



## XII CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE

XII Workshop de Políticas Públicas  
XIII Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

### **Análise quantitativa de lipídeos em oócitos de vacas leiteiras das raças Gir Leiteiro, Holandesa, e mestiças F1<sup>1</sup>**

Clara Slade Oliveira<sup>2</sup>, Raquel Varella Serapião<sup>3</sup>, Naiara Zoccal Saraiva<sup>4</sup>, Agostinho Jorge dos Reis Camargo<sup>5</sup>, Marcos Brandão Dias Ferreira<sup>6</sup>, Célio de Freitas<sup>7</sup>, Joaquim Mansano Garcia<sup>8</sup> e Rui da Silva Verneque<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq, FAPEMIG e FAPERJ

<sup>2</sup>Analista, EMBRAPA Gado de Leite, Valença/RJ. Email: clara.oliveira@embrapa.br

<sup>3</sup>Pesquisadora, PESAGRO-RIO, Niterói/RJ

<sup>4</sup>Pesquisadora, EMBRAPA Amazônia Oriental, Belém/PA

<sup>5</sup>Pesquisador, PESAGRO-RIO, Niterói/RJ

<sup>6</sup>Pesquisador, EPAMIG, Uberaba/MG

<sup>7</sup>Analista, EMBRAPA Gado de Leite, Valença/RJ

<sup>8</sup>Professor Titular, UNESP, Jaboticabal/SP

<sup>9</sup>Pesquisador, EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora/MG – Bolsista do CNPq

**Resumo:** A produção *in vitro* de embriões vem se consolidando como ferramenta para a produção de animais leiteiros. No entanto, alterações na qualidade oocitária entre doadoras, como o acúmulo excessivo de lipídeos citoplasmáticos, afetam a eficiência do processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade relativa de lipídeos presente em oócitos de diferentes composições raciais e classes morfológicas. Para tanto, oócitos provenientes de doadoras das raças Gir Leiteiro e Holandesa (HOL), e mestiças F1 foram avaliados. O conteúdo lipídico de oócitos G3 foi comparados entre as três composições raciais, bem como de oócitos G1, G2 e G3 de vacas F1. As estruturas recuperadas foram fixadas e coradas com OilRed O (Sigma). Imagens foram capturadas de cada estrutura, e avaliadas no programa ImageJ (NIH). A fração de área positiva foi comparada entre grupos pelo teste Qui-quadrado. Observou-se quantidade relativa inferior ( $p < 0.05$ ) de lipídeos em oócitos Gir, comparados aos grupos HOL e F1. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os grupos HOL e F1. Em oócitos F1, foi observada quantidade relativa inferior ( $p < 0.05$ ) no grupo G1. Não foi observada diferença entre os grupos G2 e G3. Os resultados apontam quantidade reduzida de lipídeos em grupos experimentais com maior potencial de desenvolvimento embrionário, enfatizando a importância das estratégias visando à redução de lipídeos oocitários para aumentar a eficiência da produção *in vitro* de embriões em sistemas de produção de leite.

**Palavras-chave:** Composição lipídica, Gir Leiteiro, Holandesa, PIV, qualidade do oócito

### **Quantitative lipid analysis in oocytes from Gyr, Holstein and F1 dairy cows**

**Abstract:** In vitro production of embryos has been consolidated as a tool for the production of dairy animals. However, changes in oocyte quality between donors, as cytoplasmic lipidic accumulation, affect the efficiency of the process. The aim of this study was to evaluate the relative amount of lipids present in oocytes from different breeds and classes. For that, oocytes from Gyr, Holstein (HOL), and F1 cows were evaluated. G3 structures were compared between the three breeds, and then structures from F1 cows (classes G1, G2 and G3) were compared. The recovered structures were fixed and stained with OilRed O (Sigma). Images were captured from each structure, and evaluated using ImageJ (NIH) software. The positive area fraction was compared between groups using chi-square test. Lower ( $p < 0.05$ ) relative lipid amount was observed for Gyr oocytes compared to F1 and HOL groups. No difference was detected between groups F1 and HOL. In F1 oocytes, lower ( $p < 0.05$ ) lipid relative



## XII CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE

XII Workshop de Políticas Públicas  
XIII Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

content was detected in G1. No difference was observed between G2 and G3. The results indicate reduced amount of lipids in experimental groups with the highest potential for embryonic development, emphasizing the importance of strategies aiming at reduced lipid accumulation in oocytes, to increase the efficiency of in vitro embryo production in milk production systems.

**Keywords:** Dairy Gyr, Holstein, IVF, lipid composition, oocyte quality

### Introdução

A produção de bezerras F1 pelo cruzamento das raças Gir Leiteiro e Holandesa (HOL), e a utilização de fêmeas F1 para produção de bezerras com grau de sangue  $\frac{3}{4}$  Holandesa, são importantes segmentos da cadeia produtiva do leite, agregando aos produtos características de rusticidade e produção leiteira. Com o advento do sêmen sexado e sua aplicação na produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Wheeler M.B. *et al.*, 2006), esta biotécnica vem se consolidando como ferramenta para produção destes animais, por possibilitar o aumento em número dos produtos gerados a partir de matrizes puras de interesse zootécnico, além da fixação do grau de sangue desejado em cruzamentos. Entre as raças Gir Leiteiro e Holandesa, são descritas alterações no desempenho com relação à produção de oócitos viáveis e embriões (Pontes *et al.*, 2010). Dentre os fatores que afetam a qualidade oocitária, o excesso de lipídeos é apontado como prejudicial ao desenvolvimento embrionário e à criopreservação (Vajta *et al.*, 1998). Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi comparar a quantidade de lipídeos citoplasmáticos observada em oócitos de doadoras das raças puras, e em doadoras F1, associando este resultado à classificação morfológica das estruturas.

### Material e Métodos

Doadoras de oócitos das raças Gir Leiteiro e Holandesa (HOL), e mestiças F1, mantidas à pasto, foram selecionadas aleatoriamente para coleta de gametas. Os animais foram submetidos a punções foliculares guiadas por ultrassonografia, e folículos de 2 a 8 mm foram aspirados. Complexos *cumulus*-oócito foram classificados em: G1: mais de 3 camadas e citoplasma homogêneo/ G2: mais de 3 camadas e citoplasma com granulações; ou menos de 3 camadas e citoplasma homogêneo/ G3: menos de 3 camadas e citoplasma com granulações; ou parcialmente desnudos e citoplasma homogêneo ou com leves granulações. Oócitos G3 dos três grupos raciais foram selecionados para o experimento 1, e oócitos G1, G2 e G3 de doadoras F1 foram selecionados para o experimento 2. As células do *cumulus* foram removidas com hialuronidase (80 UI/mL), e as estruturas foram fixadas em PFA 4% a 37° C por 30 min. A coloração de lipídeos foi realizada com o corante OilRed O (Sigma), conforme orientações do fabricante. Os oócitos foram montados em lâminas para visualização em microscópio, e imagens de cada estrutura foram capturadas, e analisadas no programa Image J (NIH). As imagens foram delimitadas pela membrana vitelina, e a área corada em vermelho mensurada pelo software. A fração de área citoplasmática ocupada por gotículas lipídicas foi avaliada em cada grupo, e os resultados foram comparados pelo teste Qui-Quadrado ( $p=0.05$ ). Os resultados são apresentados como a fração total de área positiva, e as barras representam o erro padrão observado entre estruturas avaliadas em cada grupo.

### Resultados e Discussão

No experimento 1, avaliou-se a fração lipídica citoplasmática em oócitos G3, provenientes de doadoras Holandesas, F1, e Gir Leiteiro ( $n=26$  animais, 8-10 por grupo, totalizando 30 oócitos avaliados, 9-12 por grupo). Conforme disposto na Figura 1, observam-se frações lipídicas semelhantes em oócitos de doadoras Holandesas ( $15,77\pm 1,98$ ) e F1 ( $16,43\pm 1,57$ ). No entanto, doadoras Gir apresentaram fração lipídica reduzida ( $p<0.05$ ) em relação aos demais grupos ( $10,36\pm 2,67$ ). A classe de oócitos G3 corresponde a maior parte dos oócitos recuperados no laboratório onde o experimento foi



## XII CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE

XII Workshop de Políticas Públicas  
XIII Simpósio de Sustentabilidade da Atividade Leiteira

realizado (LRA-CESM), e por isso apresenta grande importância para a eficiência do processo de produção *in vitro* de embriões. Neste contexto, a quantidade reduzida de lipídeos em oócitos Gir pode refletir em maior qualidade oocitária. Ainda, a observação de que menor quantidade de lipídeos está presente em embriões de raças zebuínas (Visintin et al., 2002) pode ter origem na redução de lipídeos desde o estágio oocitário.

No experimento 2, avaliou-se a fração lipídica em oócitos de animais F1 de diferentes classes (G1, G2 e G3) (n=8 animais, totalizando 32 oócitos, 6-14 por classe). Observam-se frações lipídicas reduzidas ( $p < 0.05$ ) em oócitos G1 ( $12,47 \pm 2,77$ ), comparados às classes G2 ( $16,38 \pm 3,31$ ) e G3 ( $16,43 \pm 1,57$ ). Entre as classes G2 e G3, não foi observada diferença estatística ( $P > 0,05$ ). Oócitos G1 apresentam melhor aparência morfológica, e normalmente apresentam qualidade superior às demais estruturas. O resultado apresentado fortalece esta tendência, considerando que estruturas com menor composição lipídica apresentam qualidade superior (Vajta et al. 1998).

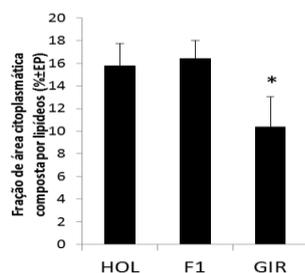


Figura 1. Quantificação relativa de lipídeos oocitários em estruturas G3 obtidas de doadoras das raças Holandesa, Gir, e F1. \*Asteriscos representam diferença com os demais grupos (Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ).

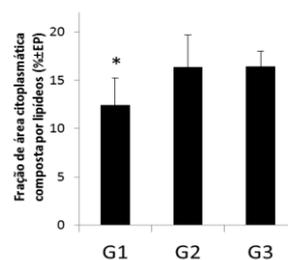


Figura 2. Quantificação relativa de lipídeos oocitários em estruturas G1, G2 e G3 obtidas de doadoras mestiças (F1) entre as raças Holandesa e Gir. \*Asteriscos representam diferença com os demais grupos (Qui-quadrado,  $p < 0.05$ ).

### Conclusões

Os resultados apresentados permitem concluir que nas condições experimentais apresentadas, a quantificação de lipídeos citoplasmáticos pela coloração Oil Red O é um parâmetro interessante para avaliar qualidade oocitária, considerando que oócitos com quantidade reduzida de lipídeos foram encontrados nos grupos experimentais com maior potencial de desenvolvimento embrionário. Neste contexto, estratégias visando à redução de lipídeos oocitários são importantes para aumentar a eficiência da produção *in vitro* de embriões em sistemas de produção de leite.

### Literatura citada

- PONTES, J.H. et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74(8), p.1349-1355, 2006.
- VAJTA, G. et al. Open pulled straw (ops) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, 51(1), p. 53-8, 1998.
- WHEELER, M.B. et al. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65(1), p. 219-227, 2006.
- VISINTIN, J.A. et al. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology*, 57(1), p. 345-59, 2002.