

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CRIOTOLERÂNCIA
DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

**Beatriz Caetano da Silva Leão
Médica Veterinária**

**JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
Fevereiro de 2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CRIOTOLERÂNCIA
DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Beatriz Caetano da Silva Leão

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Zoccal Mingoti

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro de 2012

L437e Leão, Beatriz Caetano da Silva
Efeitos da suplementação lipídica sobre o desenvolvimento
embrionário e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* /
Beatriz Caetano da Silva Leão. -- Jaboticabal, 2012
xiii, 64 f. : Il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti
Banca examinadora: Ériklis Nogueira, Joaquim Mansano Garcia
Bibliografia

1. Bovino. 2. Ácidos graxos poliinsaturados. 3. Criotolerância. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de
Jaboticabal.
e-mail: beatriz_csl@yahoo.com.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

AUTORA: BEATRIZ CAETANO DA SILVA LEÃO

ORIENTADORA: Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. ÉRIKLIS NOGUEIRA

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa / Corumbá/MS

Data da realização: 27 de fevereiro de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BEATRIZ CAETANO DA SILVA LEÃO – nascida em Rio Verde – GO, aos 12 dias do mês de fevereiro de 1987. Concluiu o ensino médio na Cooperativa de Ensino de Rio Verde (COOPEN), na cidade de Rio Verde – GO, em dezembro de 2004. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus Araçatuba-SP, em março de 2005. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2009. Durante a graduação realizou estágio de Iniciação Científica sob orientação da Prof^a. Ass. Dr^a. Gisele Zoccal Mingoti, junto a disciplina de Fisiologia dos Animais Domésticos, com bolsas de iniciação científica da FAPESP, referentes aos processos nº 2006/56076-1 e 2008/51407-5. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2010, sob orientação da Prof^a. Ass. Dr^a. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado do CNPq. Aprovada no Exame de Seleção para o curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária e área de concentração de Reprodução Animal, nível de Doutorado nesta mesma instituição, em outubro de 2011, com início previsto para março de 2012.

EPÍGRAFE

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a
vitória é o desejo de vencer.

Mahatma Gandhi

A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo
menos outros dez.

George Bernard Shaw

DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho a meus pais Nelson e Helena
por todo seu amor e sempre apoiarem
minhas escolhas profissionais.**

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais essa conquista, além de todos os ensinamentos e o amadurecimento que ela me proporcionou.

À minha querida orientadora Gisele Zoccal Mingoti, que há tantos anos me acompanha nessa jornada de pesquisa por sua paciência, confiança, dedicação, conselhos, ensinamentos e todo seu esforço para que esse trabalho fosse realizado. Obrigada por sempre permitir meu crescimento profissional.

Ao professor Iveraldo Santos Dutra por toda sua atenção, simpatia e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao Dr. Ériklis Nogueira por sua orientação, dedicação, paciência e disposição para sempre ajudar nossa equipe de trabalho, sem nunca medir esforços. Também, gostaria de agradecer à sua esposa Renata e suas meninas Maria Eduarda e Maria Isabel pelo carinho e compreensão pelas longas viagens até Araçatuba.

Às minhas queridas companheiras de trabalho no laboratório: Nathália Rocha e Mônica Accorsi por toda imprescindível ajuda, conselhos, apoio, ensinamentos e carinho. Também, à Fernanda Gottardi, por toda paciência e ensinamentos. Com certeza, formamos mais que uma equipe de trabalho, e sim uma família.

Ao funcionário Adão Custódio pela ajuda e disposição com a alimentação e manejo dos animais. À funcionária Alessandra Ragozzo por toda ajuda dispensada na organização do laboratório.

Aos estagiários que acompanharam o experimento e que muito ajudaram na realização das atividades experimentais: Gladston Ferreira, Marcelo Tacconi e Thiago Vieira Neves (FMVA – UNESP, Araçatuba-SP). Também, às eventuais e valiosas contribuições dos estagiários David Giraldo Arana (Universidad de Caldas, Colômbia), Eduardo Panelli, Tamiris Sayuri Aguiar, Leandro Pavanello (FMVA – UNESP, Araçatuba-SP), Mariana Lacerda e Guilherme Cavalcanti (UCDB, Campo Grande-MS), e dos Médicos Veterinários Fábio Girardi Frigoni, Larissa Bedore Zoccal e Roosevelt José Nogueira.

À todas as empresas que muito contribuíram para a realização deste trabalho: **Arm & Hammer**, pela doação do Megalac-E®; **Grupo Guabi** pela doação do sal mineral Guabiphos 60S®, na pessoa do M.V. Guilherme Beraldi por toda sua atenção; **Agropecuária Estrela do Céu**, em nome de Álvaro Borges, por ceder os animais utilizados no experimento; Ao Dr. Carlos Gilberto Almodin (Materbaby – Human Reproduction) pela concessão dos kits de vitrificação Vitri-Ingá® (**Ingá-Med**); **Alta Genetics do Brasil**, em nome de Dr. Luís Alfredo Garcia Deragon, pela doação de palhetas de sêmen; Ao M.V. Evandro da **Ouro Fino Saúde Animal** pela doação das doses de Cincrocio®; **WTA – Watanabe Tecnologia Aplicada**, pela concessão de agulhas para as punções ovarianas; **Universidade Católica Dom Bosco (UCDB)** pelo empréstimo do ultrassom e bomba de vácuo para as OPUs.

Aos professores doutores componentes da banca examinadora, Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia e Dr. Érikis Nogueira pela disponibilidade e grande colaboração em minha dissertação.

Aos meus pais Nelson e Helena, minhas irmãs Lívia e Ludimilla, meus avós Mário e Therezinha e a todos meus familiares por todo amor, apoio e orações.

Ao meu namorado, Rafael Cipriano por seu amor, paciência e palavras de conforto nos momentos mais difíceis. Com você ao meu lado essa caminhada tornou-se mais suave.

À minha “irmã” Nathália Rocha por todo seu carinho e paciência e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos dessa jornada.

À todas as minhas amigas e amigos, por tornar meus dias mais alegres e divertidos e por apoiarem minhas escolhas profissionais: Caio Vieira, Carol Aoki, Daniela Junqueira, Heloíse Pazian Paulo, Larissa Bedore Zoccal, Ludmila Mangialardo, Mariana Ferreira de Souza, Marianna Giffoni, Monique Sicheroli, Naiara Reis Gil, Otávio Fidelis Jr., Poliana Peres, Renata Furquim, Tamíris S. Aguiar e Valéria Silva.

Ao Dr. José Nélio de Souza Sales por seu exemplo de profissionalismo e dedicação com a pesquisa, que muito me inspiraram nessa etapa profissional.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

APOIO FINANCEIRO

Bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 554730/2010-3, no período de Setembro de 2010 a Fevereiro de 2012.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	 1
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	3
Papel dos ácidos graxos poliinsaturados nas funções biológicas do organismo animal e reprodução.....	3
Influência da suplementação alimentar com lipídeos sobre a função reprodutiva de fêmeas bovinas e qualidade oocitária.....	6
Efeito do cultivo de oócitos ou embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meios suplementados com lipídeos.....	9
Criopreservação e criotolerância de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i>	13
Referências.....	16
 CAPÍTULO 2 - SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE NOVILHAS DA RAÇA NELORE (<i>Bos taurus indicus</i>) COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>	 22
Resumo.....	22
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	26

Reagente e soluções.....	26
Manejo dos animais e condições experimentais.....	26
Tratamento <i>in vivo</i>	27
Sincronização da onda de crescimento folicular.....	29
Aspiração folicular <i>in vivo</i> guiada por ultrassom.....	30
Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	31
Fertilização <i>in vitro</i>	31
Cultivo de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	32
Vitrificação e avaliação da re-expansão embrionária pós desvitrificação.....	32
Análise estatística.....	33
Resultados.....	34
Ganho de peso e ECC das doadoras.....	34
Aspiração folicular, recuperação e qualidade oocitária.....	35
Produção de embriões <i>in vitro</i>	36
Sobrevivência embrionária pós-criopreservação.....	37
Discussão.....	37
Conclusão.....	41
Referências.....	42
 CAPÍTULO 3 - ADIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS OMEGA 6 E 3 EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> : EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS.....	46
Resumo.....	46
Introdução.....	48
Material e métodos.....	50
Reagentes e soluções.....	50
Aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro.....	50
Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	51
Fertilização <i>in vitro</i>	51

Cultivo de desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	52
Vitrificação e avaliação da re-expansão embrionária pós-desvitrificação.....	52
Delineamento experimental.....	53
Análise estatística.....	54
Resultados.....	55
Discussão.....	58
Conclusão.....	62
Referências.....	63

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2 - SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE NOVILHAS DA RAÇA NELORE (*Bos taurus indicus*) COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais utilizadas no experimento, em base de matéria seca (MS).....	28
Tabela 2. Porcentagem dos principais ácidos graxos encontrados na gordura protegida (Megalac-E [®]) fornecida na dieta	28
Tabela 3. Efeito da suplementação de novilhas Nelore com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA's <i>n</i> -6 e <i>n</i> -3, sobre a média de peso (quadrados mínimos $\pm$ EPM) e o escore de condição corporal (ECC) durante todo o período experimental.....	34
Tabela 4. Média (quadrados mínimos $\pm$ EPM) e total de folículos aspirados, total e taxa de recuperação de oócitos, oócitos viáveis e inviáveis para a PIV de embriões e taxa de aproveitamento, de novilhas Nelore suplementadas (GORD) ou não (CONTR) com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA's <i>n</i> -6 e <i>n</i> -3.....	36
Tabela 5. Médias (quadrados mínimos $\pm$ EPM) das taxas (%) de clivagem e desenvolvimento de embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos obtidos de novilhas Nelore suplementadas (GORD) ou não (CONTR) com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA's <i>n</i> -6 e <i>n</i> -3.....	36
Tabela 6. Sobrevivência pós-desvitrificação de embriões produzidos <i>in vitro</i> a partir de oócitos obtidos de novilhas Nelore suplementadas (GORD) ou não (CONTR) com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA's <i>n</i> -6 e <i>n</i> -3.....	37

CAPÍTULO 3 - ADIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS OMEGA 6 E 3 EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO*: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS

Tabela 1. Médias (quadrados mínimos $\pm$ EPM) das taxas de clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) das famílias Omega 6 e 3 durante a maturação e/ou cultivo <i>in vitro</i>	55
Tabela 2. Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) das famílias Omega 6 e 3 durante a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos sobre as taxas (%) de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos (médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM).....	56
Tabela 3. Efeito do momento (MIV e/ou CIV) da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) durante a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos sobre as taxas (%) de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos (médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM).....	57
Tabela 4. Sobrevivência pós-desvitrificação de embriões produzidos a partir de oócitos cultivados com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) durante a maturação e/ou cultivo <i>in vitro</i>	58

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 2 - SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE NOVILHAS DA RAÇA NELORE (*Bos taurus indicus*) COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

Figura 1. Atividades realizadas a campo durante o experimento.....29

Figura 2. Atividades realizadas no laboratório durante o experimento.....33

CAPÍTULO 3 - ADIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS OMEGA 6 E 3 EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO*: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS

Figura 1. Suplementação dos meios de cultivo de maturação e desenvolvimento *in vitro* utilizados e grupos experimentais avaliados.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – Ácido linolênico
BME - Solução de aminoácidos 50X
BSA - Albumina sérica bovina
°C - Graus Celsius
Ca – Cálcio
CIV - Cultivo *in vitro*
CL – Corpo lúteo
CLA - Ácido linoléico conjugado
cm - Centímetro
CO₂ - Dióxido de carbono
COCs - Complexos *cumulus* oócito
CONTR – Grupo Controle
DHA - Ácido docosaexaenóico
DMSO – Dimetil-sulfóxido
DPBS - Solução salina em tampão fosfato
DV-1 – Solução de desvitrificação 1
DV-2 – Solução de desvitrificação 2
DV-3 – Solução de desvitrificação 3
ECC – Escore de condição corporal
EPM - Erro padrão da média
FIV - Fertilização *in vitro*
FSH - Hormônio folículo estimulante
g - Força gravitacional
G - Gauge (unidade de medida de calibre)
GH – Hormônio de crescimento
GORD – Grupo Gordura
h - hora
hCG - Gonadotrofina coriônica humana

HEPES - N- (2-hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid); 4- (2 Hydroxyethyl) piperazine- 1-ethanesulfonic acid

hpi - horas pós-inseminação

IETS – “International Embryo Transfer Society”

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

Kg - Quilograma

LA – Ácido linoléico

LH - Hormônio luteinizante

MEM - Solução de aminoácidos não essenciais 100X

mg - Miligrama

MhZ – Megahertz

MIV - Maturação *in vitro*

mL - Mililitro

mm - Milímetros

mM – Milimolar

mmHg – milímetros de mercúrio

mRNA – RNA mensageiro

MS – Matéria seca

n - Número

n-3 – Ômega 3

n-6 – Ômega 6

NDT – Nutrientes digestíveis totais

OPU – “Ovum pick-up”

P - Fósforo

P – probabilidade

P₄ – Progesterona

PB – Proteína bruta

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

pH – potencial hidrogeniônico

PHE - Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina

PIV - Produção *in vitro* de embriões

PUFAs – Ácidos graxos poliinsaturados

PVA – Polivinil álcool

SAS – Sistema de análise estatística

SCD – “Stearoyl-CoA dessaturases”

SFB - Soro fetal bovino

SOFaa- “Synthetic Oviduct Fluid” suplementado com aminoácidos

TALP-FIV – “Tyrode’s” albumina lactato piruvato

TCM-199 – “Tissue culture medium” 199

UI - Unidades internacionais

VI-1 – Solução de vitrificação 1

VI-2 - Solução de vitrificação 2

vs - *versus*

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm – Micrometro

µM – Micromolar

% - Porcentagem

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA SOBRE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN*
*VITRO***

RESUMO - O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da suplementação lipídica sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV). Para tanto, em uma primeira etapa foi avaliado o efeito da suplementação alimentar de novilhas Nelore com uma fonte de gordura protegida ruminal, rica em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) Omega 6 (*n*-6) e 3 (*n*-3) sobre a população folicular, número de oócitos recuperados, desenvolvimento *in vitro* e sobrevivência embrionária após 3 e 24h de CIV pós-desvitrificação. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) quanto à população folicular ($17,9\pm1,0$ vs $15,8\pm1,0$), número de oócitos recuperados ($14,4\pm1,4$ vs $14,5\pm1,3$) e número de oócitos viáveis ($12,1\pm1,2$ vs $12,5\pm1,1$) para a PIV de embriões, respectivamente para os grupos CONTR e GORD. Da mesma forma, a taxa de clivagem ($68,7\pm3,2$ vs $61,3\pm3,0$), desenvolvimento embrionário ($47,0\pm3,7$ vs $39,4\pm3,6$) e re-expansão embrionária pós-aquecimento não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos CONTR e GORD (3h: 77,5 vs 78,4%; 24h: 77,5 vs 81,1%), muito embora tenha sido observado um incremento numérico na taxa de sobrevivência embrionária após 24h de CIV pós-desvitrificação no grupo GORD. Já em uma segunda etapa, foi avaliado o efeito da adição de Ácido Linoléico Conjugado (CLA), Ácido Docosaexaenóico (DHA) ou CLA+DHA durante os cultivos de maturação, desenvolvimento ou ambos, sobre o desenvolvimento *in vitro* e sobrevivência embrionária após 3 e 24h de CIV pós-desvitrificação. Não houve efeito entre o tipo de PUFA utilizado, assim como o momento da suplementação sobre as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos e de sobrevivência embrionária em relação ao grupo controle ($P>0,05$). As maiores taxas de sobrevivência embrionária após 3h de CIV pós-reaquecimento foram observadas nos grupos suplementados com DHA durante a MV (76,2%) ou na MV+CIV (78,8%), diferindo significativamente ($P<0,05$) dos grupos suplementados durante a MV com CLA (52,7%)

ou com CLA+DHA (55,3%). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na taxa de re-expansão após 24h de re-cultivo entre o grupo controle e a maioria dos tratamentos avaliados, com exceção do grupo suplementado com CLA durante o CIV, que apresentou redução significativa ($P<0,05$) na criotolerância (73,0% vs 50,0%, respectivamente). Em conclusão, a suplementação alimentar de novilhas Nelore e a adição de PUFA's *n*-6 e *n*-3 no sistema de PIV de embriões bovinos não exerceram nenhum efeito sobre o desenvolvimento *in vitro* e sobrevivência embrionária pós-criopreservação.

Palavras-Chave: ácidos graxos poliinsaturados, bovino, criotolerância, embrião, produção *in vitro*

EFFECTS OF LIPID SUPPLEMENTATION ON EMBRYONIC DEVELOPMENT AND CRYOTOLERANCE OF BOVINE *IN VITRO* PRODUCED EMBRYOS

SUMMARY- The aim of this study was to evaluate the effects of lipid supplementation on embryo development and cryotolerance of *in vitro* produced (IVP) bovine embryos. In a first step, was evaluated the effect of heifers dietary supplementation with a source of rumen protected fat, rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) Omega 6 (*n*-6) and 3 (*n*-3) on follicular population, number of recovered oocytes, *in vitro* development and embryo survival after 3 and 24h of post-devitrification IVC. There was no significant difference ($P>0.05$) on follicular population (17.9 ± 1.0 vs 15.8 ± 1.0), number of recovered oocytes (14.4 ± 1.4 vs 14.5 ± 1.3) and number of viable oocytes (12.1 ± 1.2 vs 12.5 ± 1.1) for IVP embryos, respectively for CONTR and GORD groups. Similarly, the cleavage rate (68.7 ± 3.2 vs 61.3 ± 3.0), embryonic development (47.0 ± 3.7 vs 39.4 ± 3.6) and embryo re-expansion post-heating didn't differ ($P>0.05$) between CONTR and GORD treatments (3h: 77.5 vs 78.4%; 24h: 77.5 vs 81.1%), although it has been observed a number increment on embryo survival rate after 24h of post-devitrification IVC on GORD group. In a second step, was evaluated the effect of addition of Conjugated Linoleic Acid (CLA), Docosahexaenoic acid (DHA) or CLA + DHA during maturation, development or both cultures on *in vitro* development and embryo survival after 3 and 24h of post-devitrification IVC. There was no effect between the type of PUFA used, and the time of supplementation on cleavage, embryo development until the blastocyst stage and embryo survival rates compared to the control group ($P>0.05$). The highest embryo survival rates after 3h of post-warming IVC were observed in groups supplemented with DHA during VM (76.2%) or VM+IVC (78.8%), differing significantly ($P<0.05$) of supplemented groups with CLA (52.7%) or CLA+DHA (55.3%), during VM. There was no significant difference ($P>0.05$) on the re-expansion rate after 24h of re-culture between the control and most treatments, except the group supplemented with CLA during IVC, which presented a significant reduction ($P<0.05$) in cryotolerance (73.0% vs 50.0%, respectively). In conclusion, the Nelore heifer's dietary supplementation and

addition of *n*-6 and *n*-3 PUFAs on bovine embryo IVF system not exert any effect *in vitro* development and embryo survival after cryopreservation.

Keywords: polyunsaturated fatty acids, bovine, cryotolerance, embryo, *in vitro* production

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

O estado nutricional da fêmea é um fator chave capaz de influenciar a reprodução, principalmente no que diz respeito à fertilidade em ruminantes. Esse fato vem sendo correlacionado com a sobrevivência e qualidade embrionária e tem grande impacto sobre a eficiência das biotecnologias reprodutivas assistidas (WEBB *et al.*, 2004), uma vez que os processos de obtenção de oócitos viáveis *in vivo* têm se constituído em uma valiosa ferramenta para o incremento na produção de animais de grande potencial genético pelo uso da fertilização *in vitro* (FIV) (NOGUEIRA, 2008).

Porém, alguns efeitos da nutrição sobre a reprodução ainda não estão totalmente elucidados, sobretudo em bovinos da espécie *Bos taurus indicus*, especialmente da raça Nelore. A suplementação alimentar pode influenciar o desenvolvimento folicular, a qualidade oocitária e por consequência a fertilidade (WEBB *et al.*, 2004).

Particularmente, o fornecimento de diferentes fontes de lipídios vem sendo realizado com o objetivo de incrementar a densidade energética da dieta e melhorar a condição reprodutiva do gado leiteiro. Com isso, essa suplementação tem exercido uma influência benéfica no retorno mais precoce à ciclicidade e sobre o crescimento da população folicular de bovinos (SANTOS *et al.*, 2008b).

Atualmente, tem-se enfatizado a importância da inclusão de duas famílias de ácidos graxos essenciais na alimentação: Omega 3 ($n-3$) e Omega 6 ($n-6$), como o ácido linolênico e linoléico, respectivamente. Os mesmos são denominados essenciais, pois devem ser obtidos a partir da alimentação, já que o organismo é incapaz de produzi-los. Esses ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs, “polyunsaturated fatty acids”) são vitais à saúde e necessários para o crescimento, reprodução e desenvolvimento cerebral e da visão (WATHES *et al.*, 2007).

Diversos ácidos graxos possuem efeitos diferentes nas respostas reprodutivas e podem afetar o desenvolvimento de oócitos e embriões. Ao se compreender quais

deles possuem efeitos benéficos para esse desenvolvimento, pode-se obter um aumento na fertilidade das fêmeas com eles alimentadas (BILBY *et al.*, 2006). De forma semelhante, a suplementação dos meios de cultivo *in vitro* (CV) com PUFA's vem sendo extensivamente estudada, com o intuito de aperfeiçoar os resultados com a criopreservação de oócitos e embriões bovinos.

Para lidar com as baixas taxas de sucesso com a criopreservação de alguns tipos de células, deve-se buscar modificar alguns procedimentos ou as próprias células, tornando-as mais criotolerantes. Pode-se, por exemplo, variar a concentração e tipos de crioprotetores, modificar tempos e temperaturas para os procedimentos, utilizar aditivos como açúcares ou surfactantes, e ainda suplementar meios de cultivo com diferentes fontes de ácidos graxos, dentre outros (SEIDEL, 2006).

Os danos diretos decorrentes do processo de redução da temperatura a parâmetros subfisiológicos são os principais fatores limitantes para o sucesso da técnica de criopreservação (HORVATH *et al.*, 2006). O principal sítio de injúria é a membrana citoplasmática (particularmente sua porção lipídica) e o estresse osmótico o principal responsável.

Os principais componentes das membranas celulares são fosfolipídios, colesterol, outros lipídeos e as proteínas. Exceto as últimas, esses componentes podem ser manipulados prontamente a partir de uma variedade de modos, incluindo a nutrição das fêmeas doadoras e composição dos meios de cultivo (SEIDEL, 2006).

No sistema convencional de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, o cultivo em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) resulta em maior síntese ou acúmulo de gotículas de lipídios em seu citoplasma, provenientes do meio. Todavia, este mecanismo ainda não foi bem elucidado. Porém, mesmo com a ausência de soro, os embriões PIV possuem uma maior quantidade de lipídios do que os produzidos *in vivo*, o que contribui para sua menor criotolerância (PEREIRA *et al.*, 2007).

Portanto, esse estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos de ácidos graxos poliinsaturados *n*-6 e *n*-3 sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Para tanto, foram realizadas duas estratégias, *in vivo* e *in vitro*, respectivamente: avaliou-se o efeito da suplementação nutricional de

doadoras de oócitos com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA *n*-6 e *n*-3 (Megalac-E[®]) sobre a recuperação e qualidade oocitária, e sobre o desenvolvimento e criotolerância embrionária; avaliou-se o efeito da adição de PUFA *n*-6 e *n*-3 nas diferentes etapas da PIV, sobre o desenvolvimento e criotolerância embrionária.

Revisão de Literatura

Papel dos ácidos graxos poliinsaturados nas funções biológicas do organismo animal e reprodução

Os ácidos graxos poliinsaturados recebem essa denominação por apresentarem mais de uma saturação ou dupla ligação em sua molécula. De acordo com a posição da dupla ligação entre carbonos, podem ainda ser classificados como Ômega 6, Ômega 3 e Ômega 9 (WATHES *et al.*, 2007).

A suplementação alimentar com essas famílias de ácidos graxos essenciais para humanos e animais está em crescente ênfase, já que necessitam ser obtidos a partir da alimentação, pois o organismo é incapaz de produzi-los, devido à falta da enzima dessaturase apropriada (SANTOS *et al.*, 2008a).

Atualmente, está bem estabelecido que os PUFA sejam absolutamente necessários para numerosos processos, incluindo crescimento, reprodução, visão e desenvolvimento cerebral (WATHES *et al.*, 2007). Como exemplo podemos citar as propriedades anticarcinogênicas, antiteratogênicas e efeitos anti-obesidade dos isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA - "conjugated linoleic acid") (PEREIRA *et al.*, 2008).

Em 1929, George O. Burr e sua esposa foram os primeiros a descrever os ácidos graxos essenciais em ratos. Eles observaram que ratos alimentados com dietas com reduzido teor de gordura pararam de crescer, apresentaram problemas de saúde e ovulações irregulares. E, que essas alterações puderam ser revertidas após a

suplementação alimentar com fontes de gordura ricas em ácido linoléico (*n*-6) e α -linolênico (*n*-3) (SANTOS *et al.*, 2008a).

Apesar das dificuldades de fornecimento de PUFA para ruminantes, a maioria dos estudos indica que os ácidos graxos *n*-6 e *n*-3 exercem mais efeitos benéficos sobre a reprodução, em fêmeas bovinas (SANTOS *et al.*, 2008a). O principal exemplo de PUFA *n*-6 é o ácido linoléico (LA- “linoleic acid”), bastante abundante nos óleos vegetais, como o de soja. Já o ácido α -linolênico (ALA – “alpha-linolenic acid”), encontrado principalmente nos cloroplastos de vegetais verdes e gramíneas, constitui o principal exemplo de *n*-3 (WATHES *et al.*, 2007). As concentrações de ALA variam em diferentes espécies de plantas de acordo com as estações do ano, sendo que há grandes perdas durante o processo de ensilagem das forrageiras (MAREI *et al.*, 2009).

No entanto, deve haver um equilíbrio entre a quantidade de PUFA *n*-6 e *n*-3 presentes na dieta, tanto para o homem quanto para animais de produção, como os bovinos, sendo a proporção ideal de 1:1. Porém, nas dietas consumidas pela população ocidental moderna observa-se uma tendência de aumento dessa proporção, podendo variar de 10:1 a 25:1. O mesmo ocorre com animais de produção, intensivamente manejados com pouco ou nenhum acesso a pastagem fresca, já que a concentração de PUFA nas forragens preservadas é baixa e, normalmente é realizada a suplementação com cereais oleaginosos ricos em LA (*n*-6) (WATHES *et al.*, 2007). Mesmo assim, pode ser realizada a correção dessa desproporção, elevando-se a quantidade de *n*-3 e reduzindo-se a de *n*-6 na dieta de humanos e animais, buscando promover uma alimentação mais saudável.

Um nível energético inadequado na dieta de ruminantes e uma condição corporal pobre podem afetar negativamente a função reprodutiva, já que o balanço energético negativo pode atrasar a ciclicidade e comprometer tanto a competência do folículo quanto a qualidade oocitária. Dessa forma, a suplementação com gordura vem sendo utilizada com o objetivo principal de elevar a densidade de energia da dieta, sendo observados efeitos positivos sobre a fisiologia reprodutiva pela elevação de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (SANTOS *et al.*, 2008b). Além disso, foram observados em estudos realizados *in vivo* e *in vitro* efeitos positivos

de determinados PUFA's sobre a maturação e potencial de desenvolvimento de oócitos até o estágio de blastocisto, bem como sua qualidade (MAREI *et al.*, 2009). Portanto, os reflexos de ácidos graxos disponíveis em fontes comuns da alimentação de ruminantes como girassol, soja, farinha de peixe, gordura animal, e os sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, sobre a função reprodutiva vem sendo extensivamente pesquisados (FUNSTON, 2004).

Entretanto, o maior impedimento para o estudo dos efeitos dos PUFA's sobre a reprodução em bovinos é a inabilidade em prever sua disponibilidade para absorção no intestino delgado, e sua distribuição pelo organismo do animal. Isso porque, a atividade da microbiota ruminal reduz dramaticamente a quantidade de PUFA's alcançando o intestino delgado, sítio da absorção (SANTOS *et al.*, 2008b). De fato, foi demonstrado em estudos que mais de 70% do LA e mais de 85% do ALA ingerido por vacas em lactação foi biohidrogenado no rúmen quando fornecido na forma de gordura não protegida (JUCHEM *et al.*, 2010). Portanto faz-se necessária a suplementação alimentar com uma forma de gordura protegida que passe inerte pelo rúmen.

Já a nível celular, os lipídeos funcionam como uma fonte de energia e são componentes críticos para sua estrutura física e funcional. O conteúdo e a composição de lipídeos em oócitos e embriões podem influenciar sua competência e, seu impacto pode ser crítico, particularmente durante a criopreservação (SANTOS *et al.*, 2008b). Todavia, sabe-se que os ácidos graxos são utilizados como fonte de energia durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (FERGUSON *et al.*, 2006), até o estágio de 8 a 16 células, que em bovinos corresponde à ativação do genoma do próprio embrião e início da síntese *de novo* de transcritos (LIM *et al.*, 1999).

O efeito dos PUFA's sobre o desenvolvimento dos complexos *cumulus*-oócito (COCs) pode ser parcialmente mediado por alterações na composição do fluido folicular, microambiente dos oócitos durante o crescimento e maturação (FOULADINASHTA *et al.*, 2009). Uma vez que o perfil de ácidos graxos do fluido folicular é correlacionado com o tipo e conteúdo na alimentação (CHILDS *et al.*, 2008a). Todavia a suplementação com PUFA's não altera a composição de ácidos graxos nos oócitos (STURMEY *et al.*, 2009), ou das membranas celulares (ZERON *et al.*, 2001), como se

pensava. Atualmente, acredita-se que os PUFA's atuem regulando o momento da retomada da maturação nuclear do oócito e a expansão das células do *cumulus*, eventos críticos para o desenvolvimento oocitário e fertilização (MAREI *et al.*, 2010).

Em suma, os PUFA's são ácidos graxos essenciais e necessários para o crescimento, desenvolvimento do sistema nervoso central e reprodução, interferindo em diversos processos como desenvolvimento folicular, esteroidogênese, maturação e qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário. Apesar das dificuldades da suplementação de PUFA's para ruminantes, a maioria dos estudos indica que os ácidos graxos *n*-6 e *n*-3 são os mais benéficos para a reprodução em fêmeas bovinas, desde que haja um equilíbrio entre eles no organismo animal.

Influência da suplementação alimentar com lipídeos sobre a função reprodutiva de fêmeas bovinas e qualidade oocitária

A dieta pode regular a fertilidade em fêmeas bovinas tanto por efeitos imediatos quanto latentes (COYNE *et al.*, 2011). A suplementação com gordura tem melhorado o desempenho reprodutivo de bovinos com aptidão para corte e leite (BILBY *et al.*, 2006), independente de sua contribuição com o aumento da densidade de energia, já que PUFA's específicos constituintes dessa dieta podem estimular a função ovariana (FUNSTON, 2004).

Podemos citar como potenciais mecanismos para a regulação da função reprodutiva o desenvolvimento folicular (STAPLES & THATCHER, 2005), elevação da concentração de progesterona (P_4) (LOPES *et al.*, 2009), supressão de sinais luteolíticos nas proximidades do reconhecimento materno da gestação (MATTOS *et al.*, 2000) e melhora da qualidade embrionária (CERRI *et al.*, 2004).

O status energético do animal está ligado à maturação folicular e ovulação (SANTOS *et al.*, 2008b), já que a energia fornecida pela suplementação com gordura aumenta a produção de propionato no rúmen, gliconeogênese hepática e, dessa forma, a produção de insulina e IGF-1 (NOGUEIRA, 2008). A glicose tem um efeito positivo sobre a secreção do hormônio luteinizante (LH) (FUNSTON, 2004), aumentando a

frequência de pulsos de LH e dessa forma o crescimento e maturação folicular (MATTOS *et al.*, 2000).

A suplementação alimentar de vacas de corte no período pós-parto com ácidos graxos possibilita estimular o aumento do número e tamanho dos folículos dominantes, reduzindo assim o intervalo entre o parto e a concepção (SANTOS *et al.*, 2008a). A insulina e o IGF-1 agem no folículo dominante estimulando a esteroidogênese e a proliferação das células da granulosa (ARMSTRONG *et al.*, 2002). O aumento do aporte de glicose, mediado pela elevação da insulina resulta no aumento do crescimento folicular. A concentração de insulina regula a expressão do receptor 1A do hormônio de crescimento (GH) no fígado, o que acarreta elevação do IGF-1, a partir de sua ligação para formação do sistema GH-IGF (SANTOS *et al.*, 2008b). Pode-se dizer que esse eixo é um importante regulador da reprodução, já que o IGF-1 tem um papel importante em mediar o crescimento folicular, aumentando o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a aquisição da competência oocitária, o que resulta em aumento da viabilidade embrionária (COYNE *et al.*, 2011).

Todavia, foi observado em estudos recentes que a suplementação da dieta com ácido linoléico ou linolênico não altera o tamanho do folículo dominante (AMBROSE *et al.*, 2006), o diâmetro e a taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório (CHILDS *et al.*, 2008b; CERRI *et al.*, 2009).

Também, a ovulação de um folículo dominante maior, resultou em um corpo lúteo (CL) maior em novilhas leiteiras, vacas secas ou em lactação (SARTORI *et al.*, 2002). Porém, a formação de um CL maior pode também ser decorrente de efeitos diretos dos PUFAs nessa estrutura, como o maior acúmulo de lipídeos nas células luteais observado após microscopia eletrônica. Dessa forma, pode-se esperar que ocorra uma maior produção de P_4 (BILBY *et al.*, 2006). Em estudos anteriores, a suplementação alimentar com ácido linoléico ou linolênico não alterou o tamanho do corpo lúteo e a concentração plasmática de P_4 (AMBROSE *et al.*, 2006; CHILDS *et al.*, 2008b). Entretanto, GUARDIEIRO *et al.* (2010) observaram uma elevação na concentração circulante de P_4 em novilhas zebuínas mantidas a pasto e suplementadas com 100 g ao dia de Megalac-E[®], provavelmente pela diminuição do metabolismo

hepático dos esteróides. A elevação na concentração de P_4 que, provavelmente, inibe a resposta luteolítica contribui para a manutenção da prenhez (CHILDS *et al.*, 2008a). Portanto, esse é um dos mecanismos de ação dos PUFA's sobre a fertilidade (GUARDIEIRO *et al.*, 2010).

Na abordagem reprodutiva, a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) tem uma função relevante, que é a de regular a vida útil do CL e assim o ciclo estral de fêmeas bovinas, e também, está envolvida com a involução uterina após o parto e retenção das membranas fetais (JUCHEM *et al.*, 2010). A perda embrionária precoce (8 a 16 dias pós-inseminação) está associada a uma inabilidade em inibir a ação luteolítica da $PGF_{2\alpha}$ durante o período crítico do reconhecimento materno da gestação.

A suplementação com PUFA's *n*-6 e *n*-3 aumenta a incorporação desses ácidos graxos no tecido endometrial, evento pelo qual, em alguns estudos parece estar ligado a alterações na secreção de $PGF_{2\alpha}$. Dessa forma, essa suplementação pode modular o balanço entre a produção de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ (MAREI *et al.*, 2009), aumentando a proporção $PGE_2:PGF_{2\alpha}$ em até duas ou três vezes em células endometriais de ovelhas suplementadas com ácidos linoléico, linolênico ou araquidônico (CHENG *et al.*, 2004).

Foi demonstrado recentemente que a elevação no nível de ácidos graxos inertes ao rúmen, fornecidos a partir da dieta para bovinos, resultou em melhora no potencial de desenvolvimento de oócitos até o estágio de blastocisto, bem como da qualidade embrionária (FOULADI-NASHTA *et al.*, 2007). Esses efeitos foram induzidos pela síntese PGE_2 , que é um mediador crítico para a maturação oocitária, etapa essencial para o sucesso da fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário (MAREI *et al.*, 2009).

A alteração do conteúdo de ácidos graxos fornecidos na alimentação pode modificar sua distribuição pelos tecidos reprodutivos (BILBY *et al.*, 2006). O efeito dos PUFA's fornecidos na dieta sobre a reprodução pode ser parcialmente mediado por alterações na composição de ácidos graxos no fluido folicular, microambiente que cerca o COC, durante seu desenvolvimento e maturação (CHILDS *et al.*, 2008a; FOULADI-NASHTA *et al.*, 2009).

Sabe-se que o LA é o ácido graxo mais abundante no fluido folicular e sua concentração diminui significativamente, de acordo com o aumento do tamanho do folículo (HOMA & BROWN, 1992). Isso sugere que o LA tem um papel importante na regulação da maturação oocitária e que concentrações mais elevadas desse PUFA são necessárias no início dessa etapa para que o oócito permaneça no estágio de vesícula germinativa até a retomada da meiose (MAREI *et al.*, 2010). Ainda, sabe-se que a elevação da concentração de LA encontrada no fluido folicular pode ser associada com a fornecida na dieta (CHILDS *et al.*, 2008a). Dessa forma, a suplementação da dieta de fêmeas bovinas com gordura pode modificar a composição de ácidos graxos do endométrio, fluido folicular, porém não dos oócitos (JUCHEM *et al.*, 2010).

Oócitos obtidos por aspiração folicular em vacas de leite, suplementadas com elevados níveis de gordura protegida ruminal (Megalac) resultaram em maiores taxas de blastocistos, apresentando uma melhor qualidade (FOULADI-NASHTA *et al.*, 2007). Novilhas de corte, suplementadas com a mesma fonte de gordura protegida produziram um menor número de embriões degenerados. Um aumento no número de mórulas e da proporção de embriões transferíveis também foi verificado, apesar de não haver diferença significativa devido ao reduzido número de animais utilizados nesse estudo (CHILDS *et al.*, 2008a). Portanto, esses dados reforçam a necessidade da realização de novos experimentos (MAREI *et al.*, 2009).

No entanto, informações adicionais e sem contradições sobre a influência da suplementação da dieta com PUFA e sua interferência na fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas, assim como na qualidade e maturação oocitária e desenvolvimento e criotolerância embrionárias ainda necessitam ser elucidadas.

Efeito do cultivo de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro* em meios suplementados com lipídeos

Empregada há algumas décadas, a PIV de embriões bovinos é uma biotecnologia bastante difundida e vem sendo aplicada comercialmente com sucesso. No relatório da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (THIBIER, 2008),

o Brasil foi classificado como o primeiro país em volume de produção de embriões obtidos *in vitro*. Atualmente, o principal obstáculo para a expansão comercial da PIV no Brasil é a possibilidade de obtenção de taxas de prenhez satisfatórias a partir de embriões criopreservados (NOGUEIRA, 2012).

De acordo com inúmeros estudos, embriões bovinos PIV possuem pior qualidade e maior criosensibilidade em relação os embriões obtidos *in vivo*, o que pode ser correlacionado com seu excessivo conteúdo e/ou composição de lipídeos (SEIDEL, 2006; HORVATH *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007). Além disso, características como citoplasma muito elétron-denso, densidade flutuante, crescimento lento, metabolismo excessivo de substratos energéticos e sensibilidade térmica elevada são indicadores de que embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação, o que reduz as taxas de concepção em relação aos embriões produzidos *in vivo* (SUDANO *et al.*, 2011).

A maior parte dos lipídeos intracelulares em oócitos e embriões bovinos são os triacilgliceróis, correspondendo a 50% da massa lipídica total em embriões produzidos *in vivo*. No entanto, essa proporção pode alcançar até 88% da massa de lipídeos em embriões produzidos *in vitro* (PEREIRA *et al.*, 2008). Já os PUFA's, compreendem menos de 20% do total de ácidos graxos, sendo o CLA, da família *n*6 o mais abundante deles (SANTOS *et al.*, 2008b). Todo esse acúmulo lipídico intracitoplasmático funciona como um reservatório potencial de energia para o desenvolvimento embrionário inicial, antes da ativação de seu próprio genoma (KIM *et al.*, 2001; ZERON *et al.*, 2001; STURMEY *et al.*, 2009).

Várias fontes demonstram uma grande evidência de que a quantidade de lipídeos em oócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser modificados por mudanças na composição dos meios de cultivo, particularmente pela adição de SFB (STURMEY *et al.*, 2009). Sabe-se que durante a maturação *in vitro* (MIV) ocorre a absorção de lipídeos provenientes do SFB, por parte de oócitos bovinos (KIM *et al.*, 2001). Todavia, independente do mecanismo pelo qual ocorre, o acúmulo excessivo de lipídeos intracelulares, durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, prejudica a qualidade dos embriões PIV pelo aumento de sua sensibilidade ao estresse oxidativo e criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2008; AL DARWICH *et al.*, 2011).

De fato, o cultivo de embriões bovinos em sistemas livres de soro reduziu o acúmulo de lipídeos intracitoplasmático em blastocistos, os quais demonstraram uma melhor resistência após a criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2008). Porém, a produção embrionária até o momento tem se mostrado insatisfatória, quando realizada em meios com ausência total de SFB.

Estudos recentes vêm sendo desenvolvidos com o intuito de buscar a compreensão sobre os mecanismos moleculares para o acúmulo lipídico e sobrevivência à criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2007). Sabe-se que os ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico), CLA e outros PUFAs podem alterar a composição de lipídeos da membrana, metabolismo celular e a expressão gênica em vários tecidos, incluindo hepático, cardíaco, adipócitos e tecido nervoso (AL DARWICH *et al.*, 2011).

Os PUFAs *n*-3 e *n*-6 tem um papel no controle da adipogênese assim como em eventos fisiológicos que reduzem a expressão gênica de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos. Eles reprimem as esteroil-CoA dessaturases (SCD – “stearoyl-CoA desaturase”), enzimas chave envolvidas na síntese de MUFAs, reduzindo a estabilidade do transcrito do gene SCD1 e da atividade enzimática. Dessa forma, a suplementação do meio de CIV com CLA inibe a síntese e captação de triacilgliceróis, reduzindo o acúmulo de lipídios intracitoplasmático, o que contribui para o aumento da criotolerância de embriões bovinos PV (PEREIRA *et al.*, 2008; AL DARWICH *et al.*, 2011). Também, a incorporação dos PUFAs na dupla camada de fosfolipídios da membrana plasmática altera sua fluidez, e também é um dos mecanismos pelo quais os ácidos graxos podem interferir no metabolismo celular (JUCHEM *et al.*, 2010).

No entanto, o conteúdo lipídico parece não ser o principal fator determinante da criotolerância. SUDANO *et al.* (2011) correlacionaram o aumento da apoptose em blastocistos vitrificados, com seu aumento em embriões frescos. Esses resultados enfatizam a importância da qualidade embrionária sobre o conteúdo lipídico com embrião como um dos fatores determinantes para a sobrevivência após a criopreservação.

Além dos ácidos graxos funcionarem como fontes de energia, recentes trabalhos sugerem que os PUFAs modulam o balanço entre a produção de PGE₂ e PGF_{2α}. Em

ratos, a inibição na produção da PGE_2 via inibidores da prostaglandina-endoperoxidase sintetase (PTGS2) ou por genes Knockout para o receptor da PGE_2 (PTGER2) demonstrou diminuir a expansão das células do *cumulus* e a maturação oocitária reduzindo a taxa de fertilização *in vitro* (MAREI *et al.*, 2009). Portanto, a PGE_2 é considerada um mediador crítico para a maturação oocitária e expansão das células do *cumulus*. De forma semelhante o LA (*n*-6), PUFA mais abundante encontrado na composição do fluido folicular e em oócitos bovinos, tem um papel importante na regulação da maturação oocitária (CHILDS *et al.*, 2008a; MAREI *et al.*, 2009). Visto que, sua concentração reduz significativamente com o aumento do tamanho do folículo (MAREI *et al.*, 2010).

Este cenário reflete um efeito acelerador dos PUFA sobre eventos associados à maturação oocitária, o que resulta em melhor potencial de desenvolvimento e qualidade embrionários (MAREI *et al.*, 2009). Todavia, ainda há uma grande necessidade de se compreender os mecanismos envolvidos na transferência e utilização dos lipídios por parte dos oócitos e embriões em meios suplementados com fontes de ácidos graxos (BILBY *et al.*, 2006).

Os principais componentes das membranas celulares são fosfolipídeos, colesterol, outros lipídeos e as proteínas. Exceto as últimas, esses componentes podem ser manipulados prontamente a partir de uma variedade de modos (SEIDEL, 2006). Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de melhorar os resultados, até então obtidos com a criopreservação de oócitos e embriões bovinos, a partir do cultivo em meios específicos e por um período de tempo variável, de minutos até dias (SEIDEL, 2006).

Em suma, a suplementação de meios de maturação e/ou cultivo de desenvolvimento com PUFA *n*-3 e *n*-6 parece ser uma alternativa razoável, já que pode proporcionar um acréscimo na taxa de sucesso da criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Todavia, os mecanismos envolvidos na ação desses ácidos graxos sobre o metabolismo celular, potencial de desenvolvimento de oócitos e embriões e sobre a criotolerância devem ser mais profundamente estudados.

Criopreservação e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Até o momento, diversas técnicas para a criopreservação de embriões provenientes da PIV foram desenvolvidas ou vem sendo aperfeiçoadas, a fim de buscar seu melhor aproveitamento e facilitar a comercialização de embriões difusores de uma genética privilegiada ou mesmo de grande expressão econômica ou científica. Porém, sabe-se que há muito a ser melhorado, visto que a taxa de prenhez pós-descongelação varia em torno de 10% (ACCORSI *et al.*, 2008).

O acúmulo de uma grande quantidade de lipídeos intracelulares pode comprometer o sucesso do processo de criopreservação, e sua remoção tem sido objeto de consideráveis esforços (STURMEY *et al.*, 2009). Em contraste com essa afirmação, uma maior taxa de apoptose em blastocistos frescos foi fortemente correlacionada com o aumento da apoptose nesses blastocistos vitrificados. Essas observações enfatizam a importância da qualidade do embrião, e não somente seu conteúdo lipídico como um determinante de sobrevivência após a criopreservação (SUDANO *et al.*, 2011).

O processo de criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. O primeiro sucesso desta técnica foi mencionado por WHITTINGHAM (1971), utilizando embriões de camundongos. Desde então muitas pesquisas têm sido realizadas voltadas à criopreservação de embriões bovinos PIV. Já que os mesmos são mais sensíveis à criopreservação, e resultam em taxas de gestação significativamente menores, quando comparados a embriões criopreservados produzidos *in vivo* (DOBRISNKY, 2002; HASLER, 1995; FAIR *et al.*, 2001; MARTÍNEZ *et al.*, 2006).

A extensão das injúrias bem como a taxa de sobrevivência e desenvolvimento de embriões PIV após o reaquecimento podem variar muito dependendo da espécie utilizada, estágio de desenvolvimento e origem (*in vivo* vs *in vitro*) (PEREIRA & MARQUES, 2008). As injúrias causadas aos embriões, durante os processos de criopreservação e reaquecimento ocorrem principalmente devido à formação de cristais

de gelo intracelulares, concentração de soluto resultante do processo de desidratação e choque osmótico (PICKETT, 1986; PEREIRA & MARQUES, 2008).

Atualmente, duas técnicas de criopreservação para oócitos e embriões são utilizadas: congelamento e vitrificação. Independentemente da técnica, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores que possuem a função de proteger as células e tecidos durante a congelamento e a descongelamento (NIEMANN, 1991). Porém, a toxicidade e o choque osmótico estão associados com a utilização dos crioprotetores, mas quando se utilizam baixas concentrações, a prevenção da formação de cristais de gelo é limitada (PEREIRA & MARQUES, 2008).

O método de congelamento não previne o choque térmico e a formação de cristais de gelo, ao contrário da vitrificação. As modificações nos lipídeos de células submetidas a temperaturas de congelamento estão entre as principais causas de danos celulares (AL DARWICH *et al.*, 2011).

Os danos diretos, decorrentes do processo de redução da temperatura a parâmetros subfisiológicos, são os principais fatores limitantes para o sucesso dessa técnica (HORVATH *et al.*, 2006). O principal sítio de injúria é a membrana citoplasmática (particularmente sua porção lipídica), e o estresse osmótico é o principal responsável. Isso ocorre, pois as células e seus compartimentos são submetidos a mudanças bruscas de volume devido à movimentação de água e crioprotetores intracelulares. Portanto, células com membranas plasmáticas mais flexíveis e também mais permeáveis irão usualmente sofrer menos danos nesse sítio (SEIDEL, 2006).

Para uma função normal, a porção lipídica das membranas celulares deve estar em um estado relativamente fluido. Quando há a redução da temperatura, há uma transição entre a fase líquida para a fase de gel, denominada transição da fase lipídica. Porém, a integridade de algumas regiões da membrana pode ser alterada irreversivelmente, culminando com a morte celular (HORVATH *et al.*, 2006). Esse fato é dependente da composição lipídica da membrana celular. Então, tanto a composição quanto o conteúdo de lipídeos das células e/ou da membrana plasmática são importantes e devem ser considerados (SEIDEL, 2006).

Os fosfolipídeos, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poliinsaturadas, quando submetidos à redução da temperatura, assumem uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma “hexagonal II” ou micela invertida. Quando a membrana está em transição da fase fluida para a fase cristalina, para muitos lipídios, a formação dessa micela invertida é transitória. Entretanto, para certos fosfolipídios, esta estrutura persiste. Como consequência, tem-se o aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana, causando danos irreparáveis e perda de viabilidade celular (AMANN & PICKET, 1987; PARKS & GRAHAM, 1992; WATSON, 1994).

A vitrificação é empregada principalmente para embriões produzidos *in vitro*, pois estes são mais sensíveis a diminuição de temperaturas do que os produzidos *in vivo*. Alguns estudos demonstram que esta técnica de criopreservação pode ser utilizada com sucesso para embriões bovinos sem a redução significativa das taxas de prenhez (DOBRINSKY, 2002).

Diversos estudos relataram um efeito positivo por parte dos PUFAs, como por exemplo, o ácido linoléico sobre a criopreservação de embriões bovinos. Foi sugerido que a concentração de PUFAs em oócitos bovinos imaturos pode afetar a sensibilidade a refrigeração (KIM *et al.*, 2001), pois diminuiu o depósito de lipídeos citoplasmáticos e melhorou a resistência dos embriões ao processo de criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2007; 2008).

Até o momento poucos trabalhos demonstraram efeitos benéficos da adição de PUFAs *n*-6 e *n*-3 no sistema de PIV convencional sobre a criotolerância embrionária, como consequência da alteração/redução do conteúdo lipídico do embrião (PEREIRA *et al.*, 2007; 2008; AL DARWICH *et al.*, 2011; LAPA *et al.*, 2011). Todavia, os mecanismos envolvidos na ação desses ácidos graxos sobre o metabolismo celular e na fluidez da membrana plasmática de oócitos e embriões bovinos PIV, necessitam ser aprofundados.

Referências

ACOORSI, M.F. **Avaliação de embriões bovinos cultivados in vitro na presença de ácidos graxos e sua sobrevivência pós-criopreservação**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M.H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v.93, p.30-36, 2010.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Practice**, v.7, n.3, p.145-173, 1987.

AMBROSE, D.J.; KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.; PITNEY, P.A.; PETIT, H.V.; SMALL, J.A.; ZALKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3066-3074, 2006.

ARMSTRONG, D.G.; GONG, J.G.; GARDNER, J.O.; BAXTER, G.; HOGG, C.O.; WEEB, R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, v.123, p.371-378, 2002.

BILBY, T.R.; BLOCK, J.; do AMARAL, B.C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F.T.; HANSEN, P.J.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **J. Dairy Science**, v.89, p.3891-3903, 2006.

CERRI, R.L.A.; BRUNO, R.G.S.; CHEBEL, R.C.; GALVAO, K.N.; RUTGLIANO, H.; JUCHEM, S.O.; THATCHER, W.W.; LUCHINI, D.; SANTOS, J.E.P. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v.87, n.1, p.297, 2004. Abstract.

CERRI, R.L.A.; JUCHEM, S.O.; CHEBEL, R.C.; RUTIGLIANO, H.; BRUNO, R.G.S.; GALVÃO, K.N.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in highproducing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1520-1531, 2009.

CHENG, Z.; ELMES, M.; KIRKUP, S.E.; ABAYASEKARA, D.R.; WATHES, D.C. Alteration of prostaglandin production and agonist responsiveness by n-6 polyunsaturated fatty acids in endometrial cells from late-gestation ewes. **J. Endocrinology**, v.182, p.249-256, 2004.

CHILDS, S.; CARTER, S.; LYNCH, C.O.; SREENAN, J.M.; LONERGAN, P.; HENNESSY, A.A.; KENNY, D.A. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v.70, p.992–1003, 2008a.

CHILDS, S.; LYNCH, C.O.; HENNESSY, A.A.; STANTON, C.; WATHES, D.C.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; KENNY, D.A. Effect of dietary enrichment with either n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolite and hormone concentration and ovarian function in heifers. **Animal**, v.2, p.883-893, 2008b.

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; WATERS, S.M. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation on bovine uteroendometrial and hepatic gene expression of the insulin-like growth factor system. **Theriogenology**, v.75, p.500-512, 2011.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

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

FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J.; A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.73, p.1195-1201, 2006.

FOULADI-NASHTA, A.A.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biol. Reprod.**, v.17, p.77-79, 2007.

FOULADI-NASHTA, A.A.; WONNACOTT, K.E.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; SINCLAIR, K.D.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, v.138, p.771–781, 2009.

FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v.82, p.154-161, 2004.

GUARDIEIRO, M.M.; BASTOS, M.R.; MOURÃO, G.B.; CARRIJO, L.H.D.; MELO, E.O.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Função ovariana de novilhas Nelore alimentadas com dieta suplementada com gordura protegida ruminal. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.45, n.4, p.408-414, 2010.

HASLER, M.B.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p.141-152, 1995.

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

HORVATH, G.; SEIDEL Jr., G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. **Theriogenology**, v.66, p.1026-1033, 2006.

JUCHEM, S.O.; CERRI, R.L.A.; VILLASEÑOR, M.; GALVÃO, K.N.; BRUNO, R.G.S.; RUTIGLIANO, H.M.; DEPETERS, E.J.; SILVESTRE, F.T.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reprod Dom Anim**, v.45, p.55–62, 2010.

KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131–138, 2001.

LAPA, M.; MARQUES, C.C.; ALVES, S.P.; VASQUES, M.I.; BAPTISTA, M.C.; CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A.E.M.; BESSA, R.J.B; PEREIRA, R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reprod Dom Anim**, doi: 10.1111, 2011.

LIM, J.M.; REGGIO, B.C.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. Development of in vitro-derived bovine embryos cultured in 5% de CO₂ in air or in 5% O₂, 5% de CO₂ and 90% N₂. **Hum. Reprod.**, v.14, n.2, p.458-464, 1999.

LOPES, C.N.; SCARPA, A.B.; CAPPELLOZZA, B.I.; COOKE, R.F.; VASCONCELOS, J.L.M. Effect of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on

reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.87, p.3935-3943, 2009.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULAD-NASHTA, A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v.81, p.1064-1072, 2009.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULAD-NASHTA, A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction Research**, v.139, p. 979–988, 2010.

MARTÍNEZ, A.G.; VALCÁCEL, A.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos. **Small Rum. Res.**, v.63, p.288-296, 2006.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.38–45, 2000.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

NOGUEIRA, E. **Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção in vitro de embriões em novilhas da raça nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2008. 87 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

NOGUEIRA, M. Globalização na XXII Reunião Anual da SBTE. *Jornal O Embrião*, Jaboticabal, 2008, Espaço Aberto, p.17-18. Disponível em: <<http://www.sbte.org.br/?op=paginas&tipo=secao&secao=19&pagina=103>> acesso em: 06/mar/2012.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). **Animal Reproduction Science**, v.98, p.293-301, 2007.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.322-332, 2008.

PEREIRA, M.R.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, Review paper, 2008.

PICKETT B.W. Principles of cryopreservation. In: Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings, 4, 1986, Fort Collins. **Proceedings...**Fort Collins:USA, 1986.

SANTOS, J.E.P.; BILBY, T.R.; THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; SILVESTRE, F.T. Long Chain Fatty Acids of Diet as Factors Influencing Reproduction in Cattle. **Reprod. Dom. Anim.**, v.43, p.23–30, 2008a.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v.69, p.88-97, 2008b.

SARTORI, R.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2813-2822, 2002.

SEIDEL Jr., G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.O.; CROCOMO, L.F.; LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v.75, p.1211-1220, 2011.

STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.38–45, 2005.

STURMEY, R.G.; REIS, A.; LEESE, H.J.; MCEVOY, T.G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reprod Dom Anim**, v.44, p.50–58, 2009.

THIBIER, M. **Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer – Year 2007:** The worldwide activity in farm animals embryo transfer. Embryo Newsletter, December, 2008.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77,p.190-201, 2007.

WATSON, A.J. WATSON, P.H.; WARNER, S.K.; ARMSTRONG, D.T.; SEAMARK, R.F. Preimplantation development of in vitro matured and in vitro fertilized ovine zygotes: comparison between co-culture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmospheres. **Biol. Reprod.**, v.50, p.715-724, 1994.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci**, v.82, p.E63-E74, 2004.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v.233, p.125-126, 1971.

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

CAPÍTULO 2 - SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE NOVILHAS DA RAÇA NELORE (*Bos taurus indicus*) COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

RESUMO – Esse estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação alimentar de novilhas Nelore com uma fonte de gordura protegida ruminal, rica em PUFA's Omega 6 (*n*-6) e 3 (*n*-3) sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões produzidos *in vitro* (PIV). Dezesseis novilhas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: CONTR (dieta de manutenção) e GORD (dieta de manutenção contendo 100 g/animal/dia de Megalac-E® em sua composição). Os grupos foram avaliados em um delineamento do tipo “cross-over” e foram utilizadas dietas isoenergéticas e isoprotéicas. Após 60 dias de arração, foram realizadas sessões de aspiração do conteúdo folicular guiada por ultrassonografia, avaliando-se a população folicular. Os oócitos obtidos desses animais foram maturados e fertilizados *in vitro* e os prováveis zigotos cultivados *in vitro* (CIV) por até 8 dias, quando os blastocistos foram vitrificados. Posteriormente foram reaquecidos para avaliação da sobrevivência embrionária, a partir das taxas de re-expansão após 3 e 24 h de CIV pós-desvitrificação. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) quanto ao número de folículos ($17,9\pm1,0$ vs $15,8\pm1,0$), número de oócitos recuperados ($14,4\pm1,4$ vs $14,5\pm1,3$) e número de oócitos viáveis ($12,1\pm1,2$ vs $12,5\pm1,1$), respectivamente para os grupos CONTR e GORD. Da mesma forma, a taxa de clivagem ($68,7\%\pm3,2$ vs $61,3\%\pm3,0$), de desenvolvimento embrionário ($47,0\%\pm3,7$ vs $39,4\%\pm3,6$) e de reexpansão embrionária após a vitrificação não diferiram ($P>0,05$) entre os tratamentos CONTR e GORD (3h: 77,5 vs 78,4%; 24h: 77,5 vs 81,1%). Portanto, conclui-se que a suplementação alimentar de novilhas Nelore com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA's *n*-6 e *n*-3 não interferiu na recuperação e qualidade oocitária, desenvolvimento *in vitro* e sobrevivência embrionária pós-criopreservação.

Palavras-Chave: ácidos graxos poliinsaturados, bovino, criotolerância, embrião, produção *in vitro*.

Introdução

A alimentação pode influenciar a fertilidade de fêmeas bovinas tanto por efeitos imediatos quanto latentes (COYNE *et al.*, 2011). Em especial, a suplementação com diferentes fontes de ácidos graxos na dieta vem demonstrando melhorar o desempenho reprodutivo de bovinos com aptidão para corte e leite.

Os efeitos positivos da ingestão de gordura sobre a reprodução não se limitam ao aumento da densidade de energia na dieta e, conseqüentemente o *status* energético dos animais que a ingerem (SANTOS *et al.*, 2008a). Como resultado, há elevação na concentração de insulina, a qual regula a expressão do receptor 1A do hormônio de crescimento (GH) no fígado, o que acarreta elevação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), a partir de sua ligação para formação do sistema GH-IGF (SANTOS *et al.*, 2008b). Pode-se dizer que esse eixo é um importante regulador da reprodução, já que o IGF-1 tem um papel importante em mediar o crescimento folicular, aumentando o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a aquisição da competência oocitária, o que resulta em aumento da viabilidade embrionária (COYNE *et al.*, 2011).

Foi demonstrado recentemente que a elevação no nível de ácidos graxos inertes ao rúmen, fornecidos a partir da dieta para bovinos, resultou em melhora no potencial de desenvolvimento de oócitos até o estágio de blastocisto, bem como da qualidade embrionária (FOULADI-NASHTA *et al.*, 2007). Esses efeitos foram induzidos pela síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂), que é um mediador crítico para a maturação oocitária, etapa essencial para o sucesso da fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário (MAREI *et al.*, 2009).

A alteração do conteúdo de ácidos graxos fornecidos pela alimentação pode modificar sua distribuição pelos tecidos reprodutivos (BILBY *et al.*, 2006). O efeito dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs – “polyunsaturated fatty acids”) fornecidos na dieta sobre a reprodução pode ser parcialmente mediado por alterações na composição de ácidos graxos no fluido folicular, microambiente que cerca o complexo

cumulus-oócito (COC), durante seu desenvolvimento e maturação (CHILDS *et al.*, 2008; FOULADI-NASHTA *et al.*, 2009).

Além da composição lipídica da membrana celular, tanto a composição quanto o conteúdo de lipídeos intracelulares são importantes e devem ser considerados (SEIDEL, 2006). PEREIRA *et al.* (2008) suplementaram o meio de cultivo *in vitro* (CV) de embriões bovinos com ácido linoléico conjugado (CLA) e observaram um acréscimo na taxa de sobrevivência embrionária, mesmo em embriões que haviam sido micromanipulados. Esse acréscimo foi correlacionado à redução no acúmulo de lipídeos intracitoplasmáticos durante o CV (LAPA *et al.*, 2011).

Todavia, o conteúdo de lipídeos no embrião demonstrou não ser o principal fator determinante para a criotolerância, e sim a qualidade embrionária (SUDANO *et al.*, 2011). Portanto, a redução do acúmulo lipídico intracelular e a melhora na qualidade embrionária, a partir de manipulações na dieta, podem ser realizadas com o intuito de proteger as células do estresse térmico no momento da criopreservação embrionária (BILBY *et al.*, 2006).

Os efeitos da nutrição estratégica com adição de PUFA's na dieta de bovinos de leite tem resultados controversos, podendo ser encontrados efeitos positivos ou nenhum efeito. Todavia, poucos trabalhos foram realizados com animais de corte, especialmente da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação alimentar de novilhas doadoras de oócitos da raça Nelore com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA's *n*-6 e *n*-3 (Megalac-E[®]) sobre a população folicular ovariana, recuperação e qualidade oocitária e produção e criotolerância de embriões produzidos *in vitro*.

Material e Métodos

Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram da Sigma (Chemical Co. St Louis, NO). Caso contrário, encontram-se especificados. Todos os reagentes são testados para cultivo celular ou embrionário.

Manejo dos animais e condições experimentais

Os experimentos foram realizados no Departamento de Produção e Saúde Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Araçatuba-SP, entre os meses de abril a dezembro de 2011. Todas as manipulações envolvendo os animais foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP (Protocolo nº 002084/11).

Dezesseis novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) cíclicas, com idade média de 24 meses foram utilizadas em um experimento do tipo “cross-over” com duas repetições, e um período de descanso de 30 dias. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais homogêneos (controle = CONTR; e gordura = GORD), de acordo com o peso, escore de condição corporal (ECC) e a população folicular avaliada por ultrassonografia. Os animais foram mantidos em piquetes formados com capim *Brachiaria decumbens*, água e suplementação mineral à vontade com 80 g de fósforo (Guabiphos, Guabi®, Centro Oeste Rações S.A., Sales de Oliveira, SP, Brasil), onde as dietas experimentais foram fornecidas diariamente. Os piquetes utilizados para cada grupo foram alternados após o “cross-over”, para eliminação do efeito do ambiente.

Durante todo o período experimental, a temperatura média diária máxima foi de 27,3°C, a temperatura média diária mínima 17,1°C e o índice pluviométrico médio mensal de 67,1 mm. Os meses de setembro e dezembro apresentaram as maiores médias mensais de temperaturas máximas (33°C) e o mês de junho apresentou a menor média mínimas de temperatura (11°C) e o maior número de dias com

temperaturas abaixo de 13°C (19 dias). Quanto ao índice pluviométrico, no mês de maio não choveu em Araçatuba e os meses de junho e julho apresentaram os menores índices do período (5,8 e 6,6 mm). Já os meses de outubro e dezembro apresentaram os maiores índices pluviométricos do período (174,9 e 257,4 mm). Os dados meteorológicos foram obtidos a partir de consultas ao Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (2011).

Tratamento *in vivo*

Inicialmente foi realizado um período de adaptação de quinze dias, com fornecimento diário da dieta de manutenção, com consumo progressivo até a estabilização. Antes do fornecimento de cada refeição, as sobras foram avaliadas e pesadas para mensuração do consumo médio de cada grupo. Após o período de adaptação, os animais foram divididos em dois grupos experimentais (CONTR e GORD) e foi iniciada a suplementação diferenciada durante 60 dias. O grupo CONTR (n=16) recebeu apenas a dieta base, com 100% das exigências de manutenção de energia, calculados conforme NRC (1997). Já o grupo GORD (n=16) recebeu uma dieta isoenergética e isoprotéica à do grupo controle, diferindo na composição, apenas por conter 100 g/animal/dia de uma fonte de gordura protegida (Megalac-E[®], Química Geral do Nordeste, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A dieta base fornecida diariamente a esses animais foi composta de bagaço de cana hidrolisado e ração com 16% de proteína bruta, composta de quirela de milho, farelo de soja e mistura mineral 6% de fósforo (Guabiphos, Guabi[®], Centro Oeste Rações S.A., Sales de Oliveira, SP, Brasil). A ingestão em média de matéria seca (MS) foi de 4,89 Kg/dia, sendo 3,54 Kg de bagaço de cana hidrolisado e 1,35 Kg de ração por animal (para cada 380 Kg de peso vivo). A composição das dietas totais encontra-se na Tabela 1 e o detalhamento dos principais ácidos graxos encontrados na gordura protegida fornecida como suplemento (Megalac-E)[®] pode ser visualizado na Tabela 2.

Durante todo o experimento foram realizadas avaliações mensais do ECC e peso corporal dos animais para monitoramento do efeito das dietas no estado físico das fêmeas. Após avaliação do desenvolvimento folicular e aspiração folicular para

obtenção de oócitos, os animais foram submetidos a um período de descanso, após o qual foram novamente colocados na dieta de adaptação (duração de 30 dias). Assim, o experimento foi repetido, com alternância de dietas entre todos os animais. As atividades realizadas a campo durante o experimento encontram-se sumarizadas na Figura 1.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais utilizadas no experimento, em base de matéria seca (MS).

Composição	Grupo Controle	Grupo Gordura
NDT	60%	60%
PB	10,9%	10,9%
Ca	0,40%	0,40%
P	0,24%	0,24%

NDT: Nutrientes digestíveis totais; **PB:** Proteína bruta; **Ca:** cálcio; **P:** Fósforo

Tabela 2. Porcentagem dos principais ácidos graxos encontrados na gordura protegida (Megalac-E®) fornecida na dieta.

Nome do ácido graxo	Símbolo	%
Láurico	C12:0	0,89
Palmítico	C16:0	13,85
Esteárico	C18:0	4,01
Elaidico	C18:1 n9t	3,18
Oléico	C18:1 n9c	17,92
Linoléico	C18:2 n6c	49,09
Arquídico	C20:0	0,84
Cis-11-Eicosenóico	C20:1	0,6
Linolênico	C18:3 n3	4,39
Heneicoisanóico	C21:0	1,8
Behênico	C22:0	0,68

Fonte: Guardieiro *et al.*, 2009

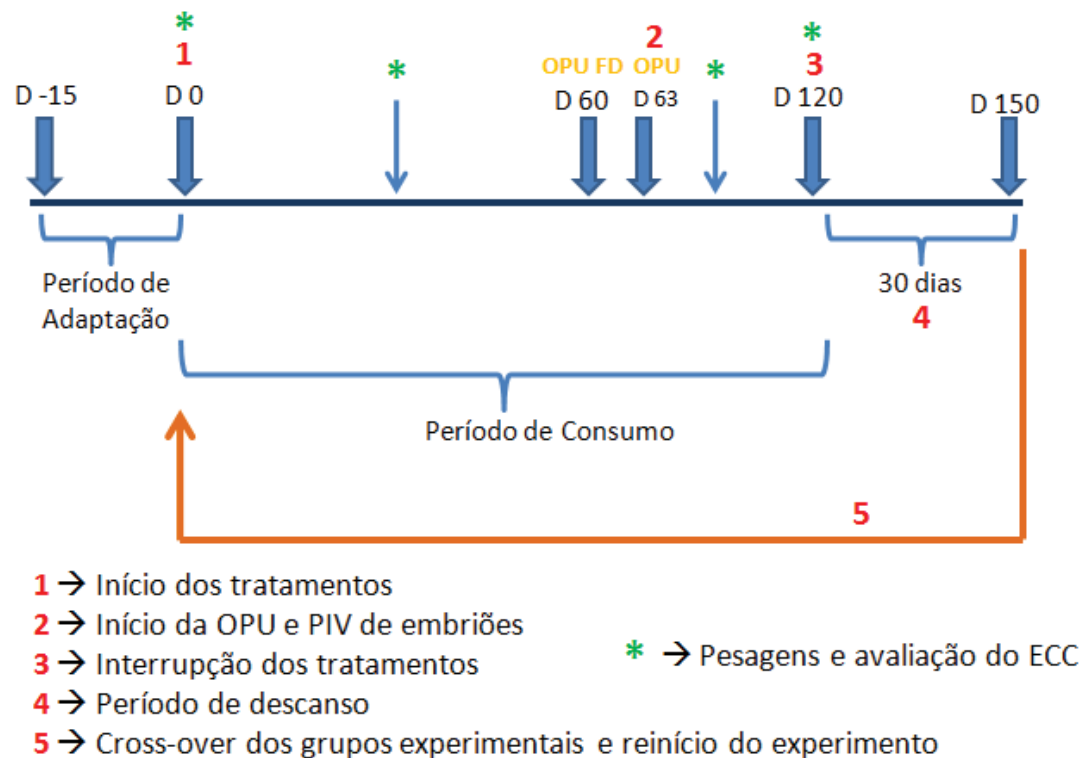


Figura 1. Atividades realizadas a campo durante o experimento

Sincronização da onda de crescimento folicular

Após 60 dias de arraçoamento, os animais tiveram seus ciclos estrais sincronizados para realização de aspirações do conteúdo folicular. Para não haver interferência de hormônios exógenos sobre o desenvolvimento folicular dos grupos experimentais, a sincronização foi realizada a partir da retirada do folículo dominante de cada doadora. Foi realizada a punção e aspiração do conteúdo folicular do folículo dominante guiada por ultrassonografia, seguida da aplicação de 0,5 mg de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Sincrocio® - Ouro Fino) por via intramuscular, para a regressão dos corpos lúteos funcionais.

Aspiração folicular *in vivo* guiada por ultrassom

Após três dias da aplicação de PGF_{2α} foi realizada a primeira “Ovum pick-up” (OPU). No total, os animais foram submetidos a seis sessões de OPU com intervalos de 7 a 15 dias.

As fêmeas foram devidamente preparadas, com esvaziamento do reto e lavagem da região perineal, para realização do procedimento anestésico. Prossegui-se com a aplicação de 3 mL de lidocaína (Lidovet[®], Laboratório Bravet LTDA., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no espaço intervertebral, entre a última vértebra sacral e a primeira coccígea. Em seguida, foi realizada a avaliação da população folicular ovariana (contagem e mensuração do diâmetro folicular) com o auxílio de um aparelho de ultrassonografia (Pie Medical[®], modelo Falcon 100), com transdutor convexo de 6 e 8 MHz. Todos os folículos maiores do que 4 mm visualizados nos ovários foram puncionados para obtenção dos complexos *cumulus*-oócito (COCs). Para tanto, foi utilizada agulha de calibre 18G acoplada à sonda convexa transvaginal, com bomba de sucção a vácuo, 70 mm/Hg (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brasil), produzindo um fluxo de 15 mL/minuto. O conteúdo folicular foi recuperado a partir de um circuito de Teflon (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brasil), de 2 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, ligando a agulha diretamente a um tubo plástico de 50 mL, contendo 10 mL de meio de coleta, constituído de DPBS, suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL) e 125 UI de heparina sódica/mL (Heparin[®], Cristália, Itapira, SP, Brasil), em temperatura variando entre 35 e 37°C. Após o procedimento de aspiração dos conteúdos foliculares, cada tubo de coleta foi identificado com os dados do animal e número de estruturas puncionadas, sendo então conduzido ao laboratório. O material coletado foi depositado em um filtro de coleta de embriões, com malha de 80 µm (Millipore[®], Bedford, MA, USA) e lavado. Então, os COCs recuperados no filtro foram transferidos para placas de poliestireno 100x20 mm (Corning Incorporated, NY, USA), contendo DPBS suplementado com 1% de SFB e avaliados sob microscópio estereoscópico. Após classificação dos COCs em graus I, II, III e desnudos, os viáveis (citoplasma com granulações homogêneas e número de camadas e grau de expansão das células do *cumulus*) foram lavados 2

vezes em meio de lavagem H-199, constituído por TCM-199 (Gibco BRL) suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio e 75 µg de Gentamicina/mL. Posteriormente foram lavados uma vez em meio de maturação B-199, constituído de TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 75 µg de Gentamicina/mL, 0,5 µg de FSH/mL (Pluset[®], Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil), 100 UI de hCG/mL (Vetecor[®], Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de SFB (Gibco BRL), antes de serem transferidos para o cultivo de maturação.

Maturação *in vitro* dos oócitos

Foram utilizadas placas de cultivo celular de 24 poços (Costar[®] 3526, Corning Incorporated, NY, USA) e transferidas no máximo 50 estruturas por poço, contendo 500 µL de meio de maturação. Os COCs foram cultivados por 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Fertilização *in vitro*

Foi utilizado sêmen de um único touro da raça Nelore e única partida, sendo sua fertilidade *in vitro* previamente comprovada. A palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 36°C por 40 segundos e o sedimento foi obtido por centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 250 µL de solução 45% e 250 µL de solução 90% durante 7 minutos a 2500xg, em temperatura ambiente. O sedimento recuperado foi ressuspenso em meio de fecundação (TALP-FIV) e avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos/mL de meio TALP-FIV, suplementado com 4 µL/mL solução PHE (1 mM hipotaurina, 2 mM penicilamina e 250 µM epinefrina) e 10 µg/mL heparina. Após o cultivo de maturação, os COCs foram lavados duas vezes em meio B-199 e uma vez em meio TALP-FIV, sendo adicionados 25 COCs por gota de FIV. Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100 µL de meio TALP-FIV designada a cada doadora. A

fertilização foi realizada a 38,5°C, por até 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade.

Cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro*

O cultivo de desenvolvimento foi realizado nas mesmas placas de poços utilizadas durante o cultivo de maturação, contendo 500 µL de meio SOFaa suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de Citrato de Sódio, 2,8 mM de Myo-inositol, 2% de BEM aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB à temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e 5% CO₂ em ar, por 8 dias. Após 48 e 96 horas do cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado ("Feeding"). A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário 168 hpi e 192 hpi.

Vitrificação e avaliação da re-expansão embrionária pós-desvitrificação

Foi utilizado o protocolo Vitri-Ingá[®] para vitrificação e desvitrificação, da empresa INGAMED - Produtos Médicos Hospitalares, Perobal, PR, Brasil. Todos os meios e materiais utilizados foram adquiridos da empresa.

Os embriões obtidos no dia 7 de desenvolvimento foram retirados da placa de CIV e transferidos para uma placa de poliestireno de 100x20 mm (Corning Incorporated, NY, USA) contendo gotas de meio SOFaa. Foram então classificados de acordo com o Manual da IETS (WRIGHT, 2009) sendo selecionados para vitrificação apenas os blastocistos expandidos de graus 1 e 2. Em seguida, foram transferidos para uma gota de solução de vitrificação 1 (VI – 1) e posteriormente lavados três vezes em gotas da solução de vitrificação 2 (VI – 2). No decorrer do tempo determinado no protocolo, todos os embriões foram retirados com auxílio de uma pipeta, em menos de 2 µL da solução VI - 2, e depositados na porção final de uma haste de polipropileno de 0,7 mm de espessura. Ao completar o tempo estabelecido no protocolo, a porção final das hastes foi mergulhada em nitrogênio líquido e seus protetores acoplados. Finalmente, as hastes foram introduzidas em raques previamente identificadas com os grupos

experimentais e armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para desvitrificação dos embriões, as hastes foram retiradas do botijão de nitrogênio onde estavam armazenadas e seus protetores foram desacoplados. A porção final das hastes foi imersa na solução de desvitrificação 1 (DV – 1), até que a microgota fosse desfeita. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução 2 (DV – 2) e, por fim, na solução 3 (DV – 3).

Após esse procedimento, os embriões foram lavados em meio SOFaa e transferidos para placas de CIV (gotas de 100 µl de meio SOFaa suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, cobertas com óleo mineral). Os embriões foram cultivados *in vitro*, à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% CO₂ em ar, por até 24 horas. Dessa forma foi avaliada a taxa de sobrevivência *in vitro*, expressa pela taxa de re-expansão as 3 e 24 horas após reaquecimento.

As atividades realizadas no laboratório de PIV de embriões encontram-se sumarizadas na Figura 2.

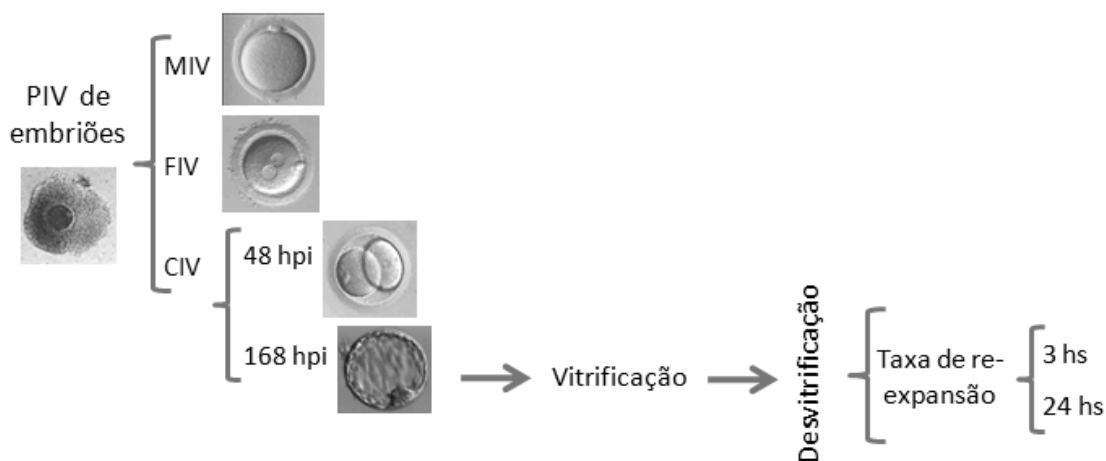


Figura 2. Atividades realizadas no laboratório durante o experimento

Análise estatística

As variáveis do experimento (número de folículos aspirados, número de oócitos recuperados, oócitos viáveis e inviáveis, taxa de aproveitamento e taxas de clivagem e

desenvolvimento embrionário) foram analisadas pelo procedimento PROC GLIMMIX do SAS System V.8 for Windows (STATISTICAL ANALYSES SYSTEM, 2000). As médias estão apresentadas na forma de quadrados mínimos $\pm$ erro padrão da média (EPM). O estudo comparativo entre variáveis binomiais (taxa de re-expansão embrionária com 3 e 24h) foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

Resultados

Ganho de peso e ECC das doadoras

Ao início dos tratamentos a média de peso das novilhas foi semelhante ($P>0,05$) entre os tratamentos, sendo 363,8 Kg $\pm$ 6,3 para o grupo CONTR e 361,1 $\pm$ 6,3 Kg para o grupo GORD. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre a média de peso nos grupos CONTR (366,3 Kg $\pm$ 3,6) e GORD (372,5 Kg $\pm$ 3,6) ao final do período experimental (Tabela 3). O ganho de peso médio não diferiu entre os grupos ($P>0,05$), sendo de 2,5 Kg $\pm$ 8,5 para o grupo CONTR e de 11,4 Kg $\pm$ 8,5 para o grupo GORD. De forma semelhante, o ECC médio não variou ($P>0,05$) em relação aos tratamentos avaliados, durante todo o período experimental. A média do escore de condição corporal do grupo CONTR foi 2,87 $\pm$ 0,0 e para o grupo GORD 2,89 $\pm$ 0,0, em uma escala de 1-5 (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da suplementação de novilhas Nelore com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA *n*-6 e *n*-3, sobre a média de peso (quadrados mínimos $\pm$ EPM) e o escore de condição corporal (ECC) durante todo o período experimental.

Tratamento	n	Média de peso inicial	Média de peso final	ECC escala 1 – 5
CONTR	16	363,8 Kg $\pm$ 6,3	366,3 Kg $\pm$ 3,6	2,87 $\pm$ 0,0
GORD	16	361,1 Kg $\pm$ 6,3	372,5 Kg $\pm$ 3,6	2,89 $\pm$ 0,0

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P<0,05$) pelo procedimento GLIMMIX do SAS.

Aspiração folicular, recuperação e qualidade oocitária

No total foram realizadas 6 sessões de aspiração do conteúdo folicular (4 sessões na primeira repetição e 2 na segunda repetição), com intervalos de 7 a 15 dias. Em cada OPU realizada, a população folicular dos ovários de cada doadora foi previamente avaliada por ultrassonografia. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na média de folículos visualizados entre os tratamentos, sendo uma média de $17,9 \pm 1,0$ folículos para o grupo CONTR, e $15,8 \pm 1,0$ para o grupo GORD (Tabela 4). De forma semelhante, a taxa de recuperação de oócitos (total de oócitos/total de folículos aspirados) para o grupo CONTR foi de $78,3\% \pm 4,7$, não diferindo significativamente ($P>0,05$) do grupo GORD ($86,8\% \pm 4,5$).

Foi recuperado um total de 734 oócitos para o grupo CONTR, sendo que os 601 viáveis foram destinados à maturação *in vitro* (MIV), obtendo-se uma taxa de recuperação de (oócitos viáveis/total de oócitos recuperados) de $82,8\% \pm 2,1$. Já para o grupo GORD foram recuperados 759 oócitos, sendo 654 viáveis. Neste grupo, a taxa de aproveitamento foi de $85,4\% \pm 2,0$, não diferindo significativamente do grupo CONTR ($P>0,05$). A recuperação de oócitos inviáveis foi semelhante para ambos os tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 4. Média (quadrados mínimos $\pm$ EPM) e total de folículos aspirados, total e taxa de recuperação de oócitos, oócitos viáveis e inviáveis para a PIV de embriões e taxa de aproveitamento, de novilhas Nelore suplementadas (GORD) ou não (CONTR) com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA *n*-6 e *n*-3.

	CONTR (n=16)		GORD (n=16)		P
	Média $\pm$ EPM	n*	Média $\pm$ EPM	n*	
Folículos aspirados (n)	17,9 $\pm$ 1,0	908	15,8 $\pm$ 1,0	819	0,12
Total de oócitos recuperados (n)	14,4 $\pm$ 1,4	734	14,5 $\pm$ 1,3	759	0,96
Taxa de recuperação de oócitos (%) [†]	78,3 $\pm$ 4,7	-	86,8 $\pm$ 4,5	-	0,18
Oócitos MIV (Graus I, II, III e desnudos) (n)	12,1 $\pm$ 1,2	601	12,5 $\pm$ 1,1	654	0,80
Oócitos inviáveis (n)	2,5 $\pm$ 0,4	133	2,1 $\pm$ 0,4	105	0,41
Taxa de aproveitamento (%) [‡]	82,8 $\pm$ 2,1	-	85,4 $\pm$ 2,0	-	0,36

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$) pelo procedimento GLIMMIX do SAS.

*Total obtido nas 6 sessões de OPU; [†] número total oócitos recuperados/ número de folículos aspirados; [‡] número de oócitos viáveis/número total oócitos recuperados.

Produção de embriões *in vitro*

Não houve efeito dos tratamentos sobre as taxas de clivagem e de blastocistos entre os grupos experimentais avaliados ($P > 0,05$), como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Médias (quadrados mínimos $\pm$ EPM) das taxas (%) de clivagem e desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos obtidos de novilhas Nelore suplementadas (GORD) ou não (CONTR) com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA *n*-6 e *n*-3.

Grupo	Total de Oócitos	Clivagem (% $\pm$ EPM)	Blastocistos (% $\pm$ EPM)
CONTR	603	68,7 $\pm$ 3,2	47,0 $\pm$ 3,7
GORD	645	61,3 $\pm$ 3,0	39,4 $\pm$ 3,6

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo procedimento GLIMMIX do SAS.

Sobrevivência embrionária pós-criopreservação

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) nas taxas de re-expansão embrionária após 3 e 24 horas de cultivo *in vitro* pós-reaquecimento dos grupos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6. Sobrevivência pós-desvitrificação de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos obtidos de novilhas Nelore suplementadas (GORD) ou não (CONTR) com uma fonte de gordura protegida ruminal rica em PUFA *n*-6 e *n*-3.

Grupo	Embriões	Embriões re-expandidos as 3h*	Embriões re-expandidos as 24h*
	(n)	n (%)	n (%)
CONTR	40	31 (77,5)	31 (77,5)
GORD	37	29 (78,4)	30 (81,1)

*Valores seguidos por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P<0,05$) pelo teste Qui-quadrado.

Discussão

A suplementação com gordura é uma prática comum realizada com o objetivo de aumentar a densidade energética das dietas animais, principalmente para o gado de leiteiro. Entretanto, além de fornecer calorias, a gordura possui efeitos diretos na reprodução, a partir da elevação da fertilidade em muitas situações (GUARDIEIRO *et al.*, 2010). Há relatos do efeito de ácidos graxos sobre o desenvolvimento folicular ovariano (STAPLES & THATCHER, 2005), tamanho do corpo lúteo e qualidade oocitária. Ainda, dietas ricas em ácidos graxos também podem influenciar a qualidade embrionária (CERRI *et al.*, 2004) e a concentração circulante de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (MATTOS *et al.*, 2000) e de hormônios esteróides, como a progesterona (LOPES *et al.*, 2009).

Todavia, alguns resultados de experimentos realizados *in vivo* com suplementação de gordura para bovinos são contraditórios, pois na maioria das vezes é impossível distinguir o nível de impacto dos PUFA sobre os oócitos ou embriões (LEROY *et al.*, 2010). Além disso, a maior parte dos estudos foram realizados em

bovinos leiteiros e, em razão das diferenças na ingestão de matéria seca e no nível de produção de leite, os resultados dessas pesquisas não são necessariamente aplicáveis aos animais para produção de carne (FUNSTON, 2004). Devido a isso, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação nutricional com uma fonte de gordura protegida rica em PUFA's *n*-6 e *n*-3 sobre o número de folículos ovarianos, recuperação e qualidade oocitária, desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos PIV, em novilhas Nelore, doadoras de oócitos.

O período de suplementação utilizado neste trabalho foi determinado a partir do tempo requerido para que os folículos primários se desenvolvam até o estágio antral e assim sejam observados os efeitos da dieta sobre a qualidade oocitária e desenvolvimento embrionário (WEBB *et al.*, 2004).

Nesse estudo realizamos a adição de uma fonte de gordura "by pass" na dieta dos animais (Megalac-E[®]), que é uma gordura granular composta por sais de cálcio de óleo de palma ou de soja. Esse produto contém ácidos graxos saturados, tais como o palmítico (óleo de palma) e esteárico e, poliinsaturados de cadeia longa, como o linolênico e predominantemente o linoléico. Por ser um produto altamente estável, sua digestão no animal ocorre somente em meio ácido. Dessa forma, ele permanece inalterado no rúmen (pH = 6,2), até chegar ao abomaso, cujo meio é extremamente ácido (pH = 2 a 3). Então, ocorre o desdobramento do produto com a liberação dos ácidos graxos e íons de cálcio para o intestino, que são absorvidos e levados pela corrente sangüínea (ARM & HAMMER, [2008]). Foi recentemente demonstrado que a suplementação de novilhas da raça Holandesa com esse tipo de gordura protegida ruminal mais que dobrou o conteúdo sérico total de ácidos graxos. Além disso, a proporção *n*-6:*n*-3 no soro foi mais elevada no grupo suplementado (LEROY *et al.*, 2010). Portanto, esses resultados demonstram que a suplementação e a absorção dos PUFA's são eficientes.

No presente estudo não foram encontrados efeitos diretos da suplementação com gordura sobre o número de folículos ovarianos em novilhas Nelore suplementadas durante 60 dias, anteriormente à aspiração folicular. Embora hajam poucos trabalhos realizados com *Bos taurus indicus*, os resultados da adição de PUFA's na dieta de

bovinos sobre a população folicular são bastante controversos, podendo ser encontrados efeitos positivos ou nenhum efeito. Dietas ricas em ácido linoléico, semelhante com as que contêm Megalac-E® ou com adição de óleo de soja em sua formulação, aumentam a gliconeogênese hepática, devido à elevação na produção de propionato no rúmen (THOMAS & WILLIAMS, 1996). Tal aumento na gliconeogênese tem sido associado com elevação das concentrações plasmáticas de insulina e IGF-1, capazes de aumentar a população de folículos pequenos e médios em novilhas Nelore (NOGUEIRA, 2008). Por outro lado, GUARDIEIRO (2009) observou que a elevação da concentração circulante de IGF-1 em novilhas Nelore, suplementadas com gordura protegida ruminal, não incrementou a população folicular.

A adição de gordura não influenciou a recuperação e taxa de aproveitamento de oócitos destinados a PIV de embriões, que está diretamente relacionada à sua qualidade morfológica. Os resultados na literatura sobre a qualidade oocitária e produção embrionária são controversos, pois a maioria dos trabalhos desconsidera os efeitos da condição corporal inicial dos animais (NOGUEIRA, 2008). ADAMIAK *et al.* (2005) relataram que o aumento do fornecimento de energia na dieta de bovinos foi benéfico para a qualidade oocitária apenas em animais com ECC moderado, porém foi deletério em animais com elevado ECC. No presente estudo, a média do ECC das novilhas de ambos os grupos foi classificado como moderado (3, em escala de 1-5), o que não interferiu significativamente na recuperação oocitária e produção *in vitro* de embriões.

O efeito dos PUFA's fornecidos na dieta sobre a qualidade de oócitos pode ser parcialmente mediado por alterações na composição de ácidos graxos no fluido folicular, o microambiente que cerca o COC durante seu desenvolvimento e maturação (CHILDS *et al.*, 2008; FOULADI-NASHTA *et al.*, 2009). Entretanto, alterações na composição de ácidos graxos dos oócitos são relativamente pequenas, indicando que estes tem um mecanismo de captação seletiva de PUFA's (SANTOS *et al.*, 2008a). Estas alterações podem influenciar a maturação nuclear e o nível de expansão das células do *cumulus*, pontos críticos para o desenvolvimento oocitário pós fertilização (MAREI *et al.*, 2010). Embora no presente estudo não tenha sido determinada a

composição de ácidos graxos no fluido folicular ou nos oócitos, pressupôs-se inicialmente, baseado nestes relatos de literatura, que a suplementação com gordura fosse capaz de promover alterações benéficas na qualidade do oócito e, consequentemente, do desenvolvimento embrionário. Desta forma, as reais causas da ausência do efeito esperado não podem ser determinadas com exatidão. De acordo com GUARDIEIRO *et al.* (2010), os quais também encontraram ausência de efeito em variáveis reprodutivas em novilhas Nelore suplementadas com gordura, a possível razão pode ter sido o fornecimento insuficiente de Megalac-E® (100 g/dia), apesar de esta ser a quantidade sugerida pelos fabricantes e utilizada em experimentos que obtiveram resultados positivos na fertilidade.

Sabe-se que o ácido linoléico (LA) é o ácido graxo mais abundante no fluido folicular e sua concentração diminui significativamente de acordo com o aumento do tamanho do folículo (HOMA & BROWN, 1992). Isso sugere que o LA tem um papel importante na regulação da maturação oocitária e que concentrações mais elevadas desse PUFA são necessárias no início dessa etapa para que o oócito permaneça no estágio de vesícula germinativa até a retomada da meiose (MAREI *et al.*, 2010). Ainda, sabe-se que a elevação da concentração de LA encontrada no fluido folicular pode ser associada com a fornecida na dieta (CHILDS *et al.*, 2008). No presente trabalho, a fonte de gordura utilizada possui predominância de LA (49,09%) em relação os demais ácidos graxos. Face ao exposto, acredita-se que a redução numérica, porém não significativa observada nas taxas de clivagem e de blastocistos em 7,4 e 7,6 % respectivamente, possa ser decorrente da elevação da proporção $n-6:n-3$. Desta forma, a predominância de LA proveniente da dieta pode ter interferido no processo de maturação oocitária, afetando o subsequente desenvolvimento embrionário. Estes prováveis efeitos necessitam ser melhor investigados, mas tal hipótese pode ser sustentada com resultados de NOGUEIRA (2008), que encontrou redução na taxa de blastocistos de novilhas Nelore suplementadas com Megalac, em relação à suplementação com óleo de soja.

A taxa de sobrevivência de embriões cultivados por 3 e 24 horas após desvitrificação não foi influenciada significativamente pela suplementação alimentar

com gordura, embora tenha sido observado um aumento numérico na sobrevivência embrionária no grupo suplementado com gordura. PEREIRA *et al.* (2008) avaliaram o efeito do cultivo *in vitro* de embriões bovinos na presença de 100 μ M de CLA, em meio contendo 10% de SFB, sobre a criotolerância embrionária. Estes autores observaram um acréscimo na taxa de sobrevivência embrionária, mesmo em embriões que haviam sido micromanipulados, correlacionada à redução no acúmulo de lipídeos intracitoplasmáticos durante o CIV (LAPA *et al.*, 2011). Assim, baseado nestas informações, pode-se supor que os resultados numericamente satisfatórios observados sobre a criotolerância no presente estudo possam ser decorrentes de uma redução no acúmulo lipídico intracitoplasmático e/ou melhora da qualidade embrionária, sinalizando um efeito biológico benéfico que deve ser alvo de futuras investigações.

Conclusão

Em conclusão, a suplementação alimentar de novilhas Nelore doadoras de oócitos com uma fonte de gordura protegida rica em PUFA's *n*-6 e *n*-3 não alterou a população folicular, recuperação e qualidade oocitária, desenvolvimento *in vitro* e sobrevivência embrionária pós-criopreservação.

Referências

ADAMIAK, S.J.; MACKIE, K.; WATT, R.G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biol. Reprod.**, v.73, p.918-926, 2005.

ARM & HAMMER. Animal Nutrition Group. Megalac- E[®]: gordura protegida ruminal. Rio de Janeiro: QGN Química Geral do Nordeste S. A., [2008].

BILBY, T.R.; BLOCK, J.; do AMARAL, B.C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F.T.; HANSEN, P.J.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **J. Dairy Science**, v.89, p.3891-3903, 2006.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEREOLÓGICAS. Quadro de Chuva Mensal, 2011. Disponível em: ><http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QChuvaPeriodo.asp>≤. Acesso em: 06 de fev. 2012.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEREOLÓGICAS. Quadro de Temperatura Máxima Mensal, 2011. Disponível em: ><http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QTmaxPeriodo.asp>≤. Acesso em: 06 de fev. 2012.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEREOLÓGICAS. Quadro de Temperatura Média Mensal, 2011. Disponível em: ><http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QTmedPeriodo.asp>≤. Acesso em: 06 de fev. 2012.

CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEREOLÓGICAS. Quadro de Temperatura Mínima Mensal, 2011. Disponível em: ><http://www.ciiagro.sp.gov.br/ciiagroonline/Quadros/QTminPeriodo.asp>≤. Acesso em: 06 de fev. 2012.

CERRI, R.L.A.; BRUNO, R.G.S.; CHEBEL, R.C.; GALVAO, K.N.; RUTGLIANO, H.; JUCHEM, S.O.; THATCHER, W.W.; LUCHINI, D.; SANTOS, J.E.P. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, v.87, n.1, p.297, 2004. Abstract.

CHILDS, S.; CARTER, S.; LYNCH, C.O.; SREENAN, J.M.; LONERGAN, P.; HENNESSY, A.A.; KENNY, D.A. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v.70, p.992–1003, 2008.

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; WATERS, S.M. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation on bovine uteroendometrial and hepatic gene expression of the insulin-like growth factor system. **Theriogenology**, v.75, p.500-512, 2011.

FOULADI-NASHTA, A.A.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biol. Reprod.**, v.17, p.77-79, 2007.

FOULADI-NASHTA, A.A.; WONNACOTT, K.E.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; SINCLAIR, K.D.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, v.138, p.771–781, 2009.

FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v.82, p.154-161, 2004.

GUARDIEIRO, M.M. **Viabilidade pós criopreservação de embriões de novilhas Nelore suplementadas com gordura protegida ruminal**. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

GUARDIEIRO, M.M.; BASTOS, M.R.; MOURÃO, G.B.; CARRIJO, L.H.D.; MELO, E.O.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Função ovariana de novilhas Nelore alimentadas com dieta suplementada com gordura protegida ruminal. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.45, n.4, p.408-414, 2010.

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

LAPA, M.; MARQUES, C.C.; ALVES, S.P.; VASQUES, M.I.; BAPTISTA, M.C.; CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A.E.M.; BESSA, R.J.B; PEREIRA, R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reprod. Dom. Anim.**, doi: 10.1111, 2011.

LOPES, C.N.; SCARPA, A.B.; CAPPELLOZZA, B.I.; COOKE, R.F.; VASCONCELOS, J.L.M. Effect of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.87, p.3935-3943, 2009.

LEROY, J.L.M.R.; VAN HOECK, V.; CLEMENTE, M.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; VAN SOOM, A.; UYTTERHOEVEN, M.; BOLS, P.E.J. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on *in vitro* bovine embryo quality. **Reproductive biology**, v.25, p.768-778, 2010.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULAD-NASHTA, A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v.81, p.1064-1072, 2009.

MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULAD-NASHTA, A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction Research**, v.139, p. 979–988, 2010.

MATTOS, R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.38–45, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients Requirements of Beef Cattle**. Seventh Rev. Ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1997.

NOGUEIRA, E. **Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção in vitro de embriões em novilhas da raça nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2008. 87 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.322-332, 2008.

SANTOS, J.E.P.; BILBY, T.R.; THATCHER, W.W.; STAPLES, C.R.; SILVESTRE, F.T. Long Chain Fatty Acids of Diet as Factors Influencing Reproduction in Cattle. **Reprod. Dom. Anim.**, v.43, p.23–30, 2008a.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v.69, p.88-97, 2008b.

SEIDEL Jr., G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.

STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of fatty acids on reproduction of dairy cows. In: Garnsworthy PC, Wiseman J(eds), Recent Advances in Animal Nutrition. Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 229–256, 2005.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.O.; CROCOMO, L.F.; LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v.75, p.1211-1220, 2011.

THOMAS, M.G.; WILLIAMS, G.L. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. **Theriogenology**, v.45, p.451-458, 1996.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci**, v.82, p.E63-E74, 2004.

WRIGHT, J.M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 4^a Edição, p. 165-168, 2009.

CAPÍTULO 3 - ADIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS OMEGA 6 E 3 EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO*: EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO E CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO – A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) no sistema de produção *in vitro* aumenta a criotolerância de embriões bovinos, sem afetar o desenvolvimento embrionário. Esse estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de Ácido Linoléico Conjugado (CLA), Ácido Docosaexaenóico (DHA) ou CLA+DHA durante os cultivos de maturação, desenvolvimento ou ambos, sobre o desenvolvimento e criotolerância embrionários. Para tanto, complexos *cumulus*-oócito (COCs) foram maturados *in vitro* (MIV) durante 24 h em meio B-199 sem (Controle) ou com suplementação com 100 µM de CLA, 100 µM de DHA, ou 100 µM de CLA + 100 µM DHA (CLA+DHA). Após a fertilização, os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* (CIV) em meio SOFaa suplementado ou não com os mesmos PUFAs utilizados na MIV. Foram avaliadas as taxas de clivagem (48 hpi) e blastocistos (168 hpi), quando os mesmos foram vitrificados. Posteriormente foram reaquecidos para avaliação da sobrevivência embrionária, a partir da taxa de re-expansão após 3 e 24 h de CIV pós-desvitrificação. Não houve interferência ($P>0,05$) entre o tipo de PUFA utilizado, assim como o momento da suplementação sobre as taxas de clivagem (72,6 a 81,1%±2,8) e de blastocistos (39,8 a 49,7%±3,3). As maiores taxas de sobrevivência embrionária após 3 h de CIV pós-reaquecimento foram observadas nos grupos suplementados com DHA durante a MIV (76,2%) ou na MIV+CIV (78,8%), diferindo significativamente ($P<0,05$) dos grupos suplementados durante a MIV com CLA (52,7%) ou com CLA+DHA (55,3%). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) na taxa de re-expansão após 24 h de re-cultivo entre o grupo controle e a maioria dos tratamentos avaliados, com exceção do grupo suplementado com CLA durante o CIV, que apresentou redução significativa ($P<0,05$) na criotolerância (73,0% vs 50,0%, respectivamente). Já a associação CLA+DHA demonstrou um efeito sinérgico durante o CIV, refletido por um aumento numérico na criotolerância dos blastocistos obtidos, após 3h de re-cultivo, em relação ao grupo controle (66,7 vs 63,5%, respectivamente). Em conclusão, a

suplementação com CLA, DHA ou sua associação nas diferentes etapas da PIV de embriões não interferiu no desenvolvimento *in vitro* e sobrevivência embrionária pós-criopreservação.

Palavras-Chave: ácido docosaexaenóico, ácido linoléico conjugado, bovinos, criotolerância, embrião

Introdução

O Brasil foi classificado como o primeiro país em volume de produção de embriões obtidos *in vitro*, já que detém quase um terço da produção mundial, de acordo com o relatório da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (THIBIER, 2008). Atualmente, o principal obstáculo para uma expansão comercial ainda maior da PIV (produção *in vitro*) de embriões bovinos é a possibilidade de obtenção de taxas de prenhez satisfatórias a partir de embriões criopreservados (NOGUEIRA, 2012; MORATÓ *et al.*, 2010).

As taxas de prenhez reduzidas decorrentes da transferência de embriões PIV criopreservados são uma clara indicação de sua pior qualidade e menor viabilidade em relação aos embriões obtidos *in vivo* (MORATÓ *et al.*, 2010). Esse fato pode ser correlacionado com o excessivo conteúdo e/ou composição de lipídeos nos embriões bovinos PIV (SEIDEL, 2006; HORVATH *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007).

A maior parte dos lipídeos intracelulares em oócitos e embriões bovinos são os triacilgliceróis, que correspondem a 50% da massa lipídica total em embriões produzidos *in vivo*. No entanto, essa proporção pode alcançar até 88% da massa de lipídeos em embriões PIV (PEREIRA *et al.*, 2008). Isso porque, quando cultivados em meios contendo soro fetal bovino (SFB), tendem a estocar grandes quantidades de triacilgliceróis (FERGUSON & LEESE, 1999). Todavia, a suplementação com SFB, seja em maiores ou menores concentrações, é amplamente aplicada na rotina da maior parte dos laboratórios de PIV de embriões.

Independente do mecanismo, o acúmulo excessivo de lipídeos intracelulares, durante o desenvolvimento *in vitro*, prejudica a qualidade desses embriões pelo aumento de sua sensibilidade ao estresse oxidativo, o que afeta negativamente o processo de criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2008; AL DARWICH *et al.*, 2011). Portanto, estudos buscando a remoção ou a redução do acúmulo desses lipídeos tem sido objeto de consideráveis esforços (STURMEY *et al.*, 2009).

O cultivo de embriões bovinos em sistemas livres de soro reduz o acúmulo de gotas de lipídeos intracitoplasmáticos em blastocistos, os quais demonstram uma

melhor resistência após a criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2008). Porém, a produção embrionária nestas condições tem se mostrado insatisfatória, até o momento.

Evidências indicam que a quantidade de lipídeos em oócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser alterados por modificações na composição dos meios de cultivo, particularmente pela adição de moléculas, como os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs – “polyunsaturated fatty acids”).

Os PUFAs são considerados essenciais, pois o organismo animal é incapaz de produzi-los, já que perderam as enzimas dessaturases apropriadas (WATHES *et al.*, 2007). Particularmente, os das famílias Omega 3 (*n*-3) e Omega 6 (*n*-6) tem um papel importante no controle da adipogênese, assim como em eventos fisiológicos que reduzem a expressão gênica de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos. Eles reprimem a transcrição das esteroil-CoA dessaturases (SCD do inglês – “stearoyl-CoA desaturase”), enzimas chave envolvidas na síntese de ácidos graxos monoinsaturados, e na regulação desse processo no fígado e adipócitos (AL DARWICH *et al.*, 2011).

Portanto, PUFAs como o ácido linoléico (LA – “linoleic acid”), linoléico conjugado (CLA – “Conjugated Linoleic Acid”), exemplos de *n*-6, e o ácido docosaexaenóico (DHA – “Docosaehaenoic Acid”), exemplo de *n*-3, são capazes de modular os mecanismos de captação de lipídeos sem aumentar a lipólise ou afetar a PIV de embriões (AL DARWICH *et al.*, 2011).

Além de promover modificações no acúmulo de lipídeos em oócitos e embriões (LAPA *et al.*, 2011), há também outros mecanismos pelos quais os ácidos graxos podem interferir no metabolismo celular (JUCHEM *et al.*, 2010). Por exemplo, a incorporação de PUFAs na dupla camada de fosfolipídios da membrana plasmática, fato que promove alteração na fluidez da membrana, melhorando a criotolerância embrionária (SEIDEL, 2006).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio suplementado com PUFAs *n*-6 e *n*-3 durante a maturação oocitária e/ou cultivo de desenvolvimento.

Material e Métodos

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram da Sigma (Chemical Co. St Louis, NO). Caso contrário, encontram-se especificados. Todos os reagentes são testados para o cultivo celular ou embrionário. Os ácidos graxos linoléico conjugado (CLA) e docosaexaenóico (DHA) foram diluídos em DMSO (MAREI *et al.*, 2009), aliquotados e armazenados a -20°C. No momento da utilização, foram adicionados aos meios de maturação (B-199) e/ou de cultivo (SOFaa), obtendo uma concentração final de 100 µM. A associação CLA+DHA foi utilizada na proporção 1:1, que é recomendada para a manutenção da saúde do organismo animal (WATHES *et al.*, 2007), ou seja, ambos PUFA's estavam na concentração preconizada de 100 µM no meio.

O meio de lavagem H-199 foi constituído de TCM-199 (Gibco BRL) suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5mM de Bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de amicacina. O meio de maturação (B-199) consistiu de TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH (Pluset[®], Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil), 100 UI/mL de hCG (Vetecor[®], Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de SFB (Gibco BRL). O meio de fertilização foi TALP-FIV, suplementado com 4 µL/mL de solução PHE (1 mM hipotaurina, 2 mM penicilamina e 250 µM epinefrina) e 10 µg/mL de heparina. O meio de cultivo utilizado foi SOFaa, suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de Citrato de Sódio, 2,8 mM de Myo-inositol, 2% de BEM aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 0,5% de BSA e 2,5% de SFB.

Aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro

Os ovários bovinos foram coletados nos abatedouros da região de Araçatuba-SP e transportados em garrafas térmicas contendo solução salina estéril a 30-35°C até o laboratório, não excedendo o limite de 4 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções dos folículos ovarianos, com diâmetro entre 2-8 mm foram realizadas manualmente, por meio de agulha de calibre 18-G, adaptada a seringa de 10

mL, ambas descartáveis. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 mL e decantado por 15 minutos para posterior seleção dos COCs. O sedimento foi então transferido para placas de poliestireno de 100x20 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os COCs de graus I e II (*cumulus* compacto contendo pelo menos 3 camadas de células e citoplasma com granulações homogêneas) foram selecionados para o cultivo de maturação.

Maturação *in vitro* dos oócitos

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 e uma vez em meio B-199. Foram então transferidas aproximadamente 50 estruturas por poço da placa de cultivo celular de 24 poços (Costar® 3526, Corning Incorporated, NY, USA), contendo 500 µL de meio de maturação B-199 suplementado ou não com 100 µM de PUFA, de acordo com os grupos experimentais apresentados na Figura 1. Os COCs foram cultivados por 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Um poço de MIV com aproximadamente 50 oócitos, em cada dia distinto do experimento, foi considerado uma unidade experimental.

Fertilização *in vitro*

Foi utilizado sêmen de um único touro da raça Nelore e única partida, sendo sua fertilidade *in vitro* previamente comprovada. A palheta de sêmen foi descongelada à temperatura de 36°C por 40 segundos e o sedimento foi obtido por centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) com 250 µL de solução 45% e 250 µL de solução 90%, durante 7 minutos a 2500xg, em temperatura ambiente. O sedimento recuperado foi ressuspenso em meio TALP-FIV e avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração final foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos/mL de meio de fertilização. Após o cultivo de maturação, os COCs foram lavados duas vezes em meio B-199 e uma vez em meio TALP-FIV, sendo adicionados 25 COCs por gota de FIV. Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100 µL de meio TALP-FIV.

designada a cada grupo experimental. A fertilização foi realizada a 38,5°C, por até 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade.

Cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro*

O cultivo de desenvolvimento foi realizado nas mesmas placas de poços utilizadas durante o cultivo de maturação (Costar[®] 3526, Corning Incorporated, NY, USA) contendo 500 µL de meio SOFaa suplementado com ou sem os mesmos PUFAs utilizados na MIV. O cultivo foi realizado por 7 dias, à temperatura de 38,5°C, 100% de umidade e 5% CO₂ em ar. Após 48 e 96 horas do cultivo, 100% do meio foi renovado ("Feeding"). A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário 168 hpi.

Vitrificação e avaliação da re-expansão embrionária pós-desvitrificação

Foi utilizado o protocolo Vitri-Ingá[®] para vitrificação e desvitrificação, da empresa INGAMED - Produtos Médicos Hospitalares, Perobal, PR, Brasil. Todos os meios e materiais utilizados foram adquiridos da empresa.

Os embriões obtidos no dia 7 de desenvolvimento foram retirados da placa de CIV e transferidos para uma placa de poliestireno de 100x20 mm (Corning Incorporated, NY, USA) contendo gotas de meio SOFaa. Então, foram classificados de acordo com o Manual da IETS, e selecionados para vitrificação apenas os blastocistos expandidos de graus 1 e 2. Em seguida, foram transferidos para uma gota de solução de vitrificação 1 (VI – 1), e posteriormente lavados três vezes em gotas da solução de vitrificação 2 (VI – 2). No decorrer do tempo determinado no protocolo, todos os embriões foram retirados com auxílio de uma pipeta, em menos de 2 µL da solução VI - 2, e depositados na porção final de uma haste de polipropileno de 0,7 mm de espessura. Ao completar o tempo estabelecido no protocolo, a porção final das hastes foi mergulhada em nitrogênio líquido e seus protetores acoplados. Finalmente, as hastes foram introduzidas em raques previamente identificadas com os grupos experimentais e armazenadas em botijões criogênicos até o momento do uso nas etapas posteriores.

Para desvitrificação dos embriões, as hastes foram retiradas do botijão de nitrogênio onde estavam armazenadas, e seus protetores desacoplados. A porção final das hastes foi imersa na solução de desvitrificação 1 (DV – 1), até que a microgota seja desfeita. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução 2 (DV – 2), e por fim, na solução 3 (DV – 3).

Após esse procedimento, os embriões foram lavados em meio SOFaa e transferidos para placas de CIV (gotas de 100 µl de meio SOFaa suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% de SFB, cobertas com óleo mineral). Os embriões foram cultivados *in vitro*, à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% CO₂ em ar, por até 24 horas. Dessa forma foi avaliada a taxa de sobrevivência *in vitro*, expressa pela taxa de re-expansão as 3 e 24 horas após reaquecimento, assim como a taxa de eclosão durante esse período.

Delineamento experimental

Neste estudo foram avaliados os efeitos da suplementação com ácidos graxos nos meios MIV e/ou CIV sobre a taxa de clivagem, desenvolvimento e criopreservação de embriões bovinos.

Um total de 2378 COCs, em 6 replicatas independentes, foram MIV durante 24 horas em meio B-199, sem suplementação de ácidos graxos (Controle) ou suplementado com 100 µM de ácido linoléico conjugado (CLA, *n*6), ou 100 µM de ácido docosahexaenóico (DHA, *n*3), ou 100 µM de CLA + 100 µM DHA (CLA+DHA). Após a FIV, os zigotos foram cultivados em meio SOFaa suplementado com ou sem os mesmos ácidos graxos utilizados durante a MIV. As 168 hpi (D7), blastocistos expandidos graus I e II foram destinados à vitrificação.

Desta maneira, o estudo obedeceu a um esquema fatorial 3x3 (3 tratamentos - ácidos graxos e 3 momentos - MIV e/ou CIV) mais um grupo testemunha adicional (Controle), num total de 10 grupos experimentais (Figura 1).

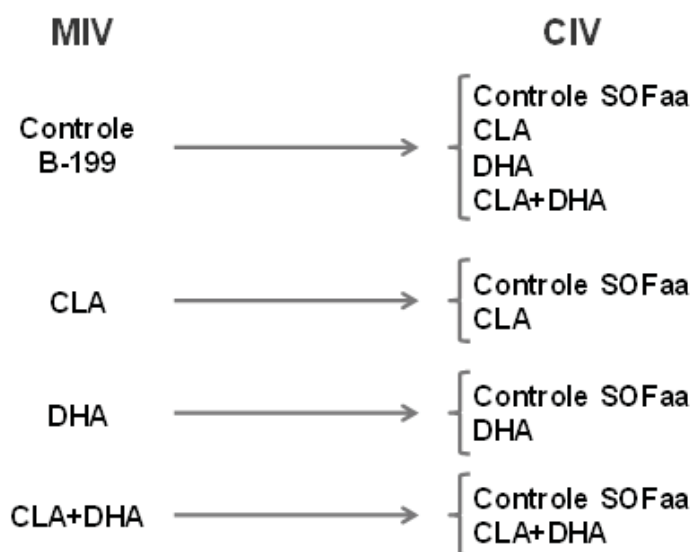


Figura 1. Suplementação dos meios de cultivo de maturação e desenvolvimento *in vitro* utilizados e grupos experimentais avaliados.

Análise estatística

Os dados foram analisados pela fração de embriões cultivados atingindo os estádios determinados, reportada em termos de porcentagem. As porcentagens foram transformadas utilizando arco seno raiz quadrada e os dados transformados foram analisados por PROC-GLM (STATISTICAL ANALYSES SYSTEM, 2000), considerando um modelo estatístico que inclui o tratamento (suplemento do meio de cultivo), o momento (MIV e/ou CIV) e possíveis interações. O estudo comparativo entre variáveis binomiais (taxa de re-expansão embrionária com 3 e 24h) foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 foram consideradas significativas.

Resultados

As taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos para os diferentes tratamentos estão apresentadas na Tabela 1. Como não houve interação entre os tratamentos (CLA, DHA ou CLA+DHA) e o momento da suplementação (cultivo de maturação, de desenvolvimento ou ambos), os dados são apresentados separadamente, como variáveis independentes (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1. Médias (quadrados mínimos $\pm$ EPM) das taxas de clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos produzidos a partir de oócitos cultivados com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) das famílias Omega 6 e 3 durante a maturação e/ou cultivo *in vitro*.

PUFAs	MIV	CV	Oócitos (n)	Clivagem (% $\pm$ EPM)	Blastocistos (% $\pm$ EPM)
Controle	-	-	243	80,1 $\pm$ 2,8	46,8 $\pm$ 3,3
CLA	+	-	235	80,7 $\pm$ 2,8	42,6 $\pm$ 3,3
CLA	-	+	239	78,5 $\pm$ 2,8	47,1 $\pm$ 3,3
CLA	+	+	263	75,5 $\pm$ 2,8	42,7 $\pm$ 3,3
DHA	+	-	238	81,1 $\pm$ 2,8	49,7 $\pm$ 3,3
DHA	-	+	223	75,0 $\pm$ 2,8	40,3 $\pm$ 3,3
DHA	+	+	230	72,6 $\pm$ 2,8	39,9 $\pm$ 3,3
CLA+DHA	+	-	232	75,4 $\pm$ 2,8	41,4 $\pm$ 3,3
CLA+DHA	-	+	227	80,6 $\pm$ 2,8	39,8 $\pm$ 3,3
CLA+DHA	+	+	248	73,6 $\pm$ 2,8	44,0 $\pm$ 3,3
Total			2378	-	-

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

CLA: 100 μ M de ácido linoléico conjugado; **DHA:** 100 μ M de ácido docosahexaenóico; **CLA+DHA:** 100 μ M de ácido linoléico conjugado+100 μ M de ácido docosahexaenóico; **MIV:** maturação *in vitro*; **CV:** cultivo *in vitro*.

Independente do tipo de ácido graxo utilizado na suplementação dos meios, seja o CLA (*n*-6), DHA (*n*-3) ou sua associação (CLA+DHA), não houve interferência ($P>0,05$) sobre a taxa de clivagem e de blastocistos após 7 dias de cultivo (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) das famílias Omega 6 e 3 durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre as taxas (%) de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos (médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM).

PUFAs	Oócitos (n)	Clivagem (% $\pm$ EPM)	Blastocistos (% $\pm$ EPM)
Controle	243	80,1 $\pm$ 0,9	46,8 $\pm$ 2,8
CLA	737	78,2 $\pm$ 1,6	44,1 $\pm$ 2,4
DHA	691	76,2 $\pm$ 2,0	43,3 $\pm$ 2,5
CLA+DHA	707	76,5 $\pm$ 1,5	41,7 $\pm$ 2,5
Total	2378	-	-

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P<0,05$) pelo teste de Tukey. **CLA:** 100 μ M de ácido linoléico conjugado; **DHA:** 100 μ M de ácido docosahexaenóico; **CLA+DHA:** 100 μ M de ácido linoléico conjugado+100 μ M de ácido docosahexaenóico.

A suplementação com PUFAs nas etapas de MIV, CIV e MIV+CIV não resultou em diferença significativa ($P>0,05$) sobre as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do momento (MIV e/ou CIV) da suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) durante a produção *in vitro* de embriões bovinos sobre as taxas (%) de clivagem e desenvolvimento até a fase de blastocistos (médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM).

Momento	Oócitos (n)	Clivagem (% $\pm$ EPM)	Blastocistos (% $\pm$ EPM)
Controle	243	80,1 $\pm$ 0,9	46,8 $\pm$ 2,8
MIV	705	79,1 $\pm$ 1,9	44,5 $\pm$ 2,4
CIV	689	78,0 $\pm$ 1,6	42,4 $\pm$ 2,3
MIV+CIV	741	73,9 $\pm$ 1,4	42,2 $\pm$ 2,7
Total	2378	-	-

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. **MIV**: suplementação com PUFAs durante a maturação *in vitro*; **CIV**: suplementação com PUFAs durante o cultivo *in vitro*; **MIV+CIV**: suplementação com PUFAs realizada durante a maturação e cultivo *in vitro*.

As maiores taxas de re-expansão embrionária após 3 horas de cultivo pós-reaquecimento foram observadas nos grupos suplementados com DHA durante a MIV (76,2%) ou durante MIV+CIV (78,8%), as quais diferiram ($P < 0,05$) dos grupos suplementados durante a MIV com CLA (52,7%) ou com CLA+DHA (55,3%). Todavia, todos os grupos experimentais foram semelhantes ($P > 0,05$) ao grupo controle (63,5%) na avaliação da sobrevivência embrionária após 3 horas de cultivo (Tabela 4).

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na taxa de sobrevivência embrionária *in vitro* após reaquecimento e cultivo por 24 horas, entre o grupo controle e a maioria dos tratamentos avaliados (Tabela 4). A única diferença observada em relação ao controle foi o grupo suplementado com CLA durante o CIV, o qual apresentou redução significativa ($P < 0,05$) na criotolerância (73,0% vs 50,0%, respectivamente).

Tabela 4. Sobrevivência pós-desvitrificação de embriões produzidos a partir de oócitos cultivados com ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) durante a maturação e/ou cultivo *in vitro*.

PUFA	MIV	CIV	Embriões	Re-expansão	Re-expansão
			desvitrificados (n)	3 h n (%)	24 h n (%)
Controle	-	-	63	40 (63,5) ^{ab}	46 (73,0) ^a
CLA	+	-	55	29 (52,7) ^a	41 (74,6) ^a
CLA	-	+	50	33 (66,0) ^{ab}	25 (50,0) ^b
CLA	+	+	60	42 (70,0) ^{ab}	47 (78,3) ^a
DHA	+	-	63	48 (76,2) ^b	44 (69,8) ^a
DHA	-	+	37	23 (62,2) ^{ab}	28 (75,7) ^a
DHA	+	+	33	26 (78,8) ^b	22 (66,7) ^{ab}
CLA+DHA	+	-	47	26 (55,3) ^a	30 (63,8) ^{ab}
CLA+DHA	-	+	51	34 (66,7) ^{ab}	38 (74,5) ^a
CLA+DHA	+	+	58	36 (62,1) ^{ab}	36 (62,1) ^{ab}
Total			517	-	-

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Qui-quadrado.

CLA: 100 μ M de ácido linoléico conjugado; **DHA:** 100 μ M de ácido docosahexaenóico; **CLA+DHA:** 100 μ M de ácido linoléico conjugado+100 μ M de ácido docosahexaenóico; **MIV:** maturação *in vitro*; **CIV:** cultivo *in vitro*.

Discussão

A quantidade de lipídeos acumulados em oócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser modificados por alterações na composição dos meios de cultivo *in vitro*, particularmente pela adição de SFB (STURMEY *et al.*, 2009) ou de moléculas como os PUFAs. Estes ácidos graxos podem ser utilizados para promover alterações desejadas no metabolismo celular e na composição de lipídeos da membrana plasmática (AL DARWICH *et al.*, 2011), uma vez que PUFAs *n*-6 e *n*-3 tem

um papel importante no controle da adipogênese e em eventos fisiológicos que reduzem a expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídeos nos adipócitos, como as SCD. Embora haja alguns relatos sobre o efeito da suplementação com PUFA durante a produção *in vitro* de embriões sobre a taxa de sobrevivência embrionária após a criopreservação, os resultados ainda são contraditórios (PEREIRA *et al.*, 2007; 2008; AL DARWICH *et al.*, 2011; LAPA *et al.*, 2011). Assim, no presente estudo foi investigado o efeito de PUFA isoladamente ou em associação, em diferentes momentos da PIV, sobre a produção e criotolerância de embriões bovinos.

A suplementação dos meios com CLA, DHA ou associação CLA e DHA, seja durante a maturação oocitária, durante o cultivo de embriões ou em ambas as etapas, não elevou as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário até a fase de blastocistos e sobrevivência destes após a vitrificação. De forma semelhante, PEREIRA *et al.* (2007) observaram que a suplementação do meio de cultivo embrionário com CLA não afetou a produção de blastocistos. Por outro lado, estes autores observaram acréscimo de quase duas vezes na taxa de sobrevivência embrionária pós-desvitrificação, o que foi correlacionado com a redução no acúmulo lipídico intracitoplasmático durante o CIV. As diferenças encontradas entre este relato e os presentes resultados podem ser atribuídas às diferentes condições de cultivo utilizadas, pois enquanto estes autores cultivaram os embriões em meio TCM-199 suplementado com 10% de soro de vacas superovuladas em estro e 100 µM de CLA, no presente trabalho foi utilizado meio SOFaa suplementado com 2,5% SFB, 5 mg/mL de BSA e 100 µM de CLA. Embora não seja possível estabelecer comparações entre o presente estudo e o supracitado (PEREIRA *et al.*; 2007), devido às diferenças metodológicas e outros diferentes fatores envolvidos nos sistemas de cultivo em diferentes laboratórios, é notável a diferença observada na taxa sobrevivência embrionária 24 horas pós-desvitrificação do grupo controle de ambos os estudos (73,0% e 27,5%, respectivamente). Face a estas diferenças, parece razoável supor que apenas a redução das concentrações de SFB seja extremamente benéfica para a melhoria das taxas de sobrevivência de embriões criopreservados.

A presença do SFB é predominante na composição da maioria dos meios de cultivo de desenvolvimento embrionário. Embriões cultivados em meios contendo soro tendem a estocar grandes quantidades de triacilgliceróis (FERGUSON & LEESE, 1999), sendo esse ácido graxo o principal componente da massa lipídica intracelular em oócitos e embriões bovinos. Embora os triacilgliceróis sejam um reservatório de energia para o desenvolvimento embrionário inicial (PEREIRA *et al.*, 2008), o acúmulo de gotas de lipídeos no citoplasma de embriões cultivados em meios ricos em SFB resulta em danos no mecanismo celular responsável por reparar a estrutura da membrana plasmática após a criopreservação. Além disso, o soro é rico em ácidos graxos saturados, que podem ser incorporados à membrana, alterando sua composição e tornando-a mais rígida e incapaz de suportar o estresse térmico (GÓMEZ *et al.*, 2008). Portanto, o acúmulo excessivo de lipídeos intracelulares prejudica a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* devido ao aumento de sua sensibilidade ao estresse oxidativo e à criopreservação (PEREIRA *et al.*, 2008; AL DARWICH *et al.*, 2011).

Pelo exposto e a partir da comparação entre nossos resultados e os de PEREIRA *et al.* (2008), pode-se hipotetizar que a utilização de baixas concentrações de SFB durante o cultivo tenha resultado na produção de embriões com menor acúmulo de lipídeos, muito embora não tenhamos feito esta quantificação. Todavia, embriões com menores teores de lipídios são mais criotolerantes, o que poderia justificar a falta de efeito da suplementação do meio de cultivo com ácidos graxos observada neste estudo. De fato, o cultivo de embriões bovinos em meio livre de soro reduz o acúmulo de lipídeos em blastocistos, os quais demonstram uma melhor resistência após a criopreservação (GOMÉZ *et al.*, 2008). Porém, a produção embrionária em meio totalmente livre de soro tem se mostrado insatisfatória até o momento

Muito embora a suplementação dos meios com PUFA não tenha promovido incremento significativo na taxa de sobrevivência embrionária pós-criopreservação, foi observado um aumento numérico consistente nas taxas de re-expansão embrionária após 3 horas (principalmente nos grupos suplementados com DHA) e após 24 horas de cultivo (principalmente nos grupos suplementados com CLA). Portanto, embora a suplementação com PUFA não tenha sido capaz de incrementar as taxas de re-

expansão embrionária em relação ao controle, as quais foram bastante satisfatórias provavelmente devido às baixas concentrações de soro usadas no meio de CIV, foi observada uma tendência de melhora na criotolerância dos embriões obtidos. Este incremento numérico pode ser muito útil do ponto de vista prático, já que o aumento nos índices de sobrevivência embrionária pós-desvitrificação, mesmo que não significativo, pode proporcionar um acréscimo no número total de estruturas transferíveis e, provavelmente, nas taxas de concepção. Desta forma, os resultados sinalizam um possível efeito positivo na utilização de PUFA's em sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos, visando aumentar sua criotolerância. Todavia, ainda são necessários mais estudos para comprovar a real importância destes em sistemas semelhantes aos utilizados no presente estudo (baixas concentrações de soro no meio de cultivo), especialmente no que diz respeito ao aumento do número de prenhez após transferência de embriões criopreservados.

Um fato observado no presente estudo é que os embriões cultivados com CLA apresentaram melhor qualidade visual (de acordo com classificação proposta pelo Manual da IETS; WRIGHT, 2009) em comparação com aqueles suplementados com DHA ou do grupo controle (dados não demonstrados). Embora a captação de PUFA's pelos oócitos seja seletiva e bastante regulada, foi recentemente demonstrado um acúmulo seletivo de pequenas quantidades de CLA em oócitos maturados na presença deste ácido graxo (LAPA *et al.*, 2011). Segundo estes autores, a presença do CLA durante a maturação interfere no metabolismo de lipídeos, melhorando a competência de oócitos bovinos em se desenvolver em embriões de melhor qualidade (LAPA *et al.*, 2011), tal como observado no presente estudo. Esse efeito foi também relatado por PEREIRA *et al.* (2007), que observaram melhora na integridade pós-descongelção e na taxa de re-expansão de embriões cultivados em meio suplementado com CLA e 10% de soro em relação a embriões cultivados em meio definido (SOF suplementado com PVA), apesar de terem observado menor acúmulo lipídico nesse último grupo.

Os ácidos graxos tem um efeito profundo sobre o ambiente onde se encontra o oócito, por oferecer nutrientes essenciais e contribuir para a sobrevivência embrionária pós-fertilização. O armazenamento de ácidos graxos, proteínas e mRNA durante a

maturação oocitária são críticos para o desenvolvimento embrionário inicial, antes da ativação do seu próprio genoma (BILBY *et al.*, 2006). A capacidade de PUFAs, como o CLA e o DHA, na modulação dos mecanismos de captação de lipídeos, sem aumentar a lipólise ou afetar a PIV de embriões (AL DARWICH *et al.*, 2011), ainda deve ser melhor estudada, mas de acordo com os presentes resultados e com base nos relatos de literatura, estes ácidos graxos parecem ser promissores para melhorar a qualidade e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Em síntese, nosso estudo inovou ao avaliar os efeitos da suplementação dos meios de MIV, CIV ou ambos com uma associação de PUFAs *n*-6 e *n*-3 sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Embora os resultados demonstrem não haver interferência dos PUFAs sobre o desenvolvimento embrionário, observou-se melhor qualidade visual dos embriões (de acordo com a classificação proposta pelo Manual da IETS; WRIGHT, 2009) e taxas de sobrevivência pós-desvitrificação numericamente superiores. Portanto, houve uma tendência destes embriões suportarem melhor o processo de vitrificação. Estas observações são indicativas de que mais estudos devem ser realizados para determinar sem contradições de resultados os mecanismos pelos quais os PUFAs exercem seus efeitos sobre o metabolismo, potencial de desenvolvimento de oócitos e embriões produzidos *in vitro* e criotolerância embrionária. Mais esforços são necessários para integrar novas áreas do conhecimento como a lipidômica e avaliação das taxas de prenhez desses embriões.

Conclusão

Em conclusão, a suplementação com CLA, DHA ou sua associação nas diferentes etapas da PIV de embriões não interferiu no desenvolvimento *in vitro* e sobrevivência embrionária pós-criopreservação.

Referências

- AL DARWICH, A.; PERREAU, C.; PETIT, M.H.; PAPILLIER, P.; DUPONT, J.; GUILLAUME, D.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. **Prostaglandins and other lipid mediators**, v.93, p.30-36, 2010.
- BILBY, T.R.; BLOCK, J.; do AMARAL, B.C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F.T.; HANSEN, P.J.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **J. Dairy Science**, v.89, p.3891-3903, 2006.
- FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J.; A potencial role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.73, p.1195-1201, 2006.
- GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J.N.; HIDALGO, C.O.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v.69, p.1013-1021, 2008.
- HORVATH, G.; SEIDEL Jr., G.E. Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. **Theriogenology**, v.66, p.1026-1033, 2006.
- JUCHEM, S.O.; CERRI, R.L.A.; VILLASEÑOR, M.; GALVÃO, K.N.; BRUNO, R.G.S.; RUTIGLIANO, H.M.; DEPETERS, E.J.; SILVESTRE, F.T.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reprod Dom Anim**, v.45, p.55–62, 2010.
- LAPA, M.; MARQUES, C.C.; ALVES, S.P.; VASQUES, M.I.; BAPTISTA, M.C.; CARVALHAIS, I.; SILVA PEREIRA, M.; HORTA, A.E.M.; BESSA, R.J.B.; PEREIRA, R.M. Effect of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid on bovine oocyte competence and fatty acid composition. **Reprod Dom Anim**, doi: 10.1111, 2011.
- MAREI, W.F.; WATHES, D.C.; FOULAD-NASHTA, A.A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v.81, p.1064-1072, 2009.
- MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T.; MOGAS, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vitro-produced calf and cow blastocysts at

different developmental stages. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1141–1147, 2010.

NOGUEIRA, M. Globalização na XXII Reunião Anual da SBTE. *Jornal O Embrião*, Jaboticabal, 2008, Espaço Aberto, p.17-18. Disponível em: <<http://www.sbte.org.br/?op=paginas&tipo=secao&secao=19&pagina=103>> acesso em: 06/mar/2012.

PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; PORTUGAL, P.V.; BESSA, R.J.B.; CHAGAS E SILVA, J.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). **Animal Reproduction Science**, v.98, p.293-301, 2007.

PEREIRA, R.M.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M.; SANTOS, I.C.; MARQUES, M.R.; REIS, A.; SILVA PEREIRA, M.; MARQUES, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.322-332, 2008.

SEIDEL Jr., G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.

STURMEY, R.G.; REIS, A.; LEESE, H.J.; MCEVOY, T.G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reprod Dom Anim**, v.44, p.50–58, 2009.

THIBIER, M. **Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer – Year 2007**: The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Newsletter*, December, 2008.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77, p.190-201, 2007.

WRIGHT, J.M. Apêndice D. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento embrionário e códigos de qualidade. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 4ª Edição, p. 165-168, 2009.