



## Efeito da adição do isômero de CLA *trans-10*, *cis-12* no cultivo de embriões bovinos em diferentes volumes de meio

Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista<sup>1,2</sup>, Marco Antônio Sundfeld Gama<sup>2</sup>, Nádia Rezende Barbosa<sup>1</sup>, Paulo Henrique Almeida Campos Jr<sup>3</sup>, Bruno Campos Carvalho<sup>4</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>, João Henrique Moreira Viana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup>CES/JF – Centro Ensino de Superior de Juiz de Fora

<sup>4</sup>Epamig – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

e-mail: [ribrio@yahoo.com.br](mailto:ribrio@yahoo.com.br)

**Resumo:** A eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido limitada pela baixa criotolerância, possivelmente associada ao grande acúmulo de lipídeos decorrentes das condições de cultivo *in vitro*. Recentemente, diversos trabalhos tem demonstrado que a suplementação de ácido linoléico conjugado (CLA) *trans-10*, *cis-12* podem interferir no metabolismo lipídico. Objetivou-se no presente estudo avaliar o efeito desta molécula no cultivo de embriões bovinos. Complexos cumulus oócito (CCOs), obtidos a partir de ovários de matadouro, foram maturados e fecundados *in vitro*. Os possíveis zigotos foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos (T1: controle, embriões cultivados em gotas de 50 µL; T2: segundo controle, embriões cultivados em gotas de 400 µL; T3: embriões cultivados em gotas de 50 µL contendo 100 µM de *trans-10*, *cis-12* (Matreya, ref. 001249) e T4: embriões cultivados em gotas de 400 µL contendo 100 µM de *trans-10*, *cis-12* (Matreya, ref. 001249). O meio-base para todos os tratamentos foi CR2aa acrescido de 10% de soro fetal bovino. A taxa de clivagem foi avaliada 48 horas pós-fecundação e a de blastocisto 192 horas pós-fecundação. As taxas de clivagem foram: 65,8%, 69,5%, 70,5% e 74,4% para T1, T2, T3 e T4, respectivamente, e de blastocisto 24,0%, 35,6%, 31,6%, 29,4%. Conclui-se que a presença de CLA (*trans-10*, *cis-12*) no meio de cultivo não afeta a produção de embriões. Novos estudos estão sendo conduzidos para avaliar a viabilidade dos embriões produzidos neste sistema.

**Palavras-chave:** ácido linoléico conjugado, cultivo, produção *in vitro*,

### Effect of addition of isomer of CLA *trans-10*, *cis-12*, in culture of bovine embryos in different volumes of medium

**Abstract:** The efficiency of *in vitro* embryos production (IVPE) has been limited by low cryotolerance, possibly associated with a large accumulation of lipids, consequence of *in vitro* culture conditions. Recently, several studies have shown that supplementation of conjugated linoleic acid (CLA) *trans-10*, *cis-12* may interfere with lipid metabolism. The objective of this study was to evaluate the effect of this molecule in the culture of bovine embryos. Cumulus oocyte complexes (CCOs), obtained from slaughterhouse ovaries were matured and fertilized *in vitro*. The possible zygotes were randomly distributed into four treatments (T1: control, embryos cultured in drops of 50 µL, T2: second control, embryos cultured in drops of 400 µL; T3: embryos cultured in drops of 50 µL containing 100 µM of *trans-10*, *cis-12* (Matreya, ref. 001249) and T4: embryos cultured in drops of 400 µL containing 100 µM of *trans-10*, *cis-12* (Matreya, ref. 001249). The basic medium for all treatments was CR2aa plus 10% fetal bovine serum. The rate of cleavage was assessed 48 hours post-insemination and blastocyst of 192 hours post-fertilization. The rates of cleavage were: 65.8%, 69.5%, 70.5% and 74.4% for T1, T2, T3 and T4, respectively, and blastocyst 24.0%, 35.6%, 31.6%, 29.4%. We conclude that the presence of CLA (*trans-10*, *cis-12*) in the medium does not affect the production of embryos. New studies are being conducted to assess the viability of embryos produced in this system.

**Keywords:** conjugated linoleic acid, *in vitro* production, cultivate.

### Introdução



A produção *in vitro* de embriões (PIVE), em bovinos, tem contribuído de maneira significativa para o melhoramento genético de animais de interesse zootécnico, possibilitando um ganho genético anual acima de 10%, quando aplicada apropriadamente. A baixa taxa de sobrevivência dos embriões oriundo desta biotecnologia após a criopreservação, contudo, tem limitado a utilização desta na formação de bancos de germoplasma. Neste contexto, grande esforço tem sido realizado para melhorar a taxa de sobrevivência após a criopreservação dos embriões oriundos desta biotecnologia. A alta sensibilidade dos embriões produzidos *in vitro* pode estar relacionada ao alto conteúdo lipídico intracelular, que por sua vez é influenciado diretamente pelo ambiente de cultivo, particularmente pela inclusão de soro, o qual, apesar de contribuir para aumento das taxas de blastocisto, leva à alteração no metabolismo dos embriões, provocando acúmulo de lipídios. Estudos sobre nutrição tem relatado efeitos bioativos de alguns ácidos graxos no metabolismo. Um exemplo disto são os ácidos linoléicos conjugados (CLA), termo que se refere a uma mistura de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoléico, onde as insaturações são conjugadas, ou seja, separadas por simples ligações carbono-carbono. Dentre as combinações possíveis com estas características, duas tem chamado bastante atenção da comunidade científica pelo efeito anticarcinogênico (*cis-9, trans-11*) e antiobesidade (*trans-10, cis-12*). A suplementação do isômero de CLA *trans-10 cis-12* na dieta reduz o acúmulo de lipídios através da redução dos níveis de RNA mensageiros (RNAm) das enzimas lipogênicas (BAUMGARD *et al.*, 2002), redução no tempo da primeira ovulação pós-parto e aumento de índice de prenhez (BERNAL-SANTOS *et al.*, 2003; CASTAÑEDA-GUTIERREZ *et al.*, 2005). Desta forma, o uso deste isômero *trans-10, cis-12*, pode representar uma importante alternativa no controle do excesso de lipídios observado nos embriões bovinos produzidos *in vitro* (PEREIRA *et al.*, 2006). Contudo, a possibilidade de geração de radicais livres decorrente do metabolismo do CLA no peroxissomo requer a avaliação de possíveis efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário. Objetivou-se no presente estudo avaliar a possibilidade da adição do isômero *trans-10, cis-12* na produção *in vitro* de embriões bovino, sem comprometimento dos resultados desta.

### Material e Métodos

Presente estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução de Embrapa de Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG. Foi utilizado um total de 408 presumíveis zigotos, divididos em quatro repetições e distribuídos nos seguintes tratamentos: T1 – primeiro controle, embriões cultivados na gota de 50  $\mu$ L, T2: segundo controle, embriões cultivados na gota de 400 $\mu$ L, T3: embriões cultivados na gota de 50  $\mu$ L, adicionada com 100  $\mu$ M de *trans-10, cis-12* (Matreya, ref. 001249) e T4: embriões cultivados na gota de 400  $\mu$ L com 100  $\mu$ M de *trans-10, cis-12* (Matreya, ref. 001249). Os embriões foram produzidos a partir de oócitos obtidos de ovários abatedouro.

#### Coleta dos ovários

Ovários coletados de matadouro local foram transportados para o Laboratório em solução fisiológica (NaCl 0,9%) contendo de sulfato de estreptomicina (0,05g/L) aquecida a 35°C. No laboratório, após subseqüentes lavagens em solução fisiológica, os folículos de 3-8 mm foram aspirados com auxílio de uma agulha acoplada a uma seringa de 10 mL, e os oócitos com três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram selecionados com auxílio de um microscópio estereoscópico. Em seguida, os complexos *cumulus*-oócito (COCs) selecionados foram lavados mais duas vezes em meio TALP-Hepes e uma vez em TCM-199 (Gibco), antes de serem colocados para maturação.

#### Maturação *in vitro* dos COCs

A maturação *in vitro* dos COCs foi realizada em meio TCM 199 contendo 10% de soro de vaca em estro e 20 $\mu$ g/mL de FSH, em poços com 400 $\mu$ L, na estufa incubadora a temperatura de 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas.

#### Fecundação *in vitro* dos oócitos

COCs maturados *in vitro* foram transferidos para gotas de fertilização *in vitro*, que foi realizada utilizando-se sêmen previamente selecionado. Para preparação dos espermatozoides foi utilizado o método do gradiente de Percoll (*Nutricell*). A fecundação foi realizada nas gotas de 100 $\mu$ L de meio FERT-TALP contendo 10 $\mu$ L/mL de heparina e com 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, sob óleo mineral (Sigma), por um período de aproximadamente 20 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação *in vitro*.

#### Cultivo *in vitro* dos embriões



Para cultivo os presumíveis zigotos foram divididos em quatro tratamentos, conforme previamente descrito. O meio-base para todos os tratamentos foi CR2aa contendo 10% de soro fetal bovino em gotas de 50µL, sob óleo mineral, ou de 400µL sem óleo mineral. Os embriões foram co-cultivados com células da granulosa nas mesmas condições de fecundação. Após 48 horas do início do cultivo, 50% do meio foi renovado e a taxa de clivagem avaliada. No oitavo dia após a fecundação a taxa de blastocisto foi avaliada.

#### Análise estatística

As taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas pelo método do Qui-quadrado, com nível de significância de 5%.

### Resultados e Discussão

A suplementação de CLA no meio de cultivo não afetou as taxas de clivagem dos embriões, tanto no cultivo em gora de 50µL quanto no cultivo em gota de 400µL. O mesmo foi observado em relação à taxa de blastocisto (Tabela 1). A porcentagem total de embriões que clivaram e desenvolveram até o estágio de blastocisto foi de 40,3% do tratamento com CLA (*trans-10, cis-12*) e 45,4% do tratamento controle. O presente estudo mostra que a suplementação de CLA no meio de cultivo, mesmo realizando-se uma única renovação do meio no período do cultivo e utilizando-se gotas de menor volume, não interferiu na produção de embriões.

Tabela 1 Desenvolvimento embrionário dos presumíveis zigotos, cultivados na presença e na ausência de CLA (*trans-10, cis-12*), taxa de clivagem (48 após a fecundação) e taxa de blastocisto (192h após a fecundação).

Tratamento	Gotas	Oócitos fecundados	Taxa de Clivagem n (%)	Embriões n (%)
T1	50µL	79	52 (65,82) <sup>a</sup>	20 (24,05) <sup>a</sup>
T2	400 µL	118	82 (69,49) <sup>a</sup>	42 (35,59) <sup>a</sup>
Total controle		197	134 (68,02)*	61 (30,96)*
T3	50µL	78	55 (70,51) <sup>a</sup>	20 (25,64) <sup>a</sup>
T4	400 µL	133	99 (74,43) <sup>a</sup>	42 (31,58) <sup>a</sup>
Total CLA		211	154 (72,98)*	62 (29,38)*

a Dados na mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem (P<0,05)

\* Valores totais dos grupos controle e com adição de CLA não diferem (P<0,05)

### Conclusões

Os resultados obtidos demonstram que a presença do isômero CLA *trans-10, cis-12*, no meio de cultivo, não afeta a produção *in vitro* de embriões bovino, independente do volume de meio utilizado, e pode ser uma alternativa para modular o metabolismo lipídico no período de cultivo.

### Agradecimentos

Embrapa Gado de Leite; UFJF; FAPEMIG.

### Literatura citada

- BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A.; et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85 p. 2155, 2002.
- BERNAL-SANTOS, G.; PERFIELD, J.W.; BARBOSA, D. M.; et al. Production of dairy cows to dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) during the transition period and lactation. **Journal Dairy Science**. v. 86 p. 3218-3228, 2003.
- CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ, E.; OVERTON, T.R.; BUTLER, R.W.; et al. Dietary supplements of two doses of calcium salts of conjugated linoleic acid during the transition period and early lactation. **Journal Dairy Science**. v. 88, p. 1078-1089, 2005.
- PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I. 2006. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t,12c* CLA). **Animal Reproduction Science**, 98: 293–301.