17 ^a	0,97±0,28 ^a
COX2	0,89±0,18 ^a	1,16±0,42 ^a	0,44±0,12 ^a	0,36±0,06 ^a

224 Letras diferentes na linha diferem entre si na comparação dos grupos MIV ou MIV+CLA para oócito
 225 ou *cumulus* ($p < 0,05$).

226

227 DISCUSSÃO

228

229 Com os resultados obtidos demonstramos que a adição de CLA altera a lipogênese nos
 230 oócitos de bovinos maturados em meio MIV suplementado com SFB. Embora a expressão de RNAm
 231 para os genes FADS2, GREM1, SREBP1, AREG e COX2 não foram influenciados pela adição de CLA no
 232 oócito nem nas células do *cumulus*, houve diminuição na expressão do gene SCD, o qual codifica a
 233 enzima esteroil-CoA dessaturase, em oócitos maturados na presença deste AGPI.

234 A enzima esteroil-CoA dessaturase, ou delta 9, caracteriza-se por sua função de catalisar a
 235 conversão de ácidos graxos saturados em monoinsaturados (NTAMBI, 1995; ENOCH; CATALA;
 236 STRITTMATTER, 1976), sendo uma enzima chave que catalisa reações para inserir duplas ligações na
 237 formação dos ácidos graxos insaturados (OSHINO; SATO, 1972). Este é também o primeiro e mais
 238 crítico passo na síntese de ácidos graxos insaturados no organismo (MURRAY et al., 1994).
 239 Consequentemente, a atividade da esteroil-CoA dessaturase influencia a composição de ácidos
 240 graxos (TRUEMAN et al., 2000).

241 Muito se tem estudado para desenvolver um protocolo ideal de criopreservação de embriões
242 produzidos *in vitro*, sendo o uso de CLA, visando diminuição do conteúdo de lipídios no embrião,
243 uma das substâncias mais promissoras (PEREIRA; CARVALHAIS; PIMENTA, 2008; LEÃO *et al.*, 2015).
244 Embora muitos esforços tenham sido feitos no sentido de reduzir o conteúdo lipídico citoplasmático,
245 alterações na composição lipídica das membranas celulares também são responsáveis por diferenças
246 na criotolerância celular (SEIDEL, 2006). Sabe-se que a composição lipídica, principalmente de
247 fosfolipídios e colesterol, exerce fundamental papel na construção das estruturas celulares,
248 conferindo efeito na fluidez da bicamada lipídica, além de valiosa fonte de energia para as células
249 (LEE, 1975; DUNNING *et al.*, 2010).

250 O CLA é um ácido graxo poli-insaturado responsável por promover alterações estruturais nas
251 membranas e contribuir para regular a expressão de genes relacionados com o acúmulo de lipídios
252 intracelulares, deste modo à adição de CLA no meio de cultivo de maturação *in vitro* pode resultar
253 em efeitos positivos na criopreservação (HOCHI; KIMURA; HANADA, 1999; PEREIRA *et al.*, 2007;
254 PEREIRA; CARVALHAIS; PIMENTA, 2008; RAHME, 2012).

255 Os lipídios são de extrema importância para as células, no entanto, o aumento de ácidos
256 graxos livres saturados contribuem para a indução de estresse oxidativo e de apoptose nas células da
257 granulosa e células do *cumulus*, comprometendo o desenvolvimento dos oócitos (WU *et al.*, 2012;
258 YANG *et al.*, 2012; SUTTON- MACDOWALL *et al.*, 2016). A maturação dos oócitos é um período
259 essencial para o desenvolvimento da capacidade oocitária (RIZOS *et al.*, 2002; MAREI *et al.*, 2017) e é
260 muito sensível as concentrações de ácidos graxos livres, levando os mesmos a lipotoxicidade (LEROY
261 *et al.*, 2008; LEROY *et al.*, 2011; VAN HOECK *et al.*, 2013; LEROY *et al.*, 2015; MAREI *et al.*, 2017). Estes
262 achados são importantes, pois as lipoproteínas contidas no soro fetal bovino (SFB), utilizado como
263 fonte proteica durante a produção *in vitro*, atuam aumentando os lipídios que deveriam ser
264 utilizados como fonte energética devido à diminuição na β -oxidação mitocondrial dos ácidos graxos
265 (CROSIER *et al.*, 2001). O resultado do acúmulo lipídico são alterações na fluidez e função da
266 membrana plasmática (KIM *et al.*, 2001; SUDANO *et al.*, 2012). Porém, a substituição total do SFB na
267 PIVE ainda é um grande desafio, uma vez que os meios suplementados com esta fonte proteica são
268 os que exibem a melhor produção embrionária (DUQUE *et al.*, 2003). Por outro lado, os embriões
269 excedentes, após transferência a fresco em receptoras sincronizadas, são descartados por sua baixa
270 sobrevivência a criopreservação. Devido a essa dependência do uso de SFB para garantir as taxas de
271 produção embrionária, sobretudo nos programas comerciais de embriões o presente estudo avaliou
272 a expressão gênica em meio MIV suplementado com soro.

273 Nossos resultados não exibiram diminuição na expressão de SCD nas células do *cumulus*, sendo
274 esta redução apenas nos oócitos. Em trabalhos recentes, o SCD1 em células do *cumulus* humanas e
275 bovinas induziu a conversão de SFAs (ácidos graxos saturados) em MUFAs (ácidos graxos
276 monoinsaturados), desta forma melhorando o armazenamento de energia (FAYEZI et al., 2017) e
277 protegendo o oócito contra a lipotoxicidade induzida por ácidos graxos (AARDEMA et al., 2017).

278 Além disso, a dessaturação de ácidos graxos de membrana tem sido amplamente
279 considerada como um importante mecanismo adaptativo para o estresse térmico em peixes
280 (COSSINS; BOWLER, 1987, WODTKE; COSSINS, 1991). O aumento da atividade da enzima esteroil-
281 CoA dessaturase induzida por baixa temperatura levou a maior proporção de ácidos graxos
282 insaturados, o que é essencial para manter fluidez da membrana plasmática no curso da aclimação
283 a frio em diferentes espécies de peixes (OSHINO; SATO, 1972; TIKU et al., 1996), sendo este aumento
284 dependente da espécie (HSIEH; CHEN; KUO, 2003).

285 Outro ponto importante deste trabalho é o fato dos genes COX2, AREG e GREM1 envolvidos
286 na maturação oocitária (SHIMADA et al., 2006; ROMERO; SMITZ, 2009) não terem sido alterados,
287 demonstrando que a adição de CLA ao meio de maturação não prejudica esses eventos moleculares.

288 Levando-se em consideração que há redução no acúmulo lipídico sem alteração de genes
289 implicados na maturação oocitária em oócitos maturados na presença de CLA, este parece ser um
290 resultado promissor no caminho para o desenvolvimento de protocolos de criopreservação
291 embrionária com taxas de prenhes semelhantes aos embriões produzidos *in vivo*.

292

293 **CONCLUSÃO**

294

295 Concluímos que a adição do ácido linoleico conjugado (CLA) durante a maturação *in vitro*
296 (MIV) de oócitos bovinos diminui a expressão do gene SCD em oócitos bovinos maturados na
297 presença de SFB e pode ser uma estratégia para melhorar a criotolerância de embriões produzidos *in*
298 *vitro*.

299

300 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

301

- 302 **Aardema H, Van Tol HTA, Wubbolts RW, Brouwers JFHM, Gadella BM, Roelen BAJ.** Stearoyl-CoA
303 desaturase activity in bovine cumulus cells protects the oocyte against saturated fatty acid stress.
304 *Biology of Reproduction* 2017; v. **96(5)**, p. 982–992.
- 305 **Cossins AR, Bowler K.** Rate compensation and capacity adaptation. In: Cossins, A.R. (Ed.),
306 *Temperature Biology of Animals*. Chapman & Hall, New York, 1987. pp. 155– 203.
- 307 **Crosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE.** Ultrastructural Morphometry of Bovine
308 Blastocysts Produced In Vivo or In Vitro. *Biology of Reproduction* 2001; v. **64**, p. 1375-1385.
- 309 **Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL.** Beta-oxidation is
310 essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biology of*
311 *Reproduction* 2010; **83(6)**, 909–918.
- 312 **Duque P, Hidalgo CO, Gomez E, Pintado B, Facal N, Diez C.** Macromolecular source as dependent on
313 osmotic pressure and water source: effects on bovine in vitro embryo development and quality.
314 *Reproduction Nutrition Development* 2003; v. 43, p. 487-496.
- 315 **Enoch HG, Catala A, Strittmatter P.** Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA
316 desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of
317 lipid. *Journal of Biological Chemistry* 1976; **251(16)**, p. 5095-5103.
- 318 **Fayezi S, Ghaffari Novin M, Darabi M, Norouzi M, Nouri M, Farzadi L, Darabi M.** Primary culture
319 of human cumulus cells requires stearyl-coenzyme A desaturase 1 activity for steroidogenesis and
320 enhancing oocyte in vitro maturation. *Reprod Sci* 2017; **25(6)**:844-853.
- 321 **Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT.** Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in
322 mammals. *Animal Reproduction Science* 2004; **82–83**: 431–446.
- 323 **Goodhand KL, Watt RG, Staines ME, Hutchinson SM, Broadbent PJ.** In vivo oocyte recovery and in
324 vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh
325 treatment. *Theriogenology* 1999; **51**:951-961.
- 326 **Hochi S, Kimura K, Hanada A.** Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing
327 sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology* 1999; v.**52**, p.497-504.
- 328 **Horton JD, Goldstein JL, Brown M.** Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid
329 synthesis in the liver. *Journal Clinical Investigation* 2002; v. **109**, p. 1125-1131.
- 330 **Hsieh SL, Chen YN, Kuo CM.** Physiological responses, desaturase activity and fatty acid composition
331 in milkfish (*Chanos chanos*) under cold acclimation. *Aquaculture* 2003, v.**220**, p.903-918.
- 332 **Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y.** Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed
333 immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 2001; **122**:131–138.

- 334 **Lapa M, Marques CC, Alves SP, Vasques MI, Baptista MC, Carvalhais I, Silva MP, Horta AE, Bessa RJ,**
335 **Pereira RM.** Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid bovine oocyte competence and fatty
336 acid composition. *Reproduction Domestic Animals* 2011; **46**, 904-910.
- 337 **Leão BSC, Rocha-Frigoni NAS, Cabral EC, Coelho MB, Ferreira CR, Eberlin MN, Accorsi MF,**
338 **Nogueira É, Mingoti GZ.** Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation
339 with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. *Theriogenology*
340 2015; **v. 84**, n. 1, p.127-136.
- 341 **Lee AG.** Interaction within biological membranes. *Endeavour* 1975; **34**:67–71.
- 342 **Leroy JL, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IG, Bols PE.** Reduced fertility in high-yielding dairy
343 cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced
344 oocyte and embryo quality in highyielding dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* 2008; **v. 43**,
345 p. 623–632.
- 346 **Leroy JL, Rizos D, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan Uma, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PE.**
347 Condições intrafoliculares como uma importante ligação entre o metabolismo materno e a qualidade
348 do oócito: um foco na fertilidade da vaca leiteira. *Reprod Fertil* 2011; **24**:1-12.
- 349 **Leroy LMR, Valckx SDM, Jordaens L, De Bie J, Desment KLJ, Van Hoeck V, Britt JH, Marei WF, Bols**
350 **PEJ.** Nutrition and maternal metabolic health in relation to oocyte and embryo quality: critical
351 viewson what we learned from the dairy cow model. *Reproduction, Fertility and Development* 2015;
352 **27**, 693–703.
- 353 **Lolicato F, Brouwers JF, Van De Lest CHA, Wubbolts R, Aardema H, Priore P, Roelen BAJ, Helms JB,**
354 **Gadella BM.** The cumulus cell layer protects the bovine maturing oocyte against fatty acid-induced
355 lipotoxicity. *Biology of Reproduction* 2015; **v. 92**: 16, p. 1-16.
- 356 **Marei WFA, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA.** The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation
357 and development. *Biology of Reproduction* 2009; **v. 81(6)**, p. 1064-1072.
- 358 **Marei WFA, De Bie J, Mohey-Elsaeed O, Wydooghe E, Bols PEJ, Leroy JLMR.** Alpha-linolenic acid
359 protects the developmental capacity of bovine cumulus-oocyte complexes matured under lipotoxic
360 conditions in vitro. *Biology of Reproduction* 2017; **96(6)**, 1181-1196.
- 361 **Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** Harper: bioquímica. 7.ed. São Paulo: *Atheneu*
362 1994. 763p.
- 363 **Ntambi JM.** The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res* 1995 **34**:139–150.
- 364 **Ntambi JM, Miyazaki M.** Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1. *Current opinion in lipidology*
365 2003; **v.14**, n -3, p. 255-261.
- 366 **Oshino N, Sato R.** The dietary control of the microsomal stearyl CoA desaturation enzyme system in
367 rat liver. *Arch. Biochem. Biophys* 1972; **149**, 369– 377.

- 368 **Pereira RM, Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, Bessa RJ, Silva JC, Pereira**
369 **MS, Marques CC.** Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12
370 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). *Animal Reproduction Science* 2007; **v. 9**, p.293-301.
- 371 **Pereira RM, Carvalhais I, Pimenta J.** Biopsed and vitrified bovine embryos viability is improved by
372 tras10, cis12 conjugated linoleic aid supplementations during in vitro embryo culture. *Anim.*
373 *Reprod.Sci* 2008; **v.106**, p.322-332.
- 374 **Rahme LSTR.** Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embriões
375 bovinos produzidos in vitro. *Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola*
376 *Veterinária. Belo Horizonte/MG* 2012; p.40.
- 377 **Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P.** Consequences of bovine oocyte maturation,
378 fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and
379 blastocyst quality. *Mol Reprod* 2002; **61(2)**:234-48.
- 380 **Romero S, Smitz J.** Epiregulin can effectively mature isolated cumulus-oocyte complexesbut fails as a
381 substitute for the hCG/epidermal growth factor stimulus on cultured follicles. *Reproduction* 2009;
382 **137**: 997-1005.
- 383 **Seidel GE.** Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 2006;
384 **Vol. 65**, issue 1, p. 228-235.
- 385 **Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS.** Paracrine and autocrine
386 regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells:
387 key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol. Endocrinol* 2006; **v.20**,
388 p.1352-1365.
- 389 **Sudano MJ, Paschoal DM, Caixeta ES, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Martins A JR, Machado R,**
390 **Eberlin MN, Buratini JJ, Landim-alvarenga FC.** Cryotolerance of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus*
391 *taurus* in vitro and in vivo produced embryos. *Animal Reproduction* 2012; **v. 9**, p. 677.
- 392 **Sutton-Mcdowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG.** The pivotal role of glucose metabolism in
393 determining oocyte developmental competence. *Reproduction* 2010; **139(4)**, 685-95.
- 394 **Sutton-Mcdowall ML, Wu LL, Purdey M, Goldys EM, Macmillan KL, Thompson JG, Robker RL.** O
395 estresse do retículo endoplasmático induzido por ácidos graxos não-esterificados em complexos
396 cumulus-oócitos bovinos altera o metabolismo celular e a competência para o desenvolvimento. *Biol*
397 *Reprod.* 2016; **94**:23, 1- 9.
- 398 **Tiku PE, Gracey AY, Macartney AI, Beynon RJ, Cossins AR.** Cold-induced expression of D9-desaturase
399 in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 1996; **271**, 815–818.
- 400 **Trueman RJ, Tiku PE, Caddick MX, Cossins AR.** Thermal thresholds of lipid restructuring and delta 9-
401 desaturase expression in the liver of carp (*Cyprinus carpio L.*). *J Exp Biol* 2000; **203(Pt 3)**:641-50.

402 **Van Hoeck V, Leroy JL, Arias-Alvarez M, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Schnorbusch K, Bols PE, Leese**
403 **HJ, Sturmey RG.** Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid
404 concentrations: mechanistic insights. *Reproduction* 2013; **145**,33–44.

405 **Wodtke E, Cossins AR.** Rapid cold-induced changes of membrane order and activity in endoplasmic
406 reticulum of carp liver: a time-course study of thermal acclimation. *Biochim. Biophys* 1991; **1064**,
407 343– 350.

408 **Wu LL, Russell DL, Normando RJ, Robker RL.** O estresse do retículo endoplasmático (ER) em
409 complexos cumulus-oócito prejudica a secreção de pentraxina-3, o potencial de membrana
410 mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e o desenvolvimento embrionário. *Mol Endocrinol.* 2012; **26**, 562-573.

411 **Yang X, Wu LL, Chura LR, Liang X, Faixa M, Normando RJ, Robker RL.** A exposição ao fluido folicular
412 rico em lipídios está associada ao estresse do retículo endoplasmático e à maturação oocitária
413 comprometida em complexos cumulus-oócito. *Fertil Steril* 2012; **97**, 1438-1443

414

415 **AGRADECIMENTOS**

416

417 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
418 Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

419

420 **CONFLITO DE INTERESSE**

421

422 Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

ANEXO – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

Author Guidelines

Scope

Animal Genetics reports frontline research on molecular genetics and functional genomics of economically important and domesticated animals. Publications include variability at genome, gene, expression, metabolome and protein levels, mapping of traits and quantitative trait loci (QTLs), associations between genes or gene expression and traits, genetic diversity and epidemiology, epigenetics and epigenomics, and genome-wide characterization of gene expression. We welcome, amongst others, manuscripts that report novel findings relating to:

- Evidence for novel causative genes and their allelic variants
- Molecular background of traits revealed by genomic selection
- Comprehensive analysis of genetic and epigenetic variation associated with complex traits
- Effect of causative mutations
- Geographic distribution of adaptive variation
- Breed relationships and population history derived from mitochondrial DNA, Y-chromosomal, genome-wide SNP panels or whole-genome sequences
- Development of bioinformatic tools, including comprehensive and user-friendly software packages.

Reports of gene sequences that are not accompanied by novel genetic findings will not be considered. Studies of association of gene variants with traits should preferably be based on haplotypes. Associations of a single silent genetic variant with a single trait within one population without support of genome-wide association studies (GWAS) and reporting a significant but only marginal effect will normally not be considered for publication. Genetic diversity studies should have a wider scope than a few breeds at a regional scale (e.g. originating from only one country). If based on microsatellites, typically at least 15 markers are required. Gene expression studies should have a genetic component (e.g., the effect of a mutation; evidencing new candidate genes) and/or be at the genome-wide level.

General

Manuscripts should be submitted through the *Animal Genetics* – ScholarOne Manuscripts (S1M) electronic editorial office.

On the first time accessing the site, the corresponding author will need to create an account (top left hand corner). The author must provide a full postal address, email address, and telephone and fax numbers. *Animal Genetics* – S1M will then create user name and password, which should be retained for future access to the site. Once the author is logged into the system, the Main Menu will be displayed. Clicking on the Author Centre will bring up instructions for uploading the manuscript and associated files.

The journal will not accept for publication manuscripts that describe experiments showing lack of concern for present ethical and welfare standards. The Editor's decision in this regard is final. Authors must comply with ethical guidelines as described in <http://publicationethics.org/resources>. The Editor reserves the right to report gross misconduct to the institutions of the authors.

As detailed below, datasets that are required for the reproduction of the data must be available via public repositories at the time of submission. If this is seriously problematic, contact the Editor-in-Chief.

Manuscripts that are not prepared in accordance with the instructions as detailed below will be returned to the authors. Manuscripts must not be under consideration for publication elsewhere. Revision of the manuscript must be received by the Editor within three months of his first decision; otherwise the revision will be considered a new submission.

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct (see below for advice for non-native English speakers). Spelling should conform to the Concise Dictionary of Current English (UK spelling). Units of measurements, symbols and abbreviations should follow those in Units, Symbols and Abbreviations (6th ed., 2008) published and supplied by the Royal Society of Medicine, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE UK. This specifies the use of SI (Système International) units. All gene names and symbols should be italicized throughout the text, tables and figures. Locus symbols used in *Animal Genetics* publications must be confirmed at the website <http://www.genenames.org>. The NCBI's Entrez Gene database can be used to check for non-human gene names. *Animal Genetics* is now using the guidelines for SNP nomenclature and numbering presented on <http://www.hgvs.org/mutnomen/>.

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission. A list of independent suppliers of editing services can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/englishlanguage.asp>. All services are paid for and arranged by the authors, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication of their manuscript.

Types of Manuscripts

Full Papers should consist of the following sections - title page, Summary, Keywords, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, tables, legends to figures, figures and Supporting Information. Results and Discussion may be combined into one section. Full Papers should normally not exceed 5000 words in length, including all text, references, figures, legends, etc.

Short Communications should consist of the following sections - title page, Summary, Keywords, main text, Acknowledgements, References, tables, legends to figures, figures and Supporting Information. Short Communications manuscripts must not exceed 1500 words in total and two figures and/or tables. GWAS without follow-up studies of candidate genes and not offering novel insights are usually published as Short Communications.

Mini-reviews are invited on issues of interest to *Animal Genetics* readers. Mini-review manuscripts should include title page, Summary, Keywords, main text with a limited number of optional sections, Acknowledgments, References, tables, legends to figures and figures, and would usually not exceed 5000 words in total.

Brief Notes report technical information such as panels of polymorphisms with allele frequencies, clear associations between non-causative polymorphisms and a trait if this offers no further insights, new causative mutations in known causative genes, and software development. Brief Notes should not exceed 500 words in total as they must accommodate a single column. Subheadings are adapted to the specific information. References are

abbreviated and numbered sequentially in the text. As of August 1, 2014, map assignments by radiation hybrid and/or in situ hybridization will only be considered if these add to whole-genome sequence data.

Brief Notes may also report the availability via a link of curated and annotated datasets (e.g., compilations of high-density SNP genotypes from a wide panel of animals, mitochondrial DNA sequences from different sources, sequence variants of specific genes or group of genes from one or more species with corresponding phenotypes) that would constitute useful reference data for future animal genetic studies.

Please click here if you wish to view an example of a [Full paper](#), [Short Communication](#) or [Brief Note](#).

Arrangement of the manuscript

A single file should be prepared containing the title page, Summary, text, Acknowledgements, References and tables, double spaced at 12 point size. Additional files should be created for each figure. DOS or Windows operating system and Word for Windows word-processing packages should be used to prepare the text file.

- Leave the right-hand margin unjustified
- Turn the hyphenation option off
- Use tabs, not spaces, to separate data in tables or use the table option in Word
- Number the lines of text

Title page

The title page should include a short but informative title, the initials and surnames of each author followed by his or her department, institution, city, post code and country. The fax and telephone numbers and email address of the corresponding author should also be included. Any change of address should be given in footnotes. Acknowledgements of funding and institutions and manuscript reference number should not appear on the title page.

Summary

Full Papers, Short Communications and Mini-reviews should include a summary of not more than 250 words. The summary should summarize the main findings and be comprehensible on its own. Abbreviations and references should not be used in the summary.

Acknowledgements

Acknowledgements should follow the main text but precede the list of references. Personal acknowledgements should precede those of institutions and agencies.

References

References in the text should follow the Harvard system in style, i.e. name followed by date, Brown & Smith (1966); if there are three or more authors, Brown et al. (1966). References at the end of the text should be listed in alphabetical order of (first) authors, giving both the full title of the article and full name of the journal, and should appear as follows:

1. Giger U., Reilly M.P., Asakura T., Baldwin C.J. & Harvey J.W. (1986) Autosomal recessive phosphofructokinase deficiency in English springer spaniel dogs. *Animal Genetics* 17, 15-23.

2. McKearn T.J. (1980) Method for growing hybridomas in rats or mice. In: *Monoclonal Antibodies* (ed. by R.H. Kennet, T.J. McKearn & K.B. Bechtol), pp. 403-4. Plenum Press, New York.

Personal communications (e.g. K. MacPherson, personal communication) must be authorized in writing by those involved. Unpublished data should be cited in the text as (unpublished data). References to manuscripts submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (M. Bruce & A. Laing, in preparation) and should not be included in the list of references.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

For Brief Notes, citations in the text should be by number and an abbreviated format should be used for references at the end of the text, i.e. a maximum of two authors, without the title of the article with abbreviated journal titles, e.g. 1 Giger U. et al. (1986) *Anim Genet* 17, 15-23.

Tables

Tables in the main text should only contain data that are directly relevant for the main conclusions of the article or facilitate the understanding of the text. Other supporting data (e.g. sampling details, primer sequences) can be listed as Supporting Information (see below).

Figures

Lettering on graphs and other illustrations should be horizontal whenever possible and have adequate size. Figures should be largely self-explaining with symbols and colours preferably explained within the figure. Figures showing sequence data will not generally be published, unless key features of the sequence need to be highlighted. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS) or bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF) with a resolution of at least 300 dpi. Please consult the instructions for electronic artwork formats and resolutions (digital illustration standards).

In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version. Therefore the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Animal Genetics now reproduces colour figures FREE of charge.

Supporting Information

Supporting Information should be published as web materials at Animal Genetics website and may include, amongst others, primer sequences, specification of samples, methodological aspects, allele frequencies, summary statistics, GWAS-implicated candidate genes, sequence alignments, additional analyses, movie files, audio clips, 3D structures or other multimedia files. Authors are responsible for the preparation of Supporting Information, which should be supplied in a format that will be most accessible by readers (e.g. PDF or Word for text and TIFF/EPS for figures).

Supporting Information should be cited within the text and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the authors, and a proof is not made available prior to

publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

Access to Data

Data that is integral to the article must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the article. Data availability also contributes to visibility and impact. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission.

Data for which public repositories are widely used (see en.wikipedia.org/wiki/List_of_biological_databases; genome.cshlp.org/site/misc/foraweblinks.xhtml) should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s), such as the accession codes, should be obtained before the manuscript can be accepted for publication and be included in the manuscript. If an adequate dedicated repository does not exist data sets should be submitted to the general purpose repository (<http://datadryad.org/>).

Nucleotide data (genomes, genes, coding and non-coding RNA) must be submitted and deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases. Submission to any one of the three collaborating databases is sufficient to ensure data entry in all. Contact information for nucleotide sequence: DDBJ: ddbj@ddbj.nig.ac.jp; www.ddbj.nig.ac.jp EMBL: datasubs@ebi.ac.uk; www.ebi.ac.uk GenBank: info@ncbi.nlm.nih.gov web; www.ncbi.nlm.nih.gov For special types of submission (e.g. genomes, bulk submission, etc.) additional submission protocols are available from the above websites. Upon acceptance miRNAs should be submitted to miRBase (www.mirbase.org/).

Protein sequences that have been determined by direct amino acid sequencing must be submitted to SWISS-PROT at the EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk, datasubs@ebi.ac.uk). Protein sequences that are obtained by translation of nucleic acid sequences should not be submitted but are assigned SWISS-PROT accession numbers on incorporation into TrEMBL. Experimental results revealing function, subcellular location, subunit etc. should also be submitted to SWISS-PROT (update@ebi.ac.uk).

SNPs, microsatellites and indels 50 bp should be submitted at dbSNP (GenBank) and indels >50 bp at dbVAR (GenBank) or DGVA (EMBL).

QTL mapping data for cattle, sheep, pigs, horses and rainbow trout should be submitted to the AnimalQTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>) in MIQAS format.

Availability of materials

It is understood that by publishing an article in Animal Genetics the authors agree to make available upon reasonable request to other scientists engaged in academic (non-profit) research any of the nucleic acids, antibodies, cells, etc. that are not available from commercial suppliers and are required to substantiate the scientific conclusions of the article.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a website that contains the proof. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. Acrobat Reader will be required in order to read the PDF file. This software can be

downloaded (free of charge) from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

Early View

Animal Genetics is covered by Wiley's Early View service. Early View articles are complete full-text article published online in advance of their publication. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than after allocation to an issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no change can be made after online publication. The nature of Early View article means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View article cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After issue publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Author Services

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online. Authors can check the status of their article online and choose to receive automated -mails at key stages of production. The authors will receive an email with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete email address is provided when submitting the manuscript. Visit this page for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley will dispose of all electronic material submitted two months after publication.

Copyright

If your manuscript is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the manuscript will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the manuscript.

For authors signing the copyright transfer agreement:

(a) If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs at CTA Terms and Conditions.

(b) If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- CreativeCommonsAttributionLicense OAA
- Creative Commons Attribution NonCommercial License OAA

- Creative Commons Attribution NonCommercial-NoDerivatives License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements, please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services. For more information regarding Creative Commons License, please visit Copyright & License hosted at Wiley Open Access.

For authors funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF): If you choose OnlineOpen, you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license, supporting you in complying with your Funder requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy, please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement> and view this video.

Authors who did not select OnlineOpen when they originally accessed the copyright form via Author Services but who subsequently wish to make **their article open access should see the section OnlineOpen**. Similarly, authors who wish to switch to the OnlineOpen selection after their article is published online as Early View should see the section OnlineOpen.

Note to Contributors on Deposit of Accepted Version

(a) Funder arrangements

Certain funders, including the NIH, members of the Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust require deposit of the Accepted Version in a repository after an embargo period. Details of funding arrangements are set out at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>. Please contact the Production Editor if you have additional funding requirements.

(b) Institutions

Wiley has arrangements with certain academic institutions to permit the deposit of the Accepted Version in the institutional repository after an embargo period. Details of such arrangements are set out at the following website: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Online Open

With OnlineOpen the authors, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://www.wileyopenaccess.com/view/terms.html>.

Upon acceptance, authors wishing to send their article to OnlineOpen will be required to complete the online payment form at: <https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopenorder.asp>.

Last updates on 3rd July 2015