



## VIABILIDADE DE EMBRIÕES VITRIFICADOS RESULTANTES DA FERTILIZAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS DE VACAS SUPLEMENTADAS COM CANOLA EM GRÃO

**Rafael Balestrin<sup>1</sup>; Carlos Henrique Vedana<sup>1</sup>; Luiz Paulo Rigolon<sup>2</sup>**

**RESUMO:** Avaliou-se a produção de oócitos e de embriões de vacas da raça Nelore produzidos *in vitro*, bem como a resistência dos mesmos à vitrificação, quando os animais foram suplementados com grãos de canola. Foram utilizadas 12 vacas da raça Nelore. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois tratamentos: T1-tratados com Canola em Grão (2,0 kg/animal/dia) (n=6) e T2-controle (n=6). Foram realizadas quatro aspirações em cada animal. A seguir, realizou-se a maturação e fecundação e os zigotos foram cultivados *in vitro* em meio SOF suplementado. Sete dias após, os embriões foram avaliados quanto a qualidade e grau de desenvolvimento e vitrificados em hastes de vitrificação (Criotop® ou Vitri-ingá®). Na seqüência, os embriões foram descongelados e cultivados por 06, 12 e 24 horas, observando a taxa de expansão e eclosão dos mesmos. Não houve diferenças ( $p>0,05$ ) no número total de oócitos viáveis (T1:  $12,66 \pm 1,71$ ; T2:  $11,04 \pm 1,77$ ), taxa de clivagem (T1:  $60,62 \pm 4,72$ ; T2:  $61,39 \pm 4,88$ ) e taxa de blastocistos (T1:  $23,69 \pm 5,12$ ; T2:  $27,04 \pm 5,30$ ) em função do tratamento. Os tratamentos não influenciaram a taxa de re-expansão (T1:  $70,48 \pm 6,99$ ; T2:  $59,62 \pm 7,09$ ) após o descongelamento, todavia houve diferença significativa ( $P<0,06$ ) para a taxa de eclosão (T1:  $69,17 \pm 7,43$ ; T2:  $35,66 \pm 6,86$ ). Desta forma podemos concluir que a adição de canola em grãos na dieta de vacas não alterou a produção de embriões, entretanto, os embriões obtidos de vacas alimentadas com grãos de canola são mais resistentes a vitrificação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Criopreservação; Embrião; Ômega-6; Ômega-9; Nelore.

### INTRODUÇÃO

Atualmente, a área de reprodução bovina vem sendo explorada com maior intensidade, passando por mudanças e inovações biotecnológicas relevantes, resultado dos interesses de pesquisadores e criadores que visam difundir de forma rápida e lucrativa os materiais genéticos de alto potencial. Técnicas como a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV) possibilitam o aumento dos índices reprodutivos das fêmeas, intensificando a seleção dos animais (REICHENBACH *et al.*, 2002).

A nutrição é importante fator na reprodução dos animais, destacando-se o teor de proteína bruta da dieta (GARCIA-BAJALIL *et al.*, 1994); níveis de vitamina A (SHAW *et al.*, 1995) e níveis de energia na dieta (NOLAN *et al.*, 1998).

O aumento no consumo da energia elevou o número de folículos em ovinos e bovinos não superovulados (MOLLE *et al.*, 1995; GUTIÉRREZ *et al.*, 1997). Enquanto Rigolon e colaboradores (2003) verificaram que isso não se repetia em animais superovulados. Staples e colaboradores (1998) Enfatizaram o teor de gordura na melhoria da fertilidade dos animais. As gorduras na dieta interferem na taxa de gestação, crescimento folicular, concentração de hormônios e produção de embriões (WILLIAMS, 1989), porém ainda são necessários novos estudos.

<sup>1</sup> Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá - PR. Programa Institucional de bolsas de Iniciação científica (PIBIC/CNPQ-Cesumar). [rafa\\_balestrin@hotmail.com](mailto:rafa_balestrin@hotmail.com), [kae@hotmail.com](mailto:kae@hotmail.com)

<sup>2</sup> Orientador e Docente do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. [rigolon@cesumar.br](mailto:rigolon@cesumar.br)

Apesar dos avanços na produção de embriões *in vitro* ainda apresentam diferenças morfológicas e metabólicas daqueles produzidos *in vivo*, gerados pelas condições de cultivo *in vivo* (SÁ *et al.*, 2003). Essas alterações têm tornado os embriões de FIV mais sensíveis a criopreservação que os obtidos *in vivo*, diminuindo a viabilidade após o descongelamento e a taxa de gestação (HOLM *et al.*, 1998). Os embriões bovinos produzidos *in vitro*, nos estágios iniciais, possuem grande quantidade de gotas lipídicas no interior do citoplasma, atribuída ao soro adicionado aos meios de cultivo (TOMINAGA *et al.*, 2000). Os blastômeros apresentam-se aumentados e o espaço perivitelínico diminuído (HOLM *et al.*, 1998). Além disso, possuem citoplasma mais escuro, menor densidade, menor taxa de crescimento e maior sensibilidade térmica (RIZOS *et al.*, 2001).

Cavaliere e colaboradores (2005a) demonstraram que novilhas que receberam embriões de vacas alimentadas com linhaça apresentaram aumento na taxa de gestação, sugerindo que embriões congelados oriundos de doadoras suplementadas com linhaça em grãos podem ser mais resistentes ao processo de criopreservação em relação àqueles que não o foram. Este trabalho foi realizado com objetivo de avaliar o efeito da suplementação de canola em grão na produção de oócitos de vacas Nelore, fertilização dos mesmos em laboratório e resistência destes embriões à vitrificação.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em parte na Fazenda Três Corações, de propriedade da Agropecuária Ipê, município de Mandaguaçu, estado do Paraná, de abril a junho de 2007. Foram utilizadas 12 vacas da raça Nelore, Puro de Origem, com idade média de 4 anos, peso médio de 500 kg de peso vivo e escore corporal três (escala de 1 a 5). As vacas foram alojadas em piquetes com 150 m<sup>2</sup> e separadas em dois tratamentos: 1 = Controle (n=6) e Tratamento 2 = suplementadas com canola em grão (n=6). As vacas foram tratadas previamente com Ivermectina 1% (Ivomec, Merial®), e passaram 15 dias recebendo silagem de milho e o concentrado.

Em continuidade foram realizadas mais 4 aspirações em cada animal, com intervalo de 15 dias, para obtenção de óocitos suficientes para fecundação *in vitro*. Os óocitos foram quantificados e classificados como viáveis ou inviáveis, sendo os viáveis aqueles com presença de cumulus e ooplasma homogêneo e os inviáveis aqueles desnudos ou picnóticos, heterogêneos e com vesículas apoptóticas.

Após a maturação os óocitos foram fertilizados e seguidamente os zigotos foram cultivados *in vitro*, no meio SOF suplementado com SFB, com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 15 horas pós-inseminação, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 20% CO<sub>2</sub> em ar, com máxima umidade. Decorridas 48 horas, avaliou-se a taxa de clivagem e realizou-se a renovação do meio de cultivo. Nesse período, quando ocorre a clivagem, observa-se embriões com 2, 4 e 8 células. Os embriões com 2 células apresentam menor probabilidade de chegar ao estágio de blastocisto. Durante a avaliação da clivagem, retiraram-se as estruturas não clivadas da gota, por liberarem metabólitos prejudiciais aos embriões em desenvolvimento. Foram feitas duas outras avaliações, nos estágios de mórula (oito células) e blastocisto inicial.

Os embriões foram vitrificados em astes de vitrificação (Criotop® ou Vitri-ingá®) com os respectivos protetores. Os protetores das astes foram colocados horizontalmente num suporte no Vitri-Equip (equipamento próprio para o procedimento onde é colocado o nitrogênio líquido) para a estabilização da temperatura. Em uma placa de *Nunc* os embriões foram lavados nos dois primeiros poços contendo 400 µL de meio manutenção (AB Holding-Nutricell®), posteriormente foram transferidos para o terceiro poço e lavados por 5 a 15 minutos em uma solução de equilíbrio. Após esse período os embriões foram transferidos para uma placa de *Petri* e lavados em três gotas de 20 µL cada de solução de

vitrificação, passando por estas três gotas num tempo máximo de 1 minuto, ou seja, 20 segundos cada uma. Posteriormente os embriões foram rapidamente colocados na aste de vitrificação previamente identificada com o mínimo de meio possível e mergulhados diretamente no nitrogênio líquido, contido no Vitri-Equip, fechado com o protetor e, finalmente, armazenados no botijão.

Na seqüência, os embriões foram descongelados de acordo com o protocolo descrito a seguir. Fez-se a remoção do protetor da aste de vitrificação sob o nitrogênio líquido, e imersão da tira diretamente em 450 µL na solução de descongelamento contida numa placa de quatro poços aquecida a 38°C por um minuto. Posteriormente, transferiu-se o embrião pra outra placa com solução diluente em temperatura ambiente por 3 minutos. Depois os embriões foram lavados nos dois poços seguintes, por 5 minutos cada, com solução de lavagem, e finalmente, colocados em cultura com meio SOF – Nutricell® com atmosfera gasosa contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar, com máxima umidade, observando com 06, 12 e 24 horas observando a expansão e a eclosão dos mesmos.

Para avaliar os dados foi realizada análise de variância, utilizando o programa computacional SAEG.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que não houve efeito ( $p>0,05$ ), de canola em grão na dieta no número de oócitos viáveis. O número de oócitos viáveis é de importância fundamental em programas de FIV, pois está relacionado ao número de folículos presentes nos ovários no momento da aspiração folicular. (Ryan *et al.*, 1992, Staples *et al.*, 1996, Thomas *et al.*, 1997) têm mostrado que animais alimentados com dietas ricas em gordura apresentam aumento no número de folículos médios (5 – 9 mm) e grandes (>9,0 mm), podendo aumentar o número de oócitos produzidos, todavia isto não foi observado nos resultados deste experimento.

Tabela 1. Efeito da inclusão de canola em grão na dieta de vacas da raça Nelore no número de oócitos viáveis (NOV), taxa de clivagem (TCL) e taxa de blastocisto (TBL)

Variáveis	Tratamentos	
	T2-Canola	T1-Controle
NOV	12,66 ± 1,71	11,04 ± 1,77
TCL (%)	60,62 ± 4,72	61,39 ± 4,88
TBL (%)	23,69 ± 5,12	27,04 ± 5,30

Não houve efeito da inclusão ( $p>0,05$ ) da canola em grão na dieta, na taxa de clivagem e na taxa de blastocisto (Tabela 1). No entanto, outros trabalhos mostraram que a inclusão de gordura na dieta aumentou a taxa de gestação em vacas de leite e corte (De Fries *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1998; Ambrose *et al.*, 2006), sendo assim, este fator positivo parece não estar relacionado com a qualidade do oócito ou do embrião.

Tabela 2: Médias e erros-padrão das variáveis: número de oócitos viáveis (NOV), taxa de clivagem (TCL) e taxa de blastocisto (TBL) em função da ordem de punção (OPU) em vacas do grupo controle e suplementadas com canola.

OP	NOV		TCL		TBL	
	Canola	Controle	Canola	Controle	Canola	Controle
1	13,66±3,3	12,66±3,34	8,33±9,21	51,48±9,21	8,33±10,00	17,58±10,00
2	12,66±3,3	11,33±3,34	62,86±9,21	63,67±9,21	36,20±10,00	30,43±10,00
3	12,60±3,6	9,83±3,34	82,46±10,1	68,18±9,21	35,49±10,95	36,01±10,00
4	13,66±3,3	11,50±4,09	85,99±9,21	67,58±11,2	14,90±10,00	29,31±12,24

Estes resultados indicam que na medida em que as vacas são alimentadas com canola, ocorre um incremento na TCL até certo ponto, quando então ocorre uma estabilização, ou seja, a canola seria benéfica até a terceira punção quando passaria a não exercer mais este efeito.

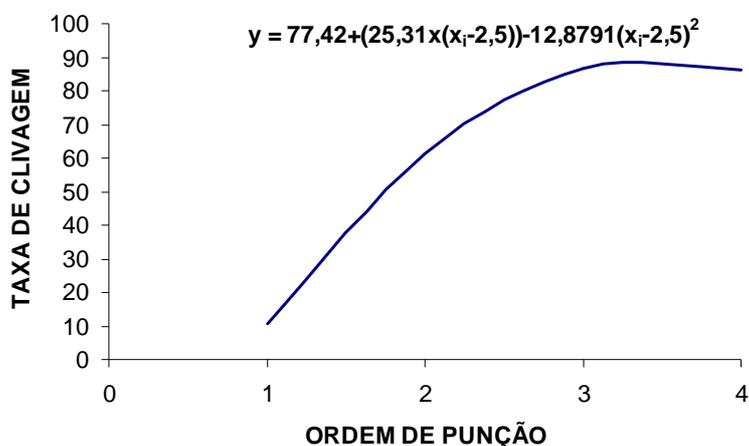


Figura 1 Taxa de clivagem em função da ordem de punção em vacas alimentadas com canola

Quanto a TBL, não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) devidos aos tratamentos e a ordem de punção. Entretanto, a interação tratamento e ordem de punção foi significativo ( $P < 0,05$ ) e, portanto, uma nova análise para o desdobramento das ordens de punções dentro de cada tratamento.

Com relação à taxa de re-expansão dos embriões (TEP), não houve efeito de tratamentos ( $P > 0,05$ ) após os procedimentos de vitrificação e descongelamento (Tabela 3). De acordo com os resultados deste experimento, parece que a utilização de canola em grão na alimentação de vacas da raça Nelore não alterou a re-expansão do blastocisto produzido in vitro.

Todavia, em relação à taxa de eclosão (TEC) verificou-se que houve efeito ( $P < 0,06$ ) entre os tratamentos. A eclosão dá-se pela lise de uma porção da zona pelúcida, formando um orifício através do qual o blastocisto se comprime e abandona a zona pelúcida, enquanto se expande (Prestes e Landim-Alvarenga, 2006). Observou-se que os oócitos obtidos de animais tratados com canola deram origem a um número maior de blastocistos eclodidos na vitrificação e descongelamento (Tabela 3), sugerindo maior resistência conferida aos embriões obtidos de oócitos de vacas suplementadas com canola em grão.

Tabela 3. Médias e erros-padrão para taxa de expansão (TEP) e taxa de eclosão (TEC) de embriões de vacas da raça Nelore

Tratamentos		
Variáveis	Canola	Controle
Taxa de Re-expansão	70,48 ± 6,99 a	59,62 ± 7,09 a
Taxa de Eclosão	69,17 ± 7,43 a	35,66 ± 6,86 b

Médias seguidas de letras diferentes deferem entre si pelo teste F ( $p = P < 0,06$ )

Estes dados poderiam explicar a maior taxa de eclosão dos embriões oriundos de oócitos das vacas suplementadas com canola, encontrada neste experimento. Isto porque o fornecimento deste grão deve ter alterado o perfil de ácidos graxos da membrana plasmática dos embriões, conferindo às mesmas maior fluidez e, portanto maior resistência às injúrias provocadas pelo processo de vitrificação e descongelamento.

## CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o fornecimento de canola em grãos na dieta de vacas Nelore, não altera a produção de oócitos viáveis e as taxas de clivagem, blastocisto e re-expansão. Todavia, os embriões de vacas alimentadas com canola em grão são mais resistentes ao processo de vitrificação do que embriões daquelas que não o foram.

## REFERÊNCIAS

AMBROSE, D. J.; KASTELIC, J. P.; CORBETT, R. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in  $\alpha$ -linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3066-3074, 2006.

CAVALIERI, F. L. B.; SANTOS, G. T.; PETIT, H. Taxa de gestação de novilhas alimentadas com duas fontes de gordura (Megalac® ou linhaça em grão) na dieta recebendo embriões congelados de vacas leiteiras alimentadas com LAC-100 ou linhaça em grão. **Acta Scientae Veterinariae**, n. 33 p. 216, 2005a. Suplemento 1.

DE FRIES, C. A.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Fat supplementation influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 36, p. 864-870, 1996.

GARCIA-BAJALIL, C. M., STAPLES, C. R., THATCHER, W. W. Protein Intake and Development of Ovarian Follicles and Embryos of Superovulated Nonlactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2537-2548, 1994.

GUTIÉRREZ, C. G. et al. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1876-1884, 1997.

HOLM, P.; CALLESEN, H. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 38, p. 579-594, 1998.

MOLLE, G.; BRANCA, A.; LIGIOS, S. Effect of grazing background and flushing supplementation on reproductive performance in Sarda ewes. **Small Ruminant. Research**, v. 17, p. 245-254, 1995.

MULLER, M. Fontes de gordura e flushing no desempenho de novilhas e vacas de corte no pós-parto. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. 135p Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2003.

NOLAN, R.; DUFFY, P.; WADE, M. Effect of quantity and type of diet and frequency of trans-vaginal ovum aspiration on in-vitro embryo development in heifers. **Theriogenology**, v. 49, p. 402, 1998.

PETIT, H. V. et al. Milk yield and reproduction of dairy cows fed saturated or unsaturated fat. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 302, 1998.

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. **Transferência e criopreservação de embrião bovino**. Biotécnicas aplicadas a reprodução animal. São Paulo: Varela, 2002.

RIGOLON, L. P., CAVALIERI, F. L. B.; BETINI, C. M. Inclusão de ácidos graxos poliinsaturados na dieta associado ou não ao bST na resposta superovulatória e produção de embriões em novilhas de corte. In: ARQUIVOS DA FACULDADE DE VETERINÁRIA UFRGS, 27, 1999, Campos do Jordão. **Anais...** Campos do Jordão: [S. n.], 1999, p. 283.

RIZOS, D. et al. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v. 56, p. 1-16, 2001.

RYAN, D. P.; SPOON, R. R.; WILLIAMS, G. L. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. **J. Anim. Sci.**, v. 70, p. 3505-3513, 1992.

SHAW, D. W. et al. Effect of Retinol palmitate rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 44, p. 51-58, 1995.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Symposium: optimizing energy nutrition for reproduction dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 856-871, 1998.

THOMAS, M. G.; BAO, B.; WILLIAMS, G. L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence growth in cows fed isoenergetic diets. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2512-2519, 1997.

TOMINAGA, K. et al. T. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 62, p. 465-467, 2000.

WILLIAMS, G. L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 785-793, 1989.

ZERON, Y. et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 45, p. 143-152, 2002.