

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**VIABILIDADE PÓS VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES F1 HOLANDÊS X
ZEBU PRODUZIDOS *IN VITRO* E CULTIVADOS EM MEIO CONTENDO
ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO**
Ana Carolina Leite

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2014**

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**VIABILIDADE PÓS VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES F1 HOLANDÊS X
ZEBU PRODUZIDOS *IN VITRO* E CULTIVADOS EM MEIO CONTENDO
ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO**

Ana Carolina Leite

Dissertação apresentada na Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Alan Maia Borges
Coorientador: Dr. Bruno Campos de Carvalho

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2014

L533v

Leite, Ana Carolina, 1988-

Viabilidade pós vitrificação de embriões F1 Holandês X Zebu produzidos *in vitro* e cultivados em meio contendo ácido linoléico conjugado / Ana Carolina Leite. – 2014.

49p. : il.

Orientador: Alan Maia Borges

Co-orientador: Bruno Campos de Carvalho

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Reprodução – Teses. 2. Bovino de leite – Embriões – Criopreservação – Teses. 3. Vaca – Transferência de embriões – Teses. I. Borges, Alan Maia. II. Carvalho, Bruno de Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.214 089 26

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Carolina Leite

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e Mestre em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

Aprovada em 28 de maio de 2014, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Alan Maia Borges
Presidente - Orientador



Dra. Bruna Rios Coelho Alves
EMBRAPA - Juiz de Fora



Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
Escola de veterinária - UFMG

Dedico esse trabalho aos meus pais, Emílio e Ana Beatriz, ao meu irmão, Luiz Guilherme, à minha família e amigos pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

A realização dessa dissertação marca o fim de uma etapa muito importante para mim. Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização desse trabalho.

A Deus, por me conceder sabedoria na escolha dos melhores caminhos, coragem para acreditar e força para não desistir e começar de novo quantas vezes fosse preciso.

À Escola de Veterinária da UFMG por possibilitar a realização deste trabalho. A todos os professores e técnicos da Reprodução Animal, pelo auxílio técnico e esclarecimento de dúvidas. Ao Prof. Marc Henry por ter ajudado na retomada da rotina do laboratório e por estar disponível sempre que precisamos.

À FAPEMIG (Projeto CVZ APQ 0912-12), pelo apoio financeiro. À CAPES, pela bolsa de estudos.

Ao Prof. Alan Maia Borges pela orientação, pela ajuda e pela oportunidade de trabalhar com produção *in vitro* de embriões.

Aos meus pais e meu irmão, obrigada por compartilharem comigo meus sonhos e acreditarem que eu fosse capaz de alcançá-los. À minha mãe, minha amiga e conselheira, por acreditar em mim e não me deixar desanimar diante de todas as dificuldades, você foi essencial nesse processo, não teria conseguido chegar aqui sem a sua força. Ao meu pai, pelo apoio e incentivo. Ao meu irmão, que acompanhou todo o processo de longe, mas sempre presente.

À minha família, meus avós, minha madrinha, meus tios e primos que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao Cenatte Embriões, pelo fornecimento dos meios e por todo o suporte técnico, especialmente ao Antônio Júnior e ao Roberti por terem aceitado essa parceria, por abrir as portas do Cenatte e por todo o auxílio e esclarecimentos técnicos, a ajuda de vocês foi essencial na realização deste trabalho.

Ao frigorífico Santa Vitória, por possibilitar que fizéssemos a coleta dos ovários com a frequência que o experimento demandou, disponibilizando toda a sua estrutura, instrumentos e remanejamento de funcionários para que a coleta fosse feita dentro dos padrões ideais. À Adriana, Médica Veterinária responsável técnica do estabelecimento, por autorizar que as coletas fossem realizadas. À Edvina, por toda ajuda e pelo carinho e alegria que tinha ao nos receber, mesmo em dias de trabalho pesado.

À EPAMIG, por proporcionar que eu fizesse as transferências na fazenda de Felixlândia, fornecer os animais, acomodamento durante os dias de transferência de embrião e disponibilizar toda a estrutura da fazenda e os funcionários para o bom andamento do experimento. Gostaria de agradecer especialmente ao Dr. José Reinaldo, ao Arismar e ao Geraldo, por ter nos recebido tão bem e pela boa vontade e disponibilidade de nos ajudar sempre que precisamos.

À Eliane, pelo seu trabalho e dedicação ao experimento, por não me deixar desistir nos momentos difíceis, por me ajudar e incentivar a recomeçar, por estudar junto comigo, nada seria possível sem você. Muito obrigada pela amizade e pelo trabalho duro para que eu conseguisse terminar o experimento.

À equipe do Prof. Alan, à Telma e à Clarice, por não medir esforços em me ajudar, e, em especial, ao Virgílio que teve a oportunidade de acompanhar todo o processo, espero que tenha conseguido passar um pouco do que já conhecia e do que eu aprendi com esse trabalho.

Ao Danilo, pelas análises estatísticas e pela atenção dispensada.

Ao Juneo, pela ajuda nas colorações e quantificação lipídica.

Ao Roberto e ao Tião, por todos os ensinamentos e esclarecimento de dúvidas, obrigada pela oportunidade de trabalhar com vocês e aprender a importância da pesquisa aplicada.

Aos meus amigos, pelo apoio e acolhimento nos momentos de aflição, por acreditarem em mim e por torcerem junto comigo para que tudo desse certo, nada seria possível sem vocês.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

“There is no chance, no destiny, no fate, that can hinder or control the firm resolve of a determined soul”
(Wilcox)

LISTA DE ABREVIATURAS

Be - Blastocisto eclodido
BE - Benzoato de estradiol
Bi - Blastocisto inicial
Bl - Blastocisto
Bx - Blastocisto expandido
CE - Cipionato de estradiol
CCOs - Complexo *cumulus-oophorus*
CIV - Cultivo *in vitro* de embriões
CLA - Isômero do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12*
DMSO - Dimetil sulfóxido
DPBS - *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*
eCG - Gonadotrofina coriônica equina
EG - Etilenoglicol
F1 HZ - Primeira geração de cruzamento Holandês X Zebu (1/2 Holandês X 1/2 Zebu)
FIV - Fecundação *in vitro* do complexo *cumulus-oophorus*
FSH - Hormônio folículo estimulante
HM - *Holding Medium*
HZ - Cruzamento Holandês X Zebu
IETS - *International Embryo Transfer Society*
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
MIV - Maturação *in vitro* do complexo *cumulus-oophorus*
OPU - *Ovum Pick Up*
P4 - Progesterona
PES - Etilsulfato de Fenasetina
PGF2 α - Prostaglandina F2 α
PIV - Produção *in vitro* de embriões
PBS - Salina fosfatada tamponada
PVA- Polivinilpirrolidona
SFB - Soro fetal bovino
SOF - *Synthetic Oviduct Fluid Medium*
TALP - *Tyrode/albumin/sodium lactate/sodium pyruvate*
TCM - *Tissue Culture Medium*

SUMÁRIO

RESUMO	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>Panorama da produção de leite no Brasil</i>	16
2.2 <i>Produção in vitro de embriões em gado de leite</i>	17
2.3 <i>Utilização do sêmen sexado para fêmea na produção in vitro de embriões bovinos</i>	19
2.4 <i>Criopreservação de embriões produzidos in vitro</i>	19
2.5 <i>Fatores que influenciam a sobrevivência embrionária pós criopreservação/aquecimento</i>	22
2.6 <i>O ácido linoléico conjugado trans-10, cis-12 (CLA)</i>	23
2.7 <i>Transferência de embrião vitrificado/aquecido</i>	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 <i>Produção in vitro de embriões</i>	27
3.1.1 <i>Coleta dos ovários</i>	27
3.1.2 <i>Maturação in vitro (MIV) dos complexos cummulus-oophorus (COCs)</i>	27
3.1.3 <i>Fecundação in vitro dos oócitos (FIV)</i>	29
3.1.4 <i>Cultivo in vitro dos embriões (CIV)</i>	30
3.2 <i>Vitrificação dos embriões</i>	30
3.2.1 <i>Aquecimento dos embriões</i>	32
3.2.2 <i>Análise do conteúdo lipídico das células embrionárias</i>	32
3.3 <i>Coloração das amostras</i>	32
3.3.1 <i>Quantificação lipídica</i>	33
3.4 <i>Avaliação da reexpansão e eclosão dos embriões pós aquecimento</i>	33
3.5 <i>Avaliação sobrevivência embrionária pós transferência</i>	33
3.6 <i>Análise Estatística</i>	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 <i>Produção in vitro de embriões de acordo com os grupos experimentais</i>	35
4.2 <i>Quantificação do teor lipídico embrionário</i>	37
4.3 <i>Avaliação da reexpansão e eclosão dos embriões pós aquecimento</i>	41
4.4 <i>Avaliação sobrevivência embrionária pós transferência</i>	43
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	<i>Classificação de oócitos segundo as características dos complexos cummulus-oophorus (COCs) e do citoplasma do oócito.....</i>	28
Tabela 2	<i>Grupos experimentais para cultivo in vitro de embriões.....</i>	29
Tabela 3	<i>Classificação dos blastocistos de sete dias de desenvolvimento in vitro, de acordo com a International Embryo Transfer Society.....</i>	30
Tabela 4	<i>Taxa de clivagem de oócitos, taxa de produção de blastocistos em relação ao número de embriões clivados e taxa de produção de blastocistos em relação ao total de oócitos inseminados, de acordo com cada grupo experimental.....</i>	35
Tabela 5	<i>Taxas de reexpansão e de eclosão dos embriões bovinos produzidos in vitro e submetidos à vitrificação no sétimo dia de cultivo, de acordo com o grupo experimental.....</i>	40
Tabela 6	<i>Reexpansão e eclosão dos embriões, de acordo com os grupos experimentais, em 24, 48 e 72 horas de cultivo.....</i>	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Estrutura das moléculas de ácido linoléico, ácido linoléico conjugado cis-9, trans-11 (cis-9, trans-11 (CLA)) e ácido linoléico conjugado trans-10, cis-12 (trans-10, cis-12 (CLA)).....</i>	24
Figura 2	<i>Cronograma das atividades laboratoriais após o cultivo embrionário in vitro.....</i>	27
Figura 3	<i>Esquema com a sequência de procedimentos para a vitrificação embrionária em Open Pulled Straw (OPS).....</i>	31
Figura 4	<i>Esquema com a sequência de procedimentos para o aquecimento de embriões vitrificados em Open Pulled Straw (OPS).....</i>	31
Figura 5	<i>Quantificação lipídica por coloração com Sudan Black B.....</i>	32
Figura 6	<i>Protocolo de sincronização do estro para as receptoras de embrião.....</i>	33
Figura 7	<i>Composição lipídica dos diferentes grupos experimentais.....</i>	37
Figura 8	<i>Embriões corados pelo Sudan Black B segundo grupo experimental.....</i>	39
Figura 9	<i>Viabilidade embrionária in vitro.....</i>	40

RESUMO

Considerando a importância de fêmeas mestiças F1 Holandês X Zebu (HZ) para a produção leiteira no Brasil e as inconsistências existentes na técnica de criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, foi avaliado o efeito da adição de ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) ao meio de cultivo *in vitro* na viabilidade pós vitrificação de embriões F1 HZ. O CLA é um ácido graxo que tem a propriedade de diminuir a lipogênese nas células embrionárias, melhorando a qualidade do embrião produzido e, possivelmente, diminuindo a sua sensibilidade à criopreservação. Foram utilizados três meios de cultivo: Controle ($n=340$ oócitos): meio SOF acrescido de albumina sérica bovina (BSA) e soro fetal bovino (SFB), sem o CLA; SFB+CLA ($n=359$ oócitos): meio SOF acrescido de BSA, SFB e CLA; CLA ($n=339$ oócitos): meio SOF acrescido de BSA e CLA, sem o SFB. No sétimo dia de cultivo (D7) foi avaliada a produção de blastocistos, de acordo com cada tratamento. Todos os blastocistos produzidos foram submetidos à vitrificação, pelo método de *Open Pulled Straw* (OPS), para posterior aquecimento e avaliação do conteúdo lipídico ou da viabilidade embrionária. Quinze blastocistos de cada tratamento foram fixados para a análise da concentração de lipídeos intracitoplasmáticos por meio de coloração com *Sudan Black B*. Para avaliar a viabilidade do embrião produzido, embriões vitrificados foram aquecidos (Controle=27; SFB+CLA=30; CLA=17) e cultivados *in vitro* para a observação de sua capacidade de reexpansão e eclosão. Para avaliar a viabilidade após a transferência de embriões, foram utilizados 23 embriões do grupo Controle, 20 embriões do grupo SFB+CLA e 28 embriões do grupo CLA. Foram realizadas transferências de um ($n=17$, sendo Controle=5, SFB+CLA=6 e CLA=6) ou dois embriões ($n=27$, sendo Controle=9, SFB + CLA=7 e CLA=11) para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Não houve diferença nas taxas de clivagem (62,1%; 74%; 74% para Controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente), produção de blastocistos em relação aos clivados (59,7%; 47,7%; 38,3% para Controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente) e produção de blastocistos em relação ao total de oócitos submetidos à fecundação (37,1%; 35,4%; 28,3% para Controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente) ($P>0,05$). A presença do CLA no meio de cultura resultou na diminuição de gotas lipídicas intracitoplasmáticas, já que os embriões cultivados na presença do SFB e na ausência do CLA (Controle) apresentaram aumento significativo de gotículas lipídicas em relação aos demais tratamentos ($P<0,05$). Em relação à reexpansão, o tratamento CLA foi inferior ao Controle e superior ao SFB+CLA (70,4%; 43,3%; 47,1% para Controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente) ($P<0,05$). Os três tratamentos apresentaram taxas de eclosão semelhantes (42,1%; 23,1%; 25% para Controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente) ($P>0,05$). Apenas uma gestação foi confirmada, sendo proveniente da transferência de apenas um embrião, do grupo Controle, para o corno ipsilateral ao corpo lúteo.

Palavras-chave: Ácido linoléico conjugado, ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12*, CLA, criopreservação de embriões, vitrificação, fêmeas F1 Holandês X Zebu, cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

1- INTRODUÇÃO

A pecuária bovina nacional caracteriza-se pela predominância de animais mestiços para a produção de leite, os quais representam aproximadamente 74% do total de vacas ordenhadas (Vilela, 2003). A busca por animais produtivos e bem adaptados ao ambiente tropical faz com que a utilização de fêmeas mestiças F1 (*Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*) torne-se uma alternativa viável para ser explorada nos diversos sistemas de produção. Além disso, a utilização de animais mestiços para a produção de leite pode representar redução do custo de produção, já que são animais rústicos, produtivos, resistentes, longevos e adaptados às limitações prevalentes na maioria dos sistemas de produção que exploram vacas em regime de pastejo (Ruas *et al.*, 2008).

Se por um lado o genótipo F1 Holandês X Zebu é uma alternativa viável para aumentar a produtividade da maioria dos rebanhos leiteiros, por outro, ainda existe um ponto crítico que é a produção de número de fêmeas suficientes para atender às crescentes demandas de aquisição e reposição de plantéis. Assim, torna-se necessária a busca por tecnologias que maximizem a produção de fêmeas. Diversos são os métodos de obtenção de animais de reposição, dentre eles, monta natural, inseminação artificial com sêmen convencional ou sexado, superovulação e transferência de embriões obtidos pelo método tradicional ou por meio de fecundação *in vitro*. Verifica-se que a produção de embriões a partir da fecundação *in vitro* com sêmen sexado é a de maior potencial para a produção de fêmeas de reposição (Borges *et al.*, 2010).

As principais vantagens da produção *in vitro* de embriões (PIV) em relação às demais biotecnias da reprodução assistida, são a alta frequência de coleta de oócitos, otimização do uso da dose de sêmen,

principalmente do sêmen sexado, possibilidade de utilizar a genética de fêmeas pré-pubescentes, gestantes, senis e/ou com patologias adquiridas que inviabilizem a reprodução natural ou inseminação artificial (Viana e Camargo, 2007; Gonçalves *et al.*, 2008).

A produção *in vitro* de embriões bovinos tem sido adotada como alternativa para aumentar o número de animais geneticamente superiores nos rebanhos, maximizando a produtividade e aumentando o número de descendentes em curto espaço de tempo (Viana e Camargo, 2007). A PIV ainda apresenta algumas limitações em relação às taxas de produção de blastocistos, fertilidade do embrião, perdas perinatais e baixo potencial de criopreservação embrionária (Mezzalana e Vieira, 2006; Gonçalves *et al.*, 2008).

O objetivo da criopreservação é manter o embrião por longos períodos em estado de quiescência, possibilitando assim o transporte, a exportação e a importação de raças de interesse zootécnico. A criopreservação de embriões e gametas possibilita ainda a conservação de banco genético de diferentes raças e espécies, a manutenção da viabilidade de embriões excedentes e a utilização do estro natural de receptoras, que apresenta taxas de gestação melhores do que os animais sincronizados, além de diminuir o custo com a sincronização dos animais (Gonçalves *et al.*, 2008).

A vitrificação é a técnica de criopreservação que apresenta melhores resultados em embriões PIV, pois reduz a formação de cristais de gelo que, devido ao formato irregular, podem danificar as membranas das células embrionárias. Para evitar a formação de cristais de gelo, os meios de vitrificação apresentam altas concentrações de crioprotetores, que agem acelerando a desidratação celular. Porém, as altas concentrações de crioprotetores podem

causar danos às células embrionárias devido ao estresse osmótico e à toxicidade química dos mesmos. Para evitar que esses fenômenos ocorram, altas velocidades de resfriamento são utilizadas no processo de vitrificação, reduzindo o tempo de exposição das células embrionárias a temperaturas críticas e aos efeitos tóxicos dos crioprotetores (Dinnyes *et al.*, 2006; Mezzalana e Vieira, 2006; Gonçalves *et al.*, 2008).

Quando comparado com o embrião produzido a fresco, a partir da estimulação hormonal de múltiplas ovulações e produção *in vivo* de embriões, o embrião PIV possui maior quantidade de lipídeos no citoplasma das células embrionárias, possivelmente resultante das condições de cultivo *in vitro*, que utilizam meios contendo altas concentrações de soro fetal bovino (Abe *et al.*, 2002). O alto teor lipídico citoplasmático implica redução na qualidade embrionária e redução da congelabilidade dos mesmos. Acredita-se que a utilização de estratégias para reduzir a produção e a deposição de lipídeos, melhora a qualidade das células embrionárias, aumentando a resistência dos embriões à criopreservação.

Atualmente, o maior obstáculo para disseminação da produção *in vitro* de embriões bovinos é sua baixa criotolerância. Uma estratégia para se obter embriões bovinos produzidos *in vitro* de melhor qualidade e aumentar a sobrevivência dos mesmos pós-descongelamento seria a adição do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) no meio de cultura. O CLA é um ácido graxo poli-insaturado natural que apresenta atividade anti-carcinogênica (Bocca *et al.*, 2010), anti-arterosclerótica, anti-obesidade e inibidora da expressão de genes que codificadores da produção de enzimas que estimulam a síntese de lipídeos nos adipócitos (Mitchell e McLeod, 2008). Acredita-se que a suplementação de meios

de cultivo *in vitro* com este composto promova modificações na membrana do tecido adiposo e altere a expressão de genes relacionados com a adipogênese, diminuindo a deposição de gordura intracelular nos embriões.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a adição do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) no meio de cultivo *in vitro* seria uma estratégia para diminuir a quantidade de gotículas intracelulares de gordura depositadas nos embriões, de modo a melhorar sua congelabilidade pelo processo de vitrificação.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Panorama da produção de leite no Brasil

O efetivo bovino comercial brasileiro é o segundo maior do mundo, com estimativa de 211,4 milhões de cabeças (IBGE, 2013). O Brasil também é o quinto maior produtor mundial de leite, com produção estimada para o ano de 2014 de 33,0 bilhões de litros de leite fluido, a partir de um efetivo que ultrapassa 20,9 milhões de vacas (USDA, 2013). O estado de Minas Gerais se destaca por possuir o maior rebanho bovino leiteiro, além de ser o maior produtor nacional, com 8,9 bilhões de litros/ano, o que totaliza aproximadamente 30% do total da produção do país (IBGE, 2013). A produtividade brasileira esperada para 2014 é de 1.600 kg de leite por vaca. Em comparação aos maiores produtores, a produtividade do rebanho leiteiro nacional é considerada baixa. União Europeia, Estados Unidos e China têm produtividades de 10.067, 6.073 e 8.900 litros de leite fluido por vaca, respectivamente (USDA, 2013).

O aumento do poder aquisitivo nos países emergentes tem aumentado o consumo *per capita* de lácteos e, de modo geral, a produção mundial de leite não tem

conseguido acompanhar esse aumento da demanda, resultando em grandes oscilações de preço do produto no mercado internacional. Neste cenário, os países emergentes estão crescendo rapidamente em produção e produtividade de leite, aproveitando-se do fato de que os produtores dos países desenvolvidos precisam aumentar a margem de lucro para conseguirem crescer de forma mais acelerada (Stock e Zoccal, 2013).

Nos países emergentes, o principal sistema de produção de leite utilizado é o extensivo. Esse modelo apresenta um menor custo de produção quando comparado aos demais (semi-intensivo e intensivo), e pode ser competitivo, desde que os produtores consigam manter margens suficientes para renda mínima e ampliação dos investimentos (Stock e Zoccal, 2013).

O rebanho leiteiro brasileiro é constituído principalmente por animais mestiços, originados do cruzamento de raças europeias e zebuínas, gerando animais bem adaptados ao clima tropical e de maior produtividade. No Brasil, 6% das vacas ordenhadas são puras e especializadas para a produção de leite, 74% são vacas mestiças Holandês X Zebu, com composição genética variável, e 20% são animais zebuínos não-especializados (Vilela, 2003). A utilização de raças leiteiras mestiças pelos sistemas de produção resultaria em aumento da produtividade do rebanho em relação à produção média nacional, representando uma oportunidade para a produção de leite brasileira crescer e atender ao mercado em demanda.

Geralmente, o grande problema dos produtores de leite com gado mestiço é manter o grau de sangue desejado utilizando a monta natural e a inseminação artificial (Goulart *et al.*, 2009). Assim, torna-se necessária a busca por tecnologias que maximizem a obtenção de fêmeas. Diversos são os métodos que podem ser

realizados, verificando-se que a produção de embriões a partir da fecundação *in vitro* com sêmen sexado é a de maior potencial para a produção de fêmeas de reposição (Borges *et al.*, 2010).

2.2- Produção *in vitro* de embriões em gado de leite

A produção *in vitro* de embriões (PIV) surgiu inicialmente como uma alternativa à técnica de superovulação e produção *in vivo* de embriões em momento no qual a demanda do setor privado por embriões cresceu de forma muito acelerada (Viana *et al.*, 2012).

Para que a biotécnica apresentasse utilização comercial, primeiro precisava-se conhecer melhor a fisiologia reprodutiva dos zebuínos criados em clima tropical, padrão racial predominante no Brasil e cuja fisiologia era pouco conhecida, e melhorar os protocolos de punção folicular guiada por ultrassom, a *ovum pick up* (OPU). O uso da ultrassonografia foi responsável por grandes avanços na PIV por permitir a caracterização da dinâmica folicular das diversas raças zebuínas (Viana *et al.*, 2012), além do desenvolvimento de protocolos de sincronização do estro (Baruselli *et al.*, 2007).

A PIV no Brasil começou a ser desenvolvida em gado de leite, especialmente em vacas Holandesas, atingindo um nicho de mercado bastante elitista. Porém esta biotecnologia só cresceu em importância e se tornou comercial quando começou a ser utilizada em gado de corte, com destaque especial para as raças Nelore e Brahman (Viana *et al.*, 2012).

A melhor resposta ou maior adaptação dos zebuínos à técnica de produção *in vitro* de embriões em relação aos taurinos, pode ser explicada pelo fato dos zebuínos apresentarem de três a quatro ondas de crescimento folicular por ciclo, enquanto os taurinos apresentam de duas a três.

Adicionalmente, os zebuínos apresentam uma média de 33,4 folículos recrutados por onda de crescimento contra 25,5 folículos recrutados por taurinos. Além disso, o folículo dominante dos zebuínos apresenta menor persistência e menor diâmetro na divergência, o que resulta em maior número de folículos recuperados por seção de aspiração quando comparado com taurinos. A explicação endócrina para essas diferenças na dinâmica folicular é que os zebuínos apresentam maior concentração do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) circulante e menor concentração do hormônio folículo estimulante (FSH), aumentando a sensibilidade ovariana às gonadotrofinas, o que modifica a taxa de crescimento dos folículos e o número de folículos ovarianos recrutados por onda de crescimento comparando-se com os taurinos (Baruselli *et al.*, 2007).

Atualmente, o Brasil destaca-se mundialmente como o país que produz e transfere o maior número de embriões PIV. A produção embriões PIV em raças zebuínas de corte foi responsável pelo crescimento exponencial da biotécnica no Brasil até 2005. Porém, entre 2006 e 2010, a utilização da PIV em gado de corte apresentou declínio de 24%, enquanto que, no mesmo período, raças zebuínas leiteiras, com destaque especial para a raça Gir, apresentaram crescimento de 764% (Viana *et al.*, 2012).

A utilização do sêmen sexado na PIV foi responsável pelo avanço da utilização desta tecnologia em gado leiteiro, pois o grande número de machos obtidos pela utilização de sêmen convencional na PIV representava um impasse econômico para os sistemas de produção de leite (Viana *et al.*, 2012).

A boa adaptação e aplicabilidade do sêmen sexado na produção *in vitro* de embriões abriu um novo mercado na atividade leiteira: a produção de fêmeas mestiças

Holandês X Zebu (Viana *et al.*, 2012). É interessante destacar que as tecnologias de embriões podem ser usadas em raças leiteiras, não só para a produção de touros e fêmeas doadoras de oócitos, mas também para fornecer novilhas de reposição para fazendas comerciais. A produção de novilhas de reposição gera uma renda extra, em propriedades cuja principal fonte de renda é a venda de leite. Além de produzir animais de alto mérito genético para a produção de leite, a PIV possibilita a produção de animais mestiços F1 HZ, cuja produção por técnicas convencionais de acasalamento ou inseminação artificial é dificultada, pois exige que se mantenha na propriedade um rebanho de, pelo menos, uma raça pura (Borges *et al.*, 2010).

Há uma pressão permanente para o uso de PIV em larga escala para a produção de F1 Holandês X Gir (Pontes *et al.*, 2009), e essa produção vem mostrando resultados promissores. Os cruzamentos de primeira geração resultantes (F1) também podem ser utilizados como doadores de oócitos para produzir outros cruzamentos HZ, como 3/4 e 1/4 (cruzamentos mais utilizados para a produção de 5/8 HZ). O desempenho da fêmea F1 e da 1/4 como doadoras de oócitos em programas de PIV é igual ou maior que o das doadoras da raça Gir, considerando o número de oócitos coletados e embriões produzidos (Pontes *et al.*, 2010). A utilização de biotécnicas da reprodução assistida para produzir animais mestiços especializados para a produção de leite resultou no aparecimento de uma classe de mestiços de “elite”, animais que apresentam uma produção superior a 10.000 kg de leite por lactação, semelhante à da raça Holandesa (Viana *et al.*, 2012).

Considera-se que a PIV ainda tem baixa eficiência, porém a possibilidade de produzir embriões em larga escala viabiliza a adoção comercial da biotécnica. A taxa de recuperação de oócitos por punção folicular é, em média, de 70%, a produção de

embriões varia de 10 a 40%, a taxa de gestação varia de 30 a 40% e as perdas embrionárias e fetais são relativamente altas, o que resulta em eficiência geral de aproximadamente 10% de bezerros nascidos em relação ao total de oócitos aspirados (Viana *et al.*, 2012).

2.3- Utilização do sêmen sexado para fêmea na produção *in vitro* de embriões

A possibilidade de se escolher previamente o sexo da progênie apresenta vantagens econômicas e produtivas para os criadores, pois é possível selecionar o sexo mais adequado para o sistema de produção em questão, além de diminuir o intervalo de gerações (Xu *et al.*, 2009).

A sexagem de gametas por citometria de fluxo possui uma acurácia de 85 a 95% de seleção de espermatozoides X ou Y, enquanto que na reprodução convencional a proporção de cada um dos sexos é de 50%. Em rebanhos leiteiros, as fêmeas são produtivas e os machos geralmente são abatidos, o que representa retorno financeiro para o produtor menor em relação aos animais que efetivamente entram para o sistema de produção. A limitação natural na escolha do sexo custa bilhões de dólares em todo o mundo e reduz significativamente a margem de lucro da agroindústria (Xu *et al.*, 2009).

A PIV viabilizou a utilização de sêmen sexado de touros com alto mérito genético para a produção de fêmeas para rebanhos comerciais de leite. Na inseminação artificial, utiliza-se uma palheta de sêmen, com aproximadamente dois milhões de espermatozoides sexados, para tentar fecundar um oócito. Na produção *in vivo* de embriões, em média, duas doses de sêmen sexado podem ser utilizadas para fecundar de 6 a 10 embriões. Já na PIV, são necessários aproximadamente 1000 espermatozoides para fecundar um oócito, ou seja, dependendo da concentração espermática, é possível inseminar 100 ou

mais oócitos por palheta (Yang *et al.*, 1993).

A utilização do sêmen sexado na fecundação *in vitro* produz, em média, de 20 a 30% de blastocitos, porém essa produção é variável de acordo com o touro, e está relacionada, principalmente, com a proporção de espermatozoides que são eficientemente capacitados pela heparina (Xu *et al.*, 2006). Conforme observado no trabalho de Xu *et al.* (2006), analisando-se o resultado da fecundação oocitária realizada por nove diferentes touros, foram encontradas taxas de produção de blastocistos variando de 0,7% (touro G) a 30% (touro E). Alguns touros e partidas de sêmen sexado apresentam resultado de produção de embriões tão baixo na fecundação *in vitro* que podem inviabilizar a utilização de determinados touros na PIV. A concentração de heparina capaz de promover a capacitação espermática é variável e individual (Lu e Seidel, 2004). A concentração espermática afeta a eficiência da fecundação *in vitro*, tanto com a utilização de sêmen convencional, quanto com sêmen sexado.

Xu *et al.* (2006) encontraram taxas de 31 a 33% de produção de blastocistos quando utilizadas doses que possibilitaram manter proporção maior ou igual 600 espermatozoides por oócito, contra taxas de 11 a 13%, utilizando sêmen de menor concentração espermática.

A taxa de gestação de embriões PIV com sêmen sexado é semelhante à de embriões produzidos com sêmen convencional. Xu *et al.* (2006) encontraram uma taxa de gestação de 41% para embriões de sêmen sexado e 42% para sêmen convencional.

2.4- Criopreservação de embriões produzidos *in vitro*

Após o nascimento do primeiro mamífero proveniente de um embrião previamente congelado (Whittingham, *et al.*, 1972), a

criopreservação de embriões vem ocupando um lugar cada vez mais importante nas tecnologias de reprodução assistida. A aplicação das diversas biotécnicas em programas de reprodução de animais de produção e de conservação de espécies ameaçadas de extinção tem gerado a necessidade de manutenção de bancos de germoplasma para o aproveitamento dos embriões excedentes e conservação de espécies ameaçadas de extinção. Neste contexto, são realizados diversos estudos sobre criopreservação de material genético para o estabelecimento de protocolos eficientes em manter a viabilidade celular. Um protocolo de criopreservação ideal visa atingir temperaturas criogênicas sem danos químicos e sem formação de gelo intracelular (Carvalho *et al.*, 2011).

Dentre os diferentes métodos de criopreservação, a congelação lenta e a vitrificação se destacam. A congelação lenta é o método convencional de criopreservação, no qual utilizam-se baixas concentrações de crioprotetores e a curva de resfriamento e congelação é programável e controlada por equipamento específico para esta finalidade. As desvantagens deste método são o alto custo, devido a necessidade de equipamentos sofisticados e os danos celulares irreversíveis pela cristalização da água intracelular (Carvalho *et al.*, 2011).

Na criopreservação pela técnica de congelamento convencional, o embrião perde água para o meio extracelular que possui maior concentração, ocorrendo assim uma contração osmótica do embrião. Quando os embriões se contraem, as membranas tornam-se flácidas e alguns blastômeros podem perder componentes celulares. Essas alterações, combinadas à fase de transição dos lipídeos, podem causar danos físicos à membrana, tais como a perda da fluidez ou até mesmo ruptura (Wolfe e Bryant, 1999). Durante a reidratação, caso a membrana tenha sido

danificada durante o congelamento, pode ocorrer a liberação do conteúdo das lisozimas para o citoplasma das células embrionárias ou danos aos microtúbulos afetando a mobilidade e o transporte de nutrientes, impedindo o suprimento de substratos necessários para a formação da blastocle no embrião, ou, ainda, a ruptura da membrana plasmática pode liberar lipídeos vitais ao embrião, causando deficiência lipídica (Dobrinisky, 1996).

A vitrificação é um método rápido de criopreservação que reduz os danos à membrana celular, causados pela cristalização da água. O princípio básico da vitrificação é que a velocidade da criopreservação depende da massa e da área da amostra. Elas se relacionam da seguinte forma: quanto menor a massa e maior a área da solução, estrutura, ou tecido a ser criopreservado, maior deverá a velocidade de abaixamento da temperatura para que não ocorra formação de cristais de gelo (Arav, 2014). Existem três pontos críticos que vão determinar se a amostra em questão será vitrificada ou se haverá formação de cristais de gelo: taxa de resfriamento/aquecimento, viscosidade do meio e volume a ser criopreservado.

O ideal é que a taxa de resfriamento/aquecimento seja a maior possível, e para isso, faz-se a imersão direta no nitrogênio líquido (-196°C) ou no nitrogênio líquido super-resfriado (-210°C). Além disso, a taxa de resfriamento depende do recipiente utilizado, do volume, da condutividade térmica e da composição da solução de vitrificação. A utilização de OPS (*Open Pulled Straw*), palhetas de 0,25 mL alongadas, como recipiente para criopreservação, promove um aumento da taxa de resfriamento em duas a seis vezes em relação a utilização das palhetas de 0,25 mL (Vajta *et al.*, 1996).

A viscosidade do meio de criopreservação embrionária está relacionada com a

concentração e o comportamento dos vários crioprotetores e aditivos utilizados neste processo. Quanto maior a concentração dos crioprotetores, maior será a temperatura de transição vítrea, baixando assim a probabilidade de formação de cristais de gelo. Diferentes crioprotetores e aditivos também possuem toxicidade e taxa de penetração intracelular variável. A combinação de diferentes crioprotetores é frequentemente utilizada para aumentar a viscosidade e a temperatura de transição vítrea, reduzindo assim a toxicidade. Quanto menor o volume, maior a probabilidade de vitrificação. Volumes menores possibilitam uma melhor transferência de calor e velocidade de abaixamento de temperatura, possibilitando maiores taxas de resfriamento (Arav, 2014).

Quanto ao recipiente de vitrificação, existem duas categorias: técnicas de superfície e técnicas de tubos. Por meio do uso de métodos de superfície é possível atingir altíssimas velocidades de resfriamento, já que o sistema é aberto e o meio contendo os embriões entra em contato direto com o nitrogênio líquido. Dentre as técnicas de superfície estão: *Minimum drop size* (Arav *et al.*, 1987), Cryotop (Kuwayama *et al.*, 2005), Crioloop (Lane *et al.*, 1999), Crioleaf (Chian *et al.*, 2005), Hemi-palhetas (Vanderzwalmen *et al.*, 2000), Superfície sólida (Dinnyes *et al.*, 2000), Malha de nylon (Matsumoto *et al.*, 2001), Vitrificação por cobertura direta (Chen *et al.*, 2006), Vitrificação em espátula (Tsang *et al.*, 2009), Crio-E (Petyim *et al.*, 2009), lâmina plástica (Sugiyama *et al.*, 2010) e Vitri-Ingá (Almodin *et al.*, 2010). Os métodos de vitrificação em tubos também tem a vantagem de proporcionar altas velocidades de abaixamento da temperatura, geralmente em sistemas fechados, o que diminui a possibilidade de contaminação, além de serem mais fáceis de manusear. São técnicas de tubos: palhetas plásticas (Rall *et al.*, 1985), Open Pulled Straw (Vajta *et al.*,

1998), Closed Pulled Straw (Chen *et al.*, 2001), Sealed Pulled Straw (Yavin *et al.*, 2009), OPS superfina (Isachenko *et al.*, 2003), CrioTip (Kuwayama *et al.*, 2007), Dispositivo de vitrificação de alta segurança (Camus *et al.*, 2006), Criopette (Portmann *et al.*, 2010) e Rapid-i (Larman *et al.*, 2010).

O método de Open Pulled Straw (OPS) é muito utilizado para a vitrificação de embriões, pois o adelgaçamento da parede das palhetas possibilita amplificar significativamente a velocidade de abaixamento da temperatura, diminuindo a probabilidade de formação de cristais de gelo e possibilitando menor tempo de contato do embrião com as altas concentrações de crioprotetor. Nesta técnica, trabalha-se também com volume reduzido de meio, o que viabiliza a diminuição da concentração dos crioprotetores, reduzindo os danos ao embrião durante a criopreservação e o aquecimento. Este método apresenta risco reduzido de fratura da zona pelúcida durante a criopreservação ou aquecimento, que é comum em outras técnicas (Vajta *et al.*, 1998).

Os embriões PIV apresentam baixa taxa de sobrevivência após o descongelamento, e a explicação para isso é o alto teor lipídico no citoplasma, que determina sua baixa resistência ao resfriamento (Pereira *et al.*, 2007). Além disso, quando comparados aos embriões produzidos *in vivo*, os embriões PIV apresentam menores taxas de compactação em estágio de mórula, contêm mais vacúolos e complexos juncionais mais curtos (Dinnyes *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008).

Tanto em embriões quanto em oócitos, à medida que estádios de desenvolvimento mais avançados são alcançados, melhor o resultado do congelamento, porém sabe-se que a fertilidade de ambos em estádios mais tardios não é satisfatória. Diante dessas

características, a vitrificação parece ser o método que proporciona resultados mais consistentes, uma vez que as altas velocidades de resfriamento reduzem o tempo de exposição de embriões e oócitos às temperaturas críticas (Dinnyes *et al.*, 2006; Mezzalira e Vieira, 2006; Gonçalves *et al.*, 2008).

2.5- Fatores que influenciam a sobrevivência embrionária pós criopreservação/aquecimento

A capacidade de sobrevivência embrionária é um evento multifatorial. Dentre outros, os fatores envolvidos são: conteúdo lipídico, composição lipídica, metabolismo embrionário, apoptose celular e padrão de expressão gênica em geral (Sudano *et al.*, 2013).

Acredita-se que o elevado número de gotículas lipídicas no citoplasma dos embriões produzidos *in vitro* esteja relacionado com a presença e a concentração do SFB nos meios de cultivo. Especula-se que o SFB aumenta o teor lipídico embrionário a partir de três mecanismos: a) absorção de lipoproteínas do soro pelas células embrionárias; b) indução da neossíntese embrionária de triglicerídeos; c) modificação do funcionamento da β -oxidação nas mitocôndrias (Abe *et al.*, 2002).

Nos meios de cultivo *in vitro*, o soro fetal bovino contribui com fatores de crescimento, hormônios, nutrientes, componentes antioxidantes e possibilita aumento das taxas de blastocistos em comparação com embriões cultivados no meio livre de soro (Holm *et al.*, 1999). O papel do soro no desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda é indefinido. A presença de soro no meio de cultivo acelera o desenvolvimento de mórulas e blastocistos em comparação com os produzidos na sua ausência (Abe e Hoshi, 2003).

O objetivo da produção *in vitro* de embriões é reproduzir as condições da tuba uterina para se produzir um embrião de boa qualidade e que possa sobreviver à criopreservação. Existem, basicamente, duas maneiras de melhorar a sobrevivência embrionária após a criopreservação: modificações na técnica de criopreservação, ou, produção dos embriões que possuam qualidade para ser criopreservados (Sudano *et al.*, 2011). As possíveis alterações na técnica de criopreservação envolvem: a concentração e o tipo de crioprotetor, o tempo e a temperatura do protocolo, a adição de açúcares e surfactantes aos meios (Seidel, 2006).

Uma alternativa para incrementar a criopreservação é melhorar a qualidade das células embrionárias, utilizando-se meios de cultivo com baixa concentração de soro fetal bovino ou livre de soro, ou ainda, estratégias que reduzam o teor lipídico embrionário. Esta abordagem pode ser feita adicionando substâncias que reduzam o teor lipídico citoplasmático a partir de: remoção ou polarização das gotículas lipídicas por centrifugação; aumento da pressão hidrostática para estimular a expressão de proteínas relacionadas com o estresse oxidativo; enriquecimento dos meios de cultivo com aditivos que aumentam a produção de antioxidantes (Dinnyes *et al.*, 2006; Mezzalira e Vieira, 2006). O estímulo da expressão de proteínas relacionadas com o estresse oxidativo e a adição de antioxidantes aos meios de cultivo justifica-se porque os metabólitos gerados pela oxidação lipídica podem lesionar as células embrionárias, diminuindo a sobrevivência pós-descongelamento dos embriões.

Adicionalmente, pode-se modular a fluidez da membrana celular embrionária a partir da suplementação do meio de cultivo com colesterol ou ácidos graxos insaturados (Sudano *et al.*, 2013). Existe ainda a estratégia de fornecer às fêmeas doadoras de oócitos dietas ricas em ácidos graxos

poli-insaturados, com o objetivo de melhorar a sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* pós-criopreservação (Leroy *et al.*, 2013).

Visando melhorar a qualidade das células do embrião produzido *in vitro* existem substâncias que, adicionadas aos meios de cultivo, reduzem a síntese de ácidos graxos. Sudano *et al.* (2011) testaram a adição de Ethosulfado de Fenazina (PES), associado com a diminuição da concentração de SFB, objetivando a redução de lipídeos no citoplasma dos blastômeros. A adição de PES no período pós-compactação embrionária pode induzir a um maior balanço na utilização da glicose por estimularem a via pentose-fosfato e, conseqüentemente, aumentar a produção e a qualidade dos embriões bovinos PIV (De La Torre-Sanchez *et al.*, 2006). A redução da concentração de SFB de 10% para 2,5%, associada à adição de PES no dia quatro de cultivo, diminuiu o conteúdo lipídico do citoplasma e melhorou a sobrevivência do embrião após a vitrificação (Sudano *et al.*, 2011).

Outro composto químico utilizado para reduzir o conteúdo lipídico é a foscolina, que é responsável pela ativação da atividade da enzima lipase por meio do aumento do cAMP, promovendo uma delipidação química. Este composto aumentou a sobrevivência embrionária *in vitro* e *in vivo* dos embriões cultivados na sua presença (Sanchez *et al.*, 2013).

2.6- O ácido linoléico conjugado *trans*-10, *cis*-12 (CLA)

Nas células, os lipídeos são importantes como fontes de nutrientes, na regulação das propriedades físicas e funcionais das membranas biológicas, na interação entre células, na proliferação celular e no transporte de substâncias através das membranas (Sata *et al.*, 1999). Após serem incorporados às células, os lipídeos podem ser oxidados para gerar energia,

armazenados como triacilgliceróis ou utilizados para a síntese de membrana (Schmitz e Ecker, 2008).

Os lipídeos são essenciais para a compor as membranas biológicas, influenciando a fluidez das mesmas. Os ácidos graxos poli-insaturados possuem cadeias acil extremamente flexíveis e são capazes de modificar rapidamente seu estado conformacional, portanto, quanto maior o conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, maior será a fluidez da membrana (Lombardo e Chicco, 2006).

Os ácidos graxos poli-insaturados são divididos em dois grupos, ômega 3 e ômega 6, de acordo com a posição da última dupla ligação em relação a localização do radical metil da molécula. Tanto o ômega 3 quanto o ômega 6 são ácidos graxos essenciais, não são produzidos pelo organismo, e têm como funções modular os microdomínios das membranas biológicas, regular a sinalização de receptores e a expressão de gênica. Os ômega 6, particularmente, são importantes na formação das membranas celulares, no bom funcionamento do sistema imunológico e no processo inflamatório. Lipídeos como o ácido linoléico e o ácido linoléico conjugado são ácidos graxos do tipo ômega 6 bioativos, ou seja, apresentam mais funções além da contribuição nutricional e energética para as células biológicas (Schmitz e Ecker, 2008).

O termo ácido linoléico conjugado (CLA) refere-se a uma classe de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico, existem mais de vinte isômeros do ácido linoléico conjugado e todos eles são chamados de CLAs. O ácido linoléico é um ácido graxo de dezoito carbonos com duas insaturações, convertido em CLA pela ação dos microrganismos ruminais, que deslocam as ligações duplas de forma a alterná-las com ligações simples, daí o termo conjugado. Essas ligações duplas podem estar localizadas em diferentes

posições ao longo da cadeia de dezoito carbonos, e ambas podem adotar as formas *cis* ou *trans*. A posição da dupla ligação e seu tipo de isomeria geométrica determinam o papel do composto no metabolismo. Formas naturais de CLA podem ser encontradas em produtos lácteos e em carnes de ruminantes, e a produção artificial pode ser realizada através da isomerização alcalina do ácido linoléico ou da isomerização do óleo de cártamo. Embora existam dezenas de isômeros do ácido linoléico, os mais estudados são o *cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12, sendo o primeiro encontrado em maior quantidade na dieta humana (Kepler *et al.*, 1966). A conformação das moléculas de ácido linoléico, ácido linoléico conjugado *cis*-9, *trans*-11 e ácido linoléico conjugado *trans*-10, *cis*-12 estão representadas na Figura 1.

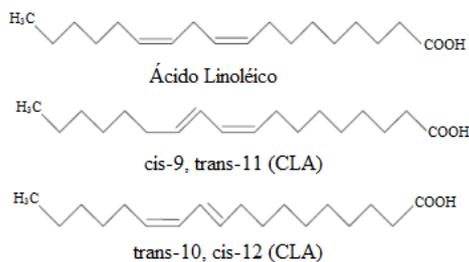


Figura 1: Estrutura das moléculas de ácido linoléico, ácido linoléico conjugado *cis*-9, *trans*-11 (*cis*-9, *trans*-11 (CLA)) e ácido linoléico conjugado *trans*-10, *cis*-12 (*trans*-10, *cis*-12 (CLA)). Fonte: Adaptado de Martin e Valeille, 2002.

Os ácidos linoléicos conjugados, com destaque especial para os isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12, são componentes alimentares e tem sido amplamente estudados, estimulados por estudos pioneiros que observaram efeitos de diminuição da massa gordurosa e aumento da massa magra corporal em murinos (Park

et al., 1999) e redução do acúmulo lipídico durante a diferenciação de adipócitos (Evans *et al.*, 2001). Evans *et al.* (2001) encontraram que o isômero *trans*-10, *cis*-12 reduziu o acúmulo de triglicerídeos em cultura de células de préadipócitos em murinos enquanto que o isômero *cis*-9, *trans*-11 estimulou o aumento da deposição de triglicerídeos dentro dos adipócitos.

Embora não se conheça exatamente como o CLA atua na redução da deposição lipídica citoplasmática, existem possíveis explicações: indução do aumento do consumo de energia celular (West *et al.*, 2000), inibição da neossíntese de lipídeos (Baumgard *et al.*, 2000), indução do aumento da oxidação de ácidos graxos (Evans *et al.*, 2002), indução da lipólise (West *et al.*, 1998), atuação específica nos adipócitos, diminuindo o tamanho, promovendo a diferenciação e induzindo a apoptose dessas células (Evans *et al.*, 2000).

Marinho (2010) demonstrou que um dos mecanismos pelos quais o isômero *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoléico exerce o efeito de diminuir a síntese de ácidos graxos é através da diminuição da expressão de RNAm de enzimas responsáveis pela biossíntese de lipídeos.

A adição do CLA em meios nos meios de cultivo embrionário pode apresentar efeitos positivos na criopreservação de embriões bovinos, estes efeitos podem ser resultado de um aumento na conversão de ácidos graxos insaturados na membrana antes do congelamento, resultando em aumento da fluidez da membrana, melhorando assim a sobrevivência do embrião pós-descongelamento (Hochi *et al.*, 1999). O CLA pode melhorar a taxa de sobrevivência de blastocistos por reduzir o acúmulo intracitoplasmático de lipídeos, principalmente triacilgliceróis, durante o cultivo *in vitro* em presença de soro fetal bovino, aumentando a criotolerância dos

mesmos (Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Rahme, 2012). Além disso, sugere-se que especificamente o CLA *trans-10, cis-12* melhora a sobrevivência do embrião criopreservado por apresentar efeito de inibição de genes que codificam a produção de enzimas envolvidas na síntese de lipídeos (Peterson *et al.*, 2003) além de interferir na atividade da lipoproteína lipase (Park *et al.*, 1999).

Pereira *et al.* (2008) e Rahme (2012) demonstraram que a adição do CLA no meio de cultivo melhora as taxas de eclosão e reexpansão pós-descongelamento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, sem afetar a taxa de clivagem, a qualidade e o desenvolvimento do embrião no estágio de blastocisto, possivelmente em decorrência da redução do acúmulo citoplasmático de lipídeos promovida por esse composto.

2.7- Transferência de embrião vitrificado/aquecido

A ocorrência de gestações após a transferência do embrião produzido *in vitro* é a melhor forma de se avaliar a eficiência das técnicas de produção e criopreservação embrionárias. São vários os fatores que podem interferir na produção ou não de prenhez, e esses fatores estão ligados principalmente aos animais (fêmeas doadoras e receptoras dos embriões) e às técnicas de produção de embrião, sincronização do estro e transferência embrionária.

O escore de condição corporal (ECC) do animal submetido à transferência embrionária influencia diretamente na taxa de gestação. Al-Katanami *et al.* (2002) demonstraram que vacas Holandesas de alta produção com ECC menor ou igual a 2,5 foram mais eficientes em gestar embriões PIV vitrificados/aquecidos quando comparadas às vacas com escore acima desse valor, sendo que as taxas de gestação obtidas foram de $10,7\% \pm 7,5$ e $3,9\% \pm 6,5$, respectivamente. Em relação ao nível de

produção e condição metabólica, as receptoras em estresse térmico, submetidas a três métodos de reprodução assistida (inseminação artificial em tempo fixo, transferência de embriões PIV frescos ou vitrificados), apresentaram taxas de gestação de $6,2 \pm 3,2\%$; $19,0 \pm 5,0\%$ e $6,2 \pm 4,1\%$, respectivamente.

Quanto à biotécnica utilizada para a produção de embriões, a taxa de gestação resultante da transferência de embriões PIV é frequentemente inferior à de embriões produzidos *in vivo* (Hasler, 2003).

Um método que pode ser útil para aumentar as taxas de gestação de receptoras é a transferência de dois embriões PIV para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Isto aumenta a probabilidade de gestação em relação às receptoras que recebem apenas um embrião. Além disso, a presença de dois embriões no corno uterino ipsilateral implica maiores quantidades de interferon-tau e outras moléculas de sinalização embrionárias no útero, necessárias para prevenir a luteólise e manter a gestação (Franco *et al.*, 2006). Já foram relatadas transferências de dois embriões com o intuito de aumentar os sinais trofoblásticos e as taxas de gestação (Heyman *et al.*, 1987). Ambos os embriões são transferidos para o corno ipsilateral ao corpo lúteo, devido ao fato do sinal antiluteolítico em bovinos ocorrer localmente (Del Campo *et al.*, 1977, 1983).

3- MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fecundação *in vitro* de Embriões do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, em Belo Horizonte, durante o período de outubro de 2012 a abril de 2014. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade

Federal de Minas Gerais (Protocolo nº 134/2012).

Todos os reagentes utilizados nesse experimento foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), exceto quando explícito.

Todos os meios utilizados no trabalho de pesquisa foram produzidos e cedidos pela empresa Cenatte Embriões (Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil).

Para a obtenção de oócitos, foram utilizados ovários provenientes de fêmeas da raça Nelore, coletados no matadouro-frigorífico Santa Vitória, localizado no município de Contagem/MG. Os oócitos recuperados foram fecundados com sêmen de touro da raça Holandesa sexado para fêmea, previamente avaliado quanto à fertilidade em sistemas de produção *in vitro*. Foi utilizado apenas um touro e uma partida de sêmen durante todo o experimento.

Após a classificação e seleção, os COCs foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais e em seguida foram submetidos à maturação *in vitro*. Os meios de maturação e fecundação apresentavam a

mesma composição, não diferiam entre os grupos experimentais, somente os meios de cultivo apresentavam diferença de composição entre os tratamentos. Os COCs eram divididos desde a maturação somente para evitar o estresse de reorganização dos possíveis zigotos no momento do cultivo. No D2 foi avaliada a taxa de clivagem. No D7 foi avaliada a produção de blastocistos de cada tratamento e, todos os embriões produzidos foram vitrificados e armazenados em nitrogênio líquido à -196°C, por no mínimo duas semanas, de acordo com cada tratamento. Após a vitrificação, 45 blastocistos (quinze blastocistos de cada grupo experimental) foram fixados para posterior quantificação do conteúdo lipídico por coloração com *Sudan Black B* (Sudano, 2012), 74 blastocistos (28 controle, 29 SFB+CLA e 17 CLA) foram aquecidos e cultivados para avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro* observando-se a reexpansão e eclosão dos embriões e 71 blastocistos (23 controle, 20 SFB+CLA e 28 CLA) foram transferidos para avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro* por meio da taxa de gestação, conforme demonstrado na Figura 2.

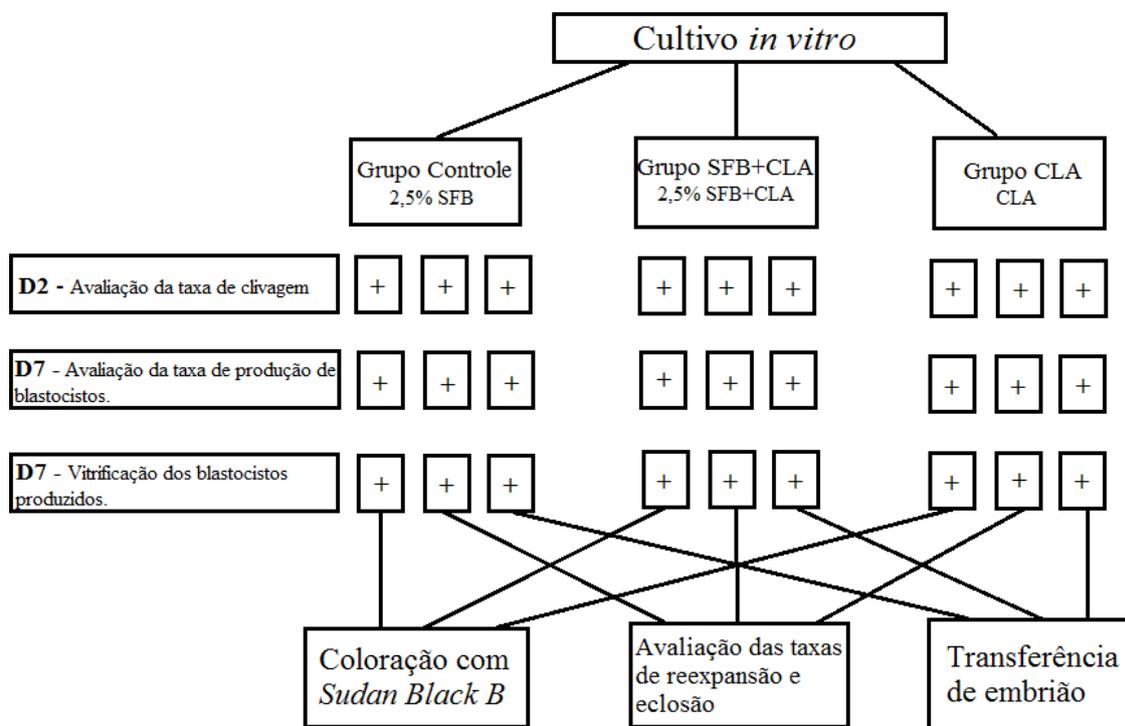


Figura 2: Cronograma das atividades laboratoriais após o cultivo embrionário *in vitro*.

3.1- Produção *in vitro* de embriões

3.1.1- Obtenção de complexos cummulus-oophorus (COCs)

Os ovários coletados em abatedouro foram transportados para o laboratório, imediatamente após o fim da coleta, em solução fisiológica (0,9% NaCl) aquecida a 35°C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução fisiológica, e folículos de 2 a 8 mm foram aspirados com auxílio de agulhas (40 x 12 mm) acopladas a seringas de 5 mL. O líquido folicular aspirado foi depositado em tubos tipo Falcon de 15 mL (TPP, Suíça), mantidos em banho-maria à temperatura de 35°C, onde permaneceram por aproximadamente 10 minutos para sedimentação do conteúdo celular (Gonçalves *et al.*, 2008). O *pellet* foi colocado em placa de Petri descartável de 90 x 15 mm (TPP, Suíça) contendo meio de

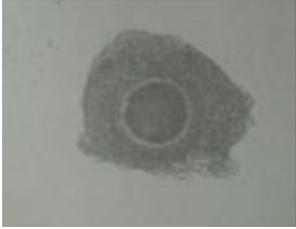
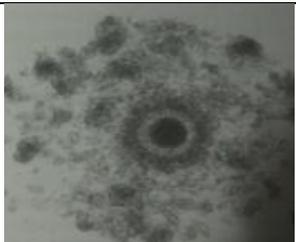
lavagem. Os complexos *cummulus-oophorus* (COCs) foram rastreados e selecionados com o auxílio de estereomicroscópio (Gonçalves *et al.*, 2008).

3.1.2- Maturação *in vitro* (MIV) dos complexos cummulus-oophorus (COCs)

Os COCs foram classificados em relação à qualidade do citoplasma e número de camadas de células do COCs (Tabela 1) com auxílio de estereomicroscópio (Gonçalves *et al.*, 2008; Constantinescu e Schatten, 2007). Os COCs de graus I e II selecionados, foram aleatoriamente divididos em três grupos e em seguida submetidos à maturação *in vitro* por 24 horas, em gotas de 70 µL de meio de maturação, cobertas por óleo mineral, em placas de Petri de 60 x 16 mm (TPP, Suíça),

em estufa incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade.

Tabela 1- Classificação de oócitos segundo as características dos complexos cummulus-oophorus (COCs) e do citoplasma do oócito.

	Classificação	Características
	Grau 1	<i>COCs</i> compacto, contendo mais de três camadas de células e citoplasma do oócito homogêneo.
	Grau 2	<i>COCs</i> compacto, parcialmente presente ao redor do oócito, com menos de três camadas celulares. O citoplasma do oócito possui granulações distribuídas de modo heterogêneo.
	Grau 3	<i>COCs</i> presente, mas expandido. O citoplasma apresenta-se contraído, degenerado, fragmentado ou apresentando vacúolos.
	Desnudos	O citoplasma possui granulações homogêneas, mas as células dos <i>COCs</i> estão ausentes.

Fonte: Adaptado de Constantinescu e Schatten, 2007.

3.1.3- Fecundação *in vitro* dos oócitos (FIV)

Após 24 horas de maturação, os COCs foram lavados e transferidos para placa de Petri 60 x 16 mm (TPP, Suíça) contendo gotas de 70µL de meio de fecundação, previamente estabilizada em incubadora a

38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade. A seleção de espermatozoides viáveis para a FIV foi realizada utilizando-se o método do gradiente descontínuo de Percoll, na qual era constituído de duas colunas: 250 µL de Percoll 90% e 250 µL de Percoll 45%. O

sêmen de touro da raça Holandesa sexado para fêmea foi descongelado em banho-maria a 35°C e depositado cuidadosamente na superfície do gradiente. O *pellet* resultante da centrifugação do Percoll foi lavado em meio de capacitação e a concentração foi ajustada para $0,3 \times 10^6$ espermatozoides/mL (Xu *et al.*, 2006). Em seguida os COCs foram inseminados e incubados nas mesmas condições da MIV, por um período de 18 a 22 horas, sendo o dia da fecundação considerado o D0.

3.1.4- Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV)

Após a FIV, os zigotos foram debridados das células do COCs, utilizando-se

micropipeta automática e, posteriormente, estes foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV), em três tratamentos (Tabela 2):

- Tratamento 1= meio *Synthetic Oviduct Fluid Medium* (SOF) com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) e 2,5% de Soro Fetal Bovino (SFB; grupo controle) ($n=340$);

- Tratamento 2= meio SOF suplementado com 0,5% de BSA, 2,5% de SFB e 100µM de ácido linoléico conjugado (CLA) ($n=359$);

- Tratamento 3= meio SOF contendo 0,5% de BSA, 100µM de CLA e sem SFB ($n=339$);

Tabela 2: Grupos experimentais para cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

Tratamento	2,5% Soro Fetal Bovino (SFB)	100 µM Ácido linoléico conjugado <i>trans-10, cis-12</i> (CLA)
T1 – Controle	+	-
T2 - SFB + CLA	+	+
T3 – CLA	-	+

Tratamento 1 (T1); Tratamento 2 (T2); Tratamento 3 (T3); Soro fetal bovino (SFB); Ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA).

Os embriões foram cultivados *in vitro* por sete dias, em ambiente de incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 95% de umidade. Na tentativa de reproduzir o microambiente da tuba uterina, foram utilizados sacos plásticos descartáveis insuflados com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 95% de N₂. Após 24 horas (D2) do início do cultivo, a taxa de clivagem foi avaliada. No D7 foi observada a taxa de produção de blastocistos em relação aos embriões clivados.

3.2- Vitrificação dos embriões

Os blastocistos de sete dias, de acordo com os respectivos tratamentos, foram classificados como de grau I e II segundo a *International Embryo Transfer Society* (IETS; Bó e Mapletoft, 2013), e apenas os embriões de grau I foram submetidos à vitrificação. A classificação quanto a qualidade dos embriões D7 está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Classificação dos blastocistos de sete dias de desenvolvimento *in vitro*, de acordo com a *International Embryo Transfer Society*.

Estágio	Qualidade	Características
Blastocisto	Grau I	Excelente ou bom. Os embriões tem massa simétrica e esférica com blastômeros uniformes quanto ao tamanho, cor e densidade. O embrião é consistente com o estado de desenvolvimento esperado. As irregularidades devem ser mínimas e, no mínimo 85% das células devem estar contidas em uma massa embrionária viável e intacta (porcentagem de células embrionárias extrusas no espaço perivitelínico). A zona pelúcida deve ser macia e não possuir superfície côncava ou achatada. Que possa levar o embrião aderir na placa ou na palheta. Grau I sobrevive bem após congelação/descongelação e são comumente denominados “embriões congeláveis”.
Blastocisto	Grau II	Razoável. Estes embriões apresentam irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária, no tamanho, na cor ou na densidade de células individuais. Pelo menos 50% da massa embrionária deve estar intacta. A sobrevivência desses embriões ao processo de congelamento/descongelamento é menor do que dos embriões de grau I, mas se os embriões são transferidos à fresco, em receptoras selecionadas adequadamente, apresentam taxas de gestação adequadas. Portanto, esses embriões são frequentemente chamados de "transferíveis", mas não "congeláveis".

Fonte: Adaptado de Bó e Mapletoft, 2013.

Os embriões selecionados para vitrificação foram então lavados em solução DPBS acrescida de 5% de SFB (Holding Medium - HM) e, então, desidratados por um minuto em solução (SV1) de 10% de etilenoglicol e 10% de DMSO em HM. Posteriormente os embriões foram desidratados novamente em uma segunda solução (SV2) contendo 20%

de etilenoglicol e 20% de DMSO por 20 segundos e envasados em *Open Pulled Straw* (OPS) comerciais, que são palhetas de 0,25 mL alongadas (Vajta *et al.*, 1996). A sequência de procedimentos do protocolo de vitrificação utilizado está representada na Figura 3.

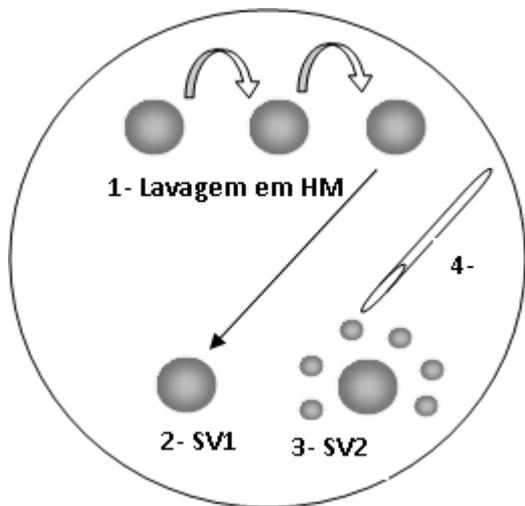


Figura 3: Esquema com a seqüência de procedimentos para a vitrificação embrionária em *Open Pulled Straw* (OPS). SV1: solução de vitrificação 1 (10% de etilenoglicol e 10% de DMSO). SV2: solução de vitrificação 2 (20% de etilenoglicol e 20% de DMSO).

Os embriões vitrificados foram separados segundo estágio de desenvolvimento e tratamento para posteriormente, serem aquecidos e observados individualmente segundo seu desenvolvimento *in vitro* ou, então, para serem transferidos para receptoras com o estro sincronizado.

Os embriões foram estocados em nitrogênio líquido (-196°C) por no mínimo duas semanas. De cada tratamento e sessão de produção embrionária, alguns dos blastocistos produzidos foram descongelados para avaliação das taxas de reexpansão e eclosão, como grupo controle daqueles que foram transferidos para as receptoras.

3.2.1- Aquecimento dos embriões

Os embriões foram aquecidos por passagem em solução de sacarose 0,3M em HM (SR1) por cinco minutos e posteriormente, por mais cinco minutos em solução de sacarose 0,15M em HM (SR2), sendo finalmente lavados por três vezes em HM

(Vajta *et al.*, 1996). A sequência de procedimentos do protocolo de aquecimento está representada na Figura 4.

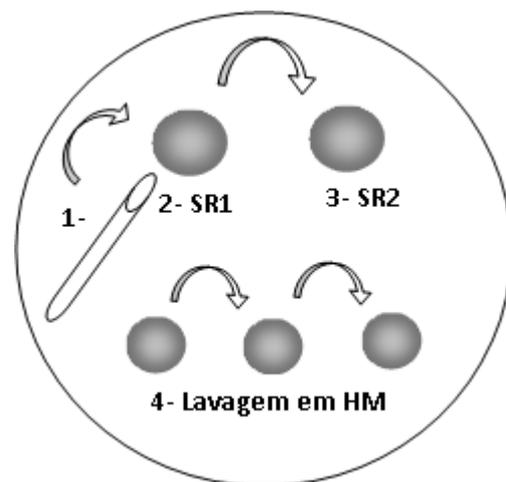


Figura 4: Esquema da seqüência de procedimentos para o aquecimento de embriões vitrificados em *Open Pulled Straw* (OPS). SR1: solução de reidratação 1 (0,3M sacarose). SR2: solução de reidratação 2 (0,15M sacarose).

3.3- Análise do conteúdo lipídico das células embrionárias

3.3.1- Coloração das amostras

O protocolo de coloração utilizado foi descrito por Sudano (2012). Quinze blastocistos de cada tratamento, vitrificados e posteriormente aquecidos, foram aleatoriamente escolhidos para coloração, para serem fixados em 500µL de solução de 10 % de formaldeído em salina *Dulbecco's Phosphate-Buffered* (DPBS). As amostras foram estocadas em geladeira por duas semanas. Após esse período, os blastocistos foram lavados em água destilada com 0,05% de polivinilpirrolidona (PVA) e posteriormente, transferidos para uma gota de etanol 50% em água. Após dois minutos, os embriões foram corados em quatro gotas

de *Sudan Black B* 1% (p/v) em solução de etanol 70% por um a dois minutos (Merck Ag Darmstadt, Germany). Posteriormente, os embriões foram lavados três vezes em etanol 50%, permanecendo cinco minutos em cada uma das três lavagens, e logo em seguida foram colocados novamente em solução 0,05% de PVA em água destilada onde também permaneceram por cinco minutos. Em seguida as lâminas foram montadas com gotas de 10 µL de glicerol para colocar os embriões e, então, as gotas foram cobertas com lamínulas, para finalmente serem observadas em microscópio de luz com aumento de 600 vezes.

3.3.2- Quantificação de lipídeos

As gotículas lipídicas foram visualizadas em microscópio óptico utilizando-se objetiva de 40X. Visando a estimativa da quantidade de gotas de lipídeos os embriões foram fotografados por uma câmera *Olympus* acoplada ao microscópio, e as imagens foram analisadas com o auxílio do software *IMAGE J* 1.41 para a contagem da área ocupada pelas gotas lipídicas coradas (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Foi estabelecido um limiar padrão de marcação das gotas lipídicas, e o mesmo limiar foi utilizado na análise de todas as fotografias. A comparação foi feita a partir da demarcação da área ocupada pelas gotículas lipídicas, dada em pixels, como demonstrado na Figura 5.

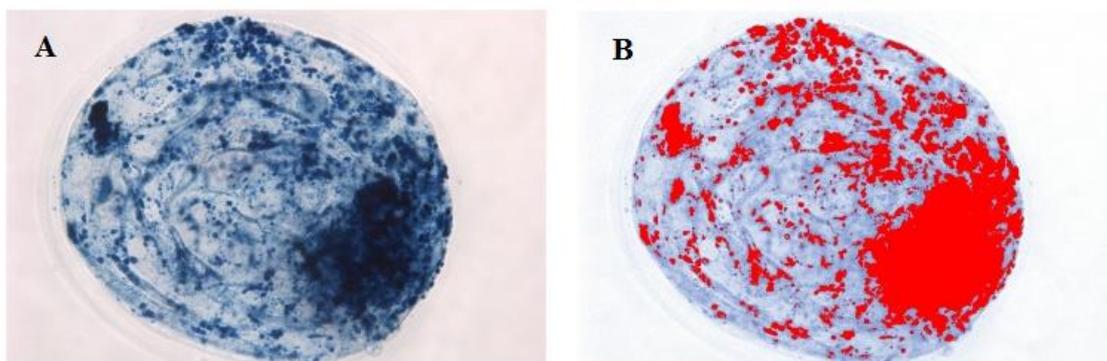


Figura 5: Quantificação lipídica de embriões bovinos por coloração com *Sudan Black B*. Imagem obtida por microscópio óptico com objetiva de 40X. (A) Embrião corado por *Sudan Black B*. (B) Conversão color-threshold para quantificação da área ocupada pelas gotículas lipídicas através do software *Image J*.

3.4- Avaliação da reexpansão e eclosão dos embriões pós aquecimento

Após o aquecimento, os embriões foram lavados em meio SOF contendo SFB (meio controle) e colocados em cultivo em gotas individuais, por 72 horas, em estufa incubadora à 38,5°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade. As taxas de reexpansão e

eclosão foram avaliadas 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo.

3.5- Avaliação sobrevivência embrionária pós transferência

Foram selecionadas para a inovulação novilhas mestiças ½ HZ, com escore de condição corporal maior ou igual a 3

(escala de 1 a 5), peso corporal maior que 300 kg e consideradas saudáveis e em condições de se tornarem gestantes por meio de exame clínico-ginecológico. Os animais foram disponibilizados pela Empresa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e as transferências foram realizadas na fazenda experimental da EPAMIG em Felixlândia/MG.

O estro das receptoras foi sincronizado usando protocolo com dispositivo intravaginal de progesterona (1,9g), associado à benzoato de estradiol (2,0mg) e cipionato de estradiol (1mg), gonadotrofina coriônica equina (250UI) e análogo da prostaglandina F2 α (0,05mg de cloprostenol sódico), conforme representado na Figura 6.

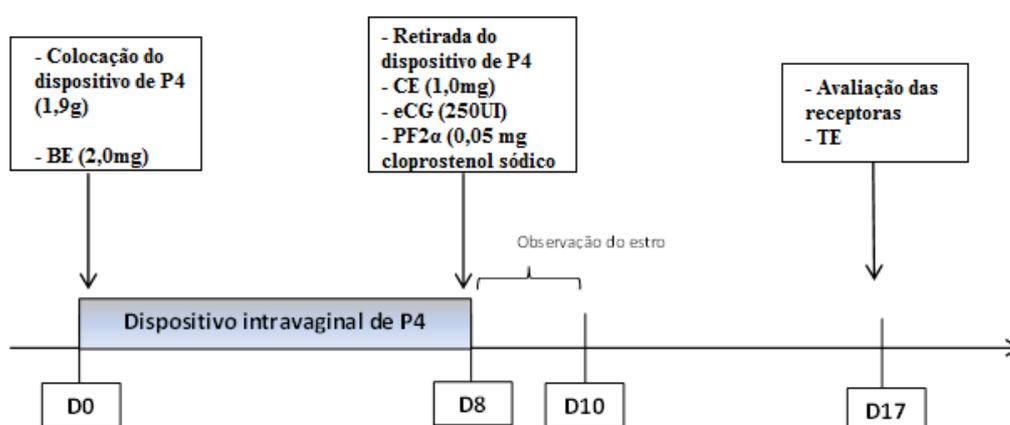


Figura 6: Protocolo de sincronização do estro para as receptoras de embriões produzidos *in vitro*.

As receptoras foram avaliadas com auxílio de ultrassonografia no dia sete após o estro induzido, para a confirmação da presença e localização (ovário direito ou esquerdo) do corpo lúteo.

No dia sete após o estro induzido as receptoras foram avaliadas com auxílio de ultrassonografia para a confirmação da presença do corpo lúteo. 58% dos animais sincronizados respondeu de forma exacerbada ao protocolo de indução de estro, apresentando múltiplas ovulações (de 2 a 7 corpos lúteos) e crescimento polifolicular (folículos de 1 a 1,9cm e folículos maiores que 2,0cm). Foi realizada a transferência de embrião apenas para os

animais que apresentavam corpo lúteo e folículos menores que 1,9cm.

Os blastocistos foram aquecidos pela mesma metodologia citada anteriormente (Vajta *et al.*, 1996), reenvasados e inovulados no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Foram transferidos 71 embriões, sendo 23 provenientes do grupo controle (SFB sem CLA), 20 do grupo SFB + CLA e 28 do grupo CLA (CLA sem SFB).

Também foram feitas transferências de apenas um ou dois embriões para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Os grupos experimentais estão citados abaixo:

- Tratamento 1= receptoras que receberam apenas um blastocisto, no corno ipsilateral ao corpo lúteo ($n=17$, sendo Controle=5, SFB + CLA=6 e CLA=6);

- Tratamento 2= receptoras que receberam dois blastocistos, no corno ipsilateral ao corpo lúteo ($n=27$, sendo Controle=9, SFB + CLA=7 e CLA=11);

O diagnóstico de gestação, por palpação retal e ultrassonografia (Mindray ScanVet 2200; transdutor linear 7.5MHz), foi realizado de 25 a 30 dias após a transferência embrionária. Foram avaliadas as possíveis taxas de gestação simples e gemelares segundo cada tratamento.

3.6- Análises Estatísticas

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado. Os resultados de taxas de clivagem, de produção de blastocistos e de gestação, segundo rotina laboratorial, foram considerados como unidades de observação. Os dados foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Cochran e Bartlett para verificação de normalidade e homocedasticidade respectivamente, antes de serem submetidos à análise de variância, utilizando-se o nível de significância de 5%.

Após a avaliação da normalidade e homogeneidade dos dados, foram aplicados os testes estatísticos para comparação dos resultados entre os tratamentos. O programa de estatística utilizado foi o *GraphPad InStat*.

Para os resultados de embriões clivados, produção de embrião em relação ao total de

embriões clivados e produção de embriões em relação ao total de oócitos inseminados foi utilizado o teste de Tukey com significância $p < 0,05$.

Para avaliação da viabilidade embrionária *in vitro*, a reexpansão e eclosão, foi realizada análise contigência pelos testes Exato de Fisher ou Qui-quadrado, de acordo com o tamanho dos grupos amostrais (T1 vs T2/ T1 vs T3/ T2 vs T3).

Os resultados da análise lipídica foram analisados pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para verificar se houve diferença entre a área ocupada pelas gotículas lipídicas coradas pelo *Sudan Black B* entre os grupos experimentais.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Produção *in vitro* de embriões

As taxas de clivagem dos oócitos inseminados, de produção de blastocistos em relação ao número de embriões clivados e de produção de blastocistos em relação ao total de oócitos inseminados, de acordo com cada grupo experimental estão apresentadas na Tabela 4.

Conforme demonstrado na Tabela 4, a presença ou ausência do soro fetal bovino e/ou do ácido linoléico conjugado trans-10, cis-12 (CLA) no meio de cultivo de embriões não interferiu na clivagem embrionária. O mesmo ocorreu com a taxa de produção de blastocistos avaliada no sétimo dia de cultivo embrionário (D7) que não diferiu entre os grupos experimentais.

Tabela 4: Taxa de clivagem embrionária, taxa de produção de blastocistos em relação ao número de embriões clivados e taxa de produção de blastocistos em relação ao total de oócitos inseminados, de acordo com cada grupo experimental.

Tratamento	Número de oócitos inseminados	Taxa de clivagem n (%)	Taxa produção embrião/clivados n (%)	Taxa produção embrião/total n(%)
Controle	340	211 (62,1%)	126 (59,7%)	126 (37,1%)
SFB + CLA	359	266 (74,0%)	127 (47,7%)	127 (35,4%)
CLA	339	251 (74,0%)	96 (38,3%)	96 (28,3%)

Médias de taxa de clivagem, taxa de produção de embriões/clivados e taxa de produção de embrião/total (P>0,05).

Pereira (2008) e Marinho (2010) demonstraram que a adição do CLA *trans-10*, *cis-12* ao meio de cultura não afetou a taxa de clivagem e a qualidade ou desenvolvimento para o estágio de blastocisto, assim como foi encontrado no presente estudo.

Também trabalhando com o ácido linoléico conjugado, Rahme (2012) obteve resultados semelhantes em relação à taxa de clivagem embrionária, demonstrando que a presença ou ausência do SFB não interfere na taxa de clivagem. Porém em relação à produção de blastocistos, diferentemente do que foi encontrado no presente estudo, verificou-se que a ausência de SFB no meio de cultivo embrionário resultou em diminuição da produção de blastocistos no D7.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3 pode-se confirmar que é possível alcançar boas taxas de produção *in vitro* de embriões utilizando-se meios de cultivo que não contenham soro fetal bovino, sem prejuízo à taxa de produção de blastocistos.

Em relação à taxa de clivagem na presença ou ausência de SFB e em meios contendo ou não 100 µM de CLA *trans-10*, *cis-12*, do presente estudo, foram encontradas taxas variando entre 62,1% e 74% utilizando-se o sêmen sexado para a fecundação dos oócitos. Pereira (2008) e Marinho (2010)

também encontraram taxas de clivagem próximas a 70%, trabalhando com sêmen convencional. Rahme (2012) encontrou taxas de clivagem ligeiramente inferiores, de 46% e 51,9%, também utilizando sêmen convencional na fecundação e a mesma concentração de CLA utilizada neste trabalho.

Marinho (2010) encontrou taxa de clivagem de 74% para embriões cultivados em meio contendo 100 µM de CLA e clivagem superior (79%) para embriões cultivados em 50 µM de CLA. Porém em relação à taxa de produção de blastocistos a concentração de 100 µM de CLA foi superior. Esse atraso na clivagem de embriões cultivados na ausência de SFB ocorre porque o SFB acelera o desenvolvimento embrionário (Abe e Hoshi, 2003).

Rahme (2012) encontrou 24,2% de taxa de produção de blastocisto em relação aos clivados para o grupo com soro e grupo com soro acrescido de CLA. Já para o grupo sem soro acrescido de CLA verificou taxa de 15%, mostrando-se menos eficiente na produção *in vitro* de embriões. A taxa de produção de blastocistos de Rahme (2012) foram inferiores às encontradas no presente estudo.

Pereira (2008) também não encontrou diferença de produção de blastocistos nos grupos com SFB (22,9% \pm 1,5) e sem soro acrescido de CLA (23,2% \pm 1,3). Comparando-se as taxas encontradas no presente estudo com as de Pereira (2008), com grupos experimentais semelhantes, foram encontradas taxas de produção de blastocistos superiores.

Trabalhando com diferentes isômeros do ácido linoléico conjugado, Marinho (2010) encontrou taxas de produção de blastocistos em relação ao total de oócitos inseminados semelhantes para os isômeros *trans-10*, *cis-12* (20,9%), e *trans-9 cis-11* (19,9%) e para a mistura dos isômeros (23,1%).

4.2- *Quantificação do teor lipídico embrionário*

O *Sudan Black B* é uma corante que cora somente as gotas lipídicas intracitoplasmática de negro, podendo portanto ser utilizado para fazer a quantificação do teor lipídico embrionário (Sudano *et al.*, 2013).

O conteúdo lipídico intracitoplasmático nos blastômeros embrionários, para os diferentes grupos experimentais foi avaliado a partir da área ocupada por gotas lipídicas marcadas pelo corante *Sudan Black B* dos blastocistos submetidos à coloração.

Na figura 7, o diagrama de caixas foi usado para representar as áreas ocupadas pelas gotas de lipídios presentes nos blastocistos dos diferentes tratamentos e para quantificar e comparar as médias das áreas. O tratamento controle apresentou área média de lipídeos corados pelo *Sudan Black B* (dada em pixels) de 413.124,9 o que se refere a ocupação de 29,6% da área média dos blastocistos deste grupo. O teor lipídico do grupo controle foi superior aos demais ($P < 0,05$). O grupo SFB + CLA apresentou área média ocupada pelos lipídeos corados de 301.960,7 pixels ou 26,7% da área total dos blastocistos deste grupo. Finalmente o grupo CLA, apresentou área corada de 272.554,5 ou 22% da área dos embriões submetidos à coloração.

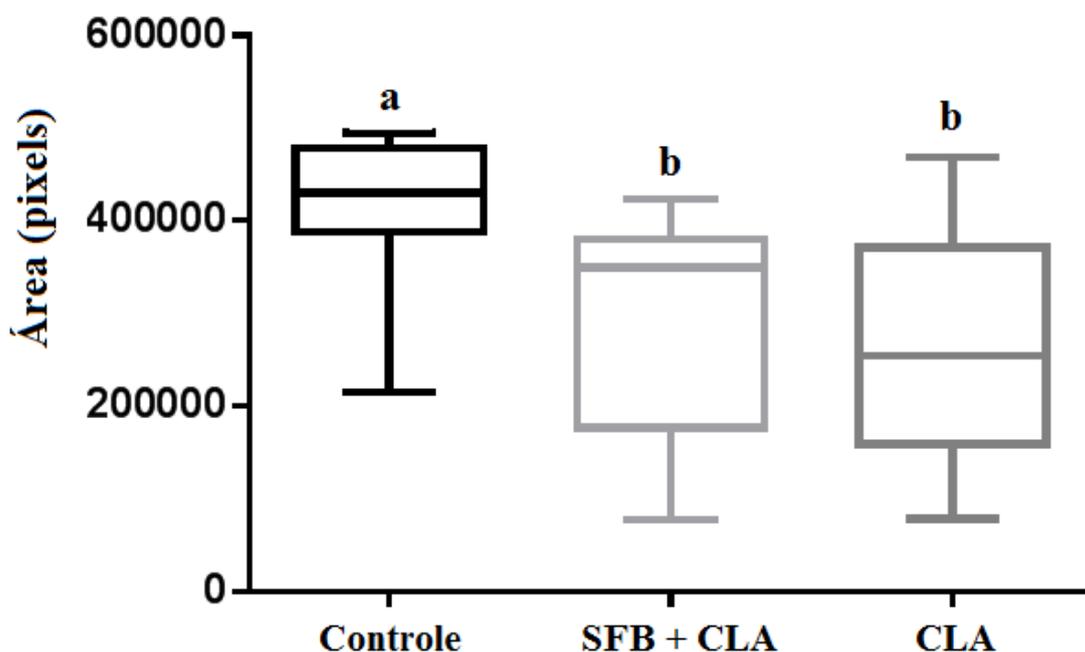


Figura 7: Composição lipídica dos diferentes grupos experimentais. Área média, em pixels, dos lipídeos corados por Sudan Black B, dos blastocistos (D7) produzidas nos diferentes grupos experimentais. Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de SNK ($P < 0,05$).

O grupo com SFB e sem CLA apresentou teor lipídico superior aos demais grupos experimentais. Resultados semelhantes foram encontrados por Rahme (2012) e Batista (2009), que reportaram que embriões cultivados em meio acrescido de SFB e CLA apresentaram redução significativa na quantidade de lipídeos em relação ao grupo controle.

Segundo Pereira *et al.* (2007), a presença de CLA no meio de cultivo embrionário leva à redução na expressão de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos, como o acilglicerol 3-fosfato aciltransferase responsável por catalisar a síntese de triglicérides, resultando, conseqüentemente, em redução da deposição lipídica nas células embrionárias.

Sudano (2012) utilizou a coloração por Sudan Black B para avaliar o efeito da adição do composto ethosulfato de fenasina

na redução do acúmulo de lipídeos em embriões PIV. Foram individualizadas gotas lipídicas pequenas médias e grandes para avaliar o efeito da retirada do SFB e adição do ethosulfato de fenasina na deposição de cada categoria de gota. Foi observado que a presença do SFB induz ao acúmulo das três categorias de gotas e o aumento da concentração do soro no meio de cultivo aumenta o teor lipídico. O ethosulfato de fenasina agiu reduzindo apenas gotas médias e grandes de lipídio. No presente estudo não foi feita a individualização das gotas lipídicas por tamanho, portanto, não se sabe em qual categoria de gotas lipídicas o CLA age reduzindo a sua deposição.

A marcação de lipídeos pelo *Nile Red* é outra técnica que permite a quantificação dos lipídeos presentes em oócitos e embriões. O *Nile Red* é um corante de fluorescência que também cora lipídeos,

quanto maior a intensidade de fluorescência emitida pela estrutura corada, maior é o seu conteúdo lipídico (Leroy *et al.*, 2005). Em trabalho realizado com oócitos suínos (Romek *et al.*, 2010), utilizando metodologia semelhante, demonstraram que a fluorescência esteve restrita as gotas lipídicas intracelulares. Utilizando a coloração por *Nile Red*, Rahme (2012) e Batista (2009) mostraram a eficácia do CLA em reduzir o acúmulo lipídico intracitoplasmático.

O mecanismo pelo qual o CLA promove a delipidação das células embrionárias ainda não está esclarecido, portanto não se sabe se este aditivo prejudica o desenvolvimento embrionário e fetal, neste caso faz-se necessário avaliar se ele se mostra ou não superior em produzir gestações em relação aos meios de cultivo contendo somente o soro fetal.

A Figura 8 apresenta imagens representativas de embriões dos três grupos experimentais.

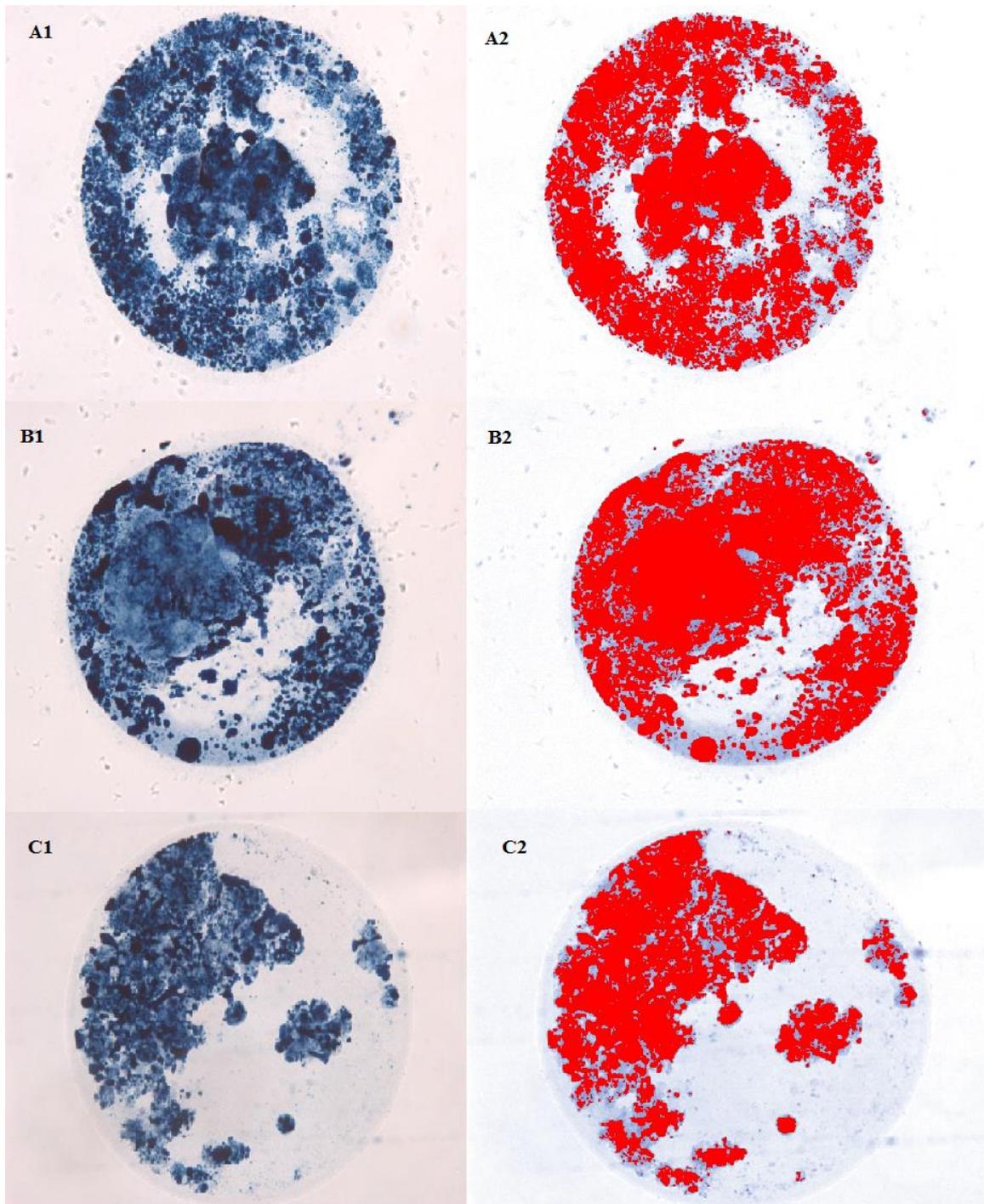


Figura 8: Embriões corados pelo *Sudan Black B* segundo grupo experimental. Imagem obtida por microscópio óptico com objetiva de 40X. (A1) Embrião corado por *Sudan Black B* do grupo experimental SFB. (A2) Conversão color -threshold do embrião A1. (B1) Embrião corado por *Sudan Black B* do grupo experimental SFB + CLA. (B2) Conversão color -threshold do embrião B1. (C1) Embrião corado por *Sudan Black B* do grupo experimental CLA. (C2) Conversão color -threshold do embrião C1.

4.3- Avaliação da reexpansão e eclosão dos embriões pós aquecimento

A taxa de reexpansão do grupo experimental com SFB e sem CLA (controle) foi superior à reexpansão apresentada pelos embriões dos demais tratamentos ($P < 0,05$). O tratamento CLA foi inferior ao grupo controle e superior ao SFB + CLA ($P > 0,05$). As taxas de

reexpansão para os tratamentos controle, SFB + CLA e CLA foram, respectivamente, 70,4%, 43,3% e 47,1%. As taxas de reexpansão e de eclosão estão apresentadas na Tabela 5 e a evolução do desenvolvimento dos blastocistos (D7) após 72 horas de incubação em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade pode ser observada na Figura 9.

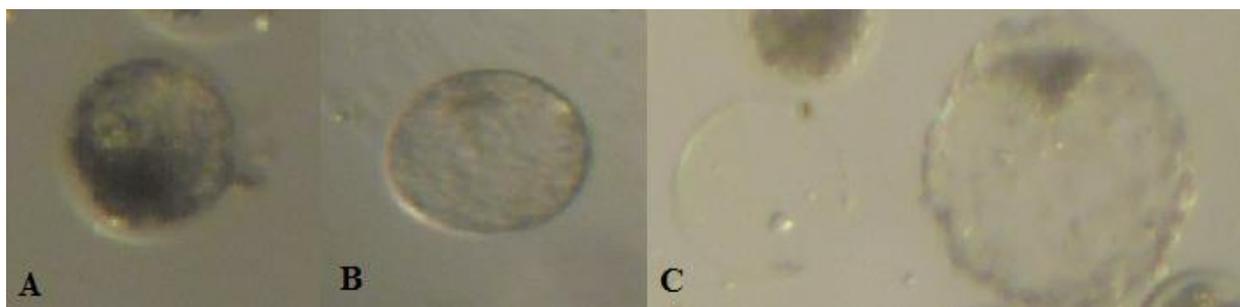


Figura 9: Viabilidade embrionária *in vitro*. Evolução do desenvolvimento embrionário após 72 horas de incubação em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade. (A) Blastocisto (Bl); (B) Blastocisto expandido (Bx); (C) Blastocisto eclodido (Be).

Em relação à taxa de eclosão os três tratamentos apresentaram desempenho semelhantes ($P > 0,05$), sendo de 42,1 %,

23,1% e 25,5% para os tratamentos controle, SFB + CLA e CLA, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5: Taxas de reexpansão e eclosão dos embriões bovinos produzidos *in vitro* e submetidos à vitrificação no sétimo dia de cultivo, de acordo com o grupo experimental.

Tratamento	Nº de embriões	Taxas de reexpansão	Taxas de eclosão
	reaquecidos		
	n	n (%)	n (%)
Controle	27	19 (70,4%) A	8 (42,1%)
SFB + CLA	30	13 (43,3%) C	3 (23,1%)
CLA	17	8 (47,1%) B	2 (25,0%)

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo Teste Qui-Quadrado ou pelo Teste Exato de Fisher ($P < 0,05$).

Rahme (2012) e Pereira *et al.* (2008), também trabalhando com o CLA, obtiveram taxa de reexpansão de 77,5% e 64,6%, respectivamente, de embriões cultivados com SFB + CLA. Rahme (2012)

obteve taxa de reexpansão de 71,8% em meio contendo somente o CLA. Em relação à taxa de eclosão em meio de cultivo com SFB + CLA, Rahme (2012) e Pereira *et al.* (2008) obtiveram, respectivamente 60% e

86%. Rahme (2012) obteve taxa de eclosão de 56,2% em meio contendo somente o CLA.

Sanches *et al.* (2013), adicionando a foscolina ao meio de cultivo embrionário *in vitro*, obtiveram taxas de reexpansão e eclosão, respectivamente, de 87,5% e 70,5%, que não diferiu em relação a evolução dos embriões produzidos em meio de a foscolina. Apesar de não ter havido diferença das taxas de reexpansão e eclosão dos meios de cultivo contendo ou não a foscolina, esta substância se mostrou mais eficiente em produzir gestações. Estes resultados reforçam que mesmo não havendo diferença em relação à taxa de eclosão entre os grupos experimentais, situação que ocorreu nesse trabalho, não é possível afirmar que estes embriões possuem a mesma capacidade de gerarem prenhez. Isso reforça a importância da transferência de embriões para avaliar a viabilidade embrionária, já que o desenvolvimento e evolução dos embriões *in vitro* podem diferir dos resultados *in vivo*.

Vajta *et al.* (1993), utilizando o método de *Open Pulled Straw* (OPS) para vitrificação de embriões, obtiveram taxas de reexpansão variando entre 81 e 92% e taxa de eclosão entre 50 e 75%. Em outros trabalhos, (Vajta *et al.*, 1996, Vajta *et al.*, 1998, Vajta *et al.*, 2000, Vajta *et al.*, 2006, Vajta *et al.*, 2009), foi demonstrado que a vitrificação pelo método de OPS pode resultar em altas taxas de sobrevivência embrionária pós-aquecimento, porém os bons resultados dependem da habilidade do técnico na realização desta técnica, da velocidade de

resfriamento e do tempo de exposição dos embriões aos crioprotetores. A vitrificação é delicada e exige habilidade e, por isso, é fundamental que o profissional seja previamente treinado e capacitado para executar a técnica. A vitrificação deve ser realizada em temperatura ambiente e de forma rápida.

Sabe-se que na vitrificação há grande concentração de crioprotetores no meio e, quando o embrião permanece em contato com este meio, por tempo prolongado antes da imersão em nitrogênio líquido, o resultado é a diminuição da sobrevivência embrionária (Carvalho *et al.*, 2011; Inaba *et al.* 2011). No presente experimento todo o processo de vitrificação foi realizado à temperatura ambiente, e o tempo de exposição ao meio de vitrificação não ultrapassou 20 segundos. Outro fator de extrema importância durante o processo de vitrificação é o volume de meio que permanecerá junto ao embrião na palheta. É importante que não haja mais que 10µl de na palheta contendo o embrião para que o processo de vitrificação seja o mais rápido possível e, conseqüentemente, possíveis oscilações de temperatura sejam evitadas durante o processo (Carvalho *et al.*, 2011; Inaba *et al.* 2011). Diante disso, para envasar os embriões na OPS, foram feitas gotas de 3 µl do meio de vitrificação e foi utilizado somente o volume de meio necessário para o embrião ser envasado na OPS por capilaridade.

A Tabela 6 apresenta os resultados de reexpansão e eclosão dos embriões, de acordo com os grupos experimentais, em 24, 48 e 72 horas de cultivo.

Tabela 6: Reexpansão e eclosão dos embriões, de acordo com os grupos experimentais, em 24, 48 e 72 horas de cultivo.

Tratamento	24 horas		48 horas		72 horas	
	Reexpansão (n/total)	Eclosão (n/total)	Reexpansão (n/total)	Eclosão (n/total)	Reexpansão (n/total)	Eclosão (n/total)
Controle	73,7% (14/19)B	37,5% (3/8)B	26,3% (5/19)B	62,5% (5/8)B	0,0% (0/19)	0,0% (0/8)
SFB + CLA	100,0% (13/13)A	100,0% (3/3)A	0,0% (0/13)A	0,0% (0/3)A	0,0% (0/13)	0,0% (0/3)
CLA	100,0% (8/8)A	100,0% (2/2)A	0,0% (0/8)A	0,0% (0/2)A	0,0% (0/8)	0,0% (0/2)

Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo Teste Exato de Fisher ($P < 0,05$).

Conforme apresentado na Tabela 6, diferente do esperado, os embriões do grupo controle evoluíram mais lentamente do que os embriões dos demais tratamentos. Segundo Abe e Hoshi (2003), a presença do SFB nos meios de cultivo *in vitro* acelera o desenvolvimento embrionário. Marinho (2010) encontrou que a ausência do SFB atrasa a clivagem embrionária. O SFB nos meios de cultivo *in vitro* fornece fatores de crescimento, hormônios, nutrientes e componentes antioxidantes, aumentando a produção de embriões e acelerando o desenvolvimento embrionário (Abe e Hoshi, 2003).

4.4- Avaliação sobrevivência embrionária pós transferência

A taxa de aproveitamento das receptoras para a transferência de embrião foi de 80% (44/55), considerando como resposta positiva ao protocolo de sincronização do estro os animais que apresentaram corpo lúteo e folículos de diâmetro menor ou igual a 1,9cm.

Diante do exposto na metodologia, apenas uma gestação foi verificada no diagnóstico precoce e confirmatório. A gestação foi resultante da transferência de apenas um embrião para o corno ipsilateral ao corpo lúteo e o embrião pertencia ao grupo controle (SFB sem CLA). Portanto o resultado da taxa de gestação para os grupos controle, SFB + CLA e CLA foram,

respectivamente de 4,35% (1/23), 0% (0/20) e 0% (0/28).

Katanami *et al.* (2002) encontraram taxa de gestação pós transferência de embriões vitrificados de 3,9% \pm 6,5 trabalhando com vacas de alta produção com ECC acima de 2,5. Utilizando-se ainda de animais de alta produção e acometidos de estresse calórico foram encontradas taxas de gestação de 6,2 \pm 3,2%; 19,0 \pm 5,0% e 6,2 \pm 4,1%, respectivamente para inseminação artificial em tempo fixo, embriões PIV transferidos à fresco e embriões PIV vitrificados. Os resultados de Katanami *et al.* (2002) foram semelhantes aos obtidos no presente estudo para o grupo controle.

Stewart *et al.* (2011), comparando a eficiência da transferência de embriões em vacas em lactação encontrou taxas de gestação de 42,1% para embriões PIV frescos, de 29,3% para embriões PIV vitrificados e de 18,3% para prenhez provenientes de inseminação artificial. Sanches *et al.* (2013) obtiveram taxa de gestação de 18,5% para embriões vitrificados em meio contendo o soro fetal bovino e livre de aditivos que interferem na lipogênese embrionária. As taxas de gestação encontradas no presente estudo foram inferiores às taxas encontradas por Stewart *et al.* (2011) e Sanches *et al.* (2013).

A eCG equina em altas doses (2000 a 2500 UI) pode ser utilizada para estimular

múltiplas ovulações em protocolos de TE. Entretanto, por esse hormônio apresentar meia vida longa, é muito comum que ocorram falhas na ovulação, situações nas quais é frequente encontrar um elevado número de folículos anovulatório (10 a 30 mm) no momento da coleta dos embriões (Sudano *et al.*, 2007). A aplicação da gonadotrofina coriônica equina também foi associada à secreção anormal de estradiol, progesterona e LH resultando na produção de embriões de baixa qualidade e menor taxa de gestação provenientes do embrião transferido (Callesen *et al.*, 1989).

O efeito mais importante da eCG nos protocolos de sincronização de receptoras de embrião é a estimulação do crescimento do folículo dominante, aumentando a taxa de ovulação (Sá Filho *et al.*, 2010).

Esse hormônio é utilizado para animais em anestro pós-parto ou com baixo escore de condição corporal (Bó *et al.*, 2007), com o objetivo de melhorar a taxa de gestação de fêmeas leiteiras de alta produção (Ferreira *et al.*, 2013) ou melhorar a taxa de gestação em receptoras de embrião (Pontes *et al.*, 2010). Pontes e colaboradores (2010), utilizando a dose de 300 UI de eCG e 1 mg de Cipionato de Estradiol no momento da retirada do dispositivo de progesterona, protocolo semelhante a metodologia utilizada no presente estudo, porém com uma dose ligeiramente superior dos dois hormônios que estimulam o crescimento final do folículo dominante e a ovulação, afirmam que a eficiência de seu protocolo de sincronização de estro é responsável por manter as taxas de prenhez acima da média.

Silva Filho (2006) avaliou a eficiência de doses de 200 UI e 500 UI de eCG para a estimulação do estro em novilhas mestiças pré-púberes e púberes. A menor dose da gonadotrofina foi mais eficiente na indução do estro em novilhas pré-púberes e, nas novilhas púberes não houve diferença.

Em vacas de leite de alta produção foram utilizadas as doses de 400 UI e 600 UI de eCG visando aumentar a taxa de ovulação, produzir corpo lúteo de maior área e mais funcional, porém as doses utilizadas não foram eficientes em aumentar a estimulação ovariana (Ferreira *et al.*, 2013).

Bó *et al.* (2007) demonstraram que a aplicação de eCG em fêmeas de corte em anestro pós-parto aumentou a taxa de crescimento e o tamanho do folículo ovulatório, além de aumentar a taxa de prenhez, não sendo relatado a ocorrência co-dominância folicular ou crescimento polifolicular, como verificado no presente experimento.

Conforme foi discutido, foi encontrado nas receptoras de embriões sinais característicos de superestimulação ovariana por eCG com falhas na ovulação, indicando que pode ter havido superdosagem na aplicação da gonadotropina nos animais. As transferências de embrião deverão ser repetidas na tentativa de rastrear a causa da desta estimulação excessiva dos ovários das receptoras.

5- CONCLUSÕES

A adição do ácido linoléico conjugado em meios de cultivo *in vitro* não reduziu a produção de blastocistos, sendo possível conseguir taxas de clivagem e produção de embrionárias semelhante a meios que não contém esse composto.

A ausência do soro fetal bovino nos meios de cultivo embrionário *in vitro* não apresentou prejuízos à produção de blastocistos. Meios de cultivo *in vitro* livres de soro fetal bovino apresentaram taxas de produção embrionária semelhante aos meios contendo o soro.

Embriões cultivados em meio contendo soro fetal bovino apresentam melhores taxas de reexpansão e eclosão em comparação à associação do soro com o

ácido linoléico conjugado ou somente o ácido linoléico conjugado em meios de cultivo utilizados para avaliar a viabilidade embrionária. Porém não se sabe se a evolução que os embriões apresentam *in vitro* é semelhante ao que ocorre após a transferência destes embriões.

O isômero do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* foi eficaz em reduzir da deposição de lipídeos intracitoplasmáticos nas células embrionárias, porém não se sabe se a melhoria da qualidade embrionária pelo ácido linoléico resultará em aumento no número de gestações.

Novas transferências embrionárias deverão ser realizadas para se avaliar o efeito do CLA na sobrevivência embrionária *in vivo*, referendando a taxa de reexpansão e de eclosão *in vitro*.

6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H., HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J. Reprod. Dev.*, v. 49, p. 193-202, 2003.
- ABE, H., YAMASHITA, S., SATOH, T. *et al.* Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and criotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 61, p. 57-66, 2002.
- AL-KATANAMI, Y. M., DROST, M., MONSON, R. L. *et al.* Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology*, v. 58, p. 171-182, 2002.
- ALMODIN, C. G., MINGUETTI-CAMARA, V. C., PAIXÃO, C. L. *et al.* Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum. Reprod.*, v. 25, p. 1192-1198, 2010.
- ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, v. 81, p. 96-102, 2014.
- ARAV, A., GIANAROLI, L., BAFARO, G. *et al.* A new vitrification technique for 8-cell stage mouse embryos. *IVF Meeting*. Barcelona, abs. 373, p. 118, 1987.
- BARUSELLI, P. S., GIMENES, L. U., SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, v.1, n.2, p.205-211, 2007.
- BATISTA, R. I. T. P. Efeito do ácido linoléico conjugado *trans-10, cis-12* na regulação do acúmulo de lipídeos e expressão gênica de embriões produzidos *in vitro*. Dissertação (Mestrado). Escola de Ciências Biológicas da UFJF, Juiz de Fora/MG, 2009.
- BAUMGARD, L. H., CORL, B. A., DWYER, D. A. *et al.* Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, v. 278, p. 179-184, 2000.
- BÓ, G. A., MAPLETOFT, R. J. Classificação e avaliação de embriões bovinos. *Anim. Reprod.*, v.10, n.3, p. 244-248, 2013.
- BÓ, G. A., CUTAIA, L., PERES, L. C. *et al.* Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Reproduction in domestic ruminants*. Nottingham, UK, p.223-236, 2007.
- BOCCA, C., BOZZO, F., CANNITO, S., *et al.* CLA reduces breast cancer cell growth and invasion through ER α and PI3K/Akt pathways. *Chem. Biol. Inter.*, v. 183, p. 187-193, 2010.
- BORGES, A. M., CARVALHO, B. C., RUAS, J. R. M. *et al.* Tecnologias de produção de fêmeas mestiças F1 Holandês x Zebu. *Informe Agropecuário* (Belo Horizonte), v. 31, p. 52-62, 2010.

- CALLESEN, H., BAK, A., GREVE, B. *et al.* Hormonal parameters for evaluation of superovulated heifers. *Theriogenology*, v. 39, p. 180, 1989. Retirado de: SUDANO, M. J., ALVARENGA, M. A., ALVARENGA, F. C. L. *et al.* Falhas da ovulação após tratamento superovulatório com eCG em vacas Nelore (*Bos indicus*). *Vet. Zootec.*, v. 16, n. 4, p. 592-600, 2009.
- CAMUS, A., CLAIRAZ, P., ERSHAM, A. *et al.* Principe de la vitrification: cinétiques comparatives. The comparison of the process of five different vitrification devices. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, V. 34, p. 737-745, 2006.
- CARVALHO, A. A., FAUSTINO, L. R., FIGUEIREDO, J. R. *et al.* Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Vet. Bras.*, v. 5, n. 3, p. 236-248, 2011.
- CHEN, S. U., CHIEN, C-L., WU, M-Y. *et al.* Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum. Reprod.*, v.21, p. 2794-2800, 2006.
- CHEN, S. U., LIEN, Y. R., CHENG, Y. Y. *et al.* Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum. Reprod.*, v. 16, p. 2350-2356, 2001.
- CHIAN, R. C., SON, W. Y., HUANG, J. Y. *et al.* High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertil. Steril.*, v. 84, supl. 36, 2005.
- CONSTANTINESCU, G. M., SCHATTEEN, H. *Comparative Reproductive Biology*. Editora Blackwell Publishing Asia, Carlton, Australia. 402 p., 2007.
- DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F., PRIEIS, K., SEIDEL JR, G. E. Metabolic regulation of in vitro bovine embryos: Effect of metabolica regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 18, p. 585-596, 2006.
- DEL CAMPO, M.R., ROWE, R.F., CHAICHAREON, D. *et al.* Effect of the relative locations of embryo and corpus luteum on embryo survival in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.23, p.303-308, 1983.
- DEL CAMPO, M. R., ROWE, R. F., FRENCH, L. R. *et al.* Unilateral relationship of embryos and the corpus luteum in cattle. *Biol. Reprod.*, v.16, p. 580-585, 1977.
- DINNYES, A., MENG, Q., POLGAR, Z. *et al.* Cryopreservation of mammalian embryo. *Acta Scient. Vet.*, v.34, n.1, p.171-190, 2006.
- DINNYES, A., DAI, Y., JIANG, S. *et al.* High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, v. 63, p. 513-518, 2000.
- DOBRINSKY, J. R., OVERSTROM, E. W., DUBY, R. T. *et al.* Effect of cytoskeletal stabilization on the development of bovine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, v. 43, p. 199, 1995.
- EALY, A. D., DROST, M., HANSEN, P. *et al.* Developmental changes in embryonic resistance to adversal effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*, v. 76, 2899-2905, 1993.
- EMBRAPA, CNPGL. Retirado de <<http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>>. Acessado em: 03/09/2013.
- EVANS, M., GEIGERMAN, C., COOK, J. *et al.* Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces

- apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids*, v. 35, p. 899-910, 2000.
- EVANS, M., LIN, X., ODLE, J. et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.*, v. 132, p. 450-455, 2002.
- FERREIRA, R. M., AYRES, H., SALES, J. N. S. et al. Effect of different doses of equine chorionic gonadotropin on follicular and luteal dynamics and P/AI of high-producing Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 140, p. 26-33, 2013.
- FRANCO, M., BLOCK, J., JOUSAN, F. D. et al. Effect of transfer of one or two in vitro-produced embryos and post-transfer administration of gonadotropin releasing hormone on pregnancy rates of heat-stressed dairy cattle. *Theriogenology*, v.66, p.224-233, 2006.
- GONÇALVES, P. B. D., VISITIN, J. A., OLIVEIRA, M. A. L. et al. Produção in vitro de embriões. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. Editora Rocca. São Paulo, p.261-301, 2008.
- GOULART, I. L. Embriões F1 (Hol X Gir) produzidos in vitro utilizados a fresco em rebanhos leiteiros comerciais e controlado. *R. Bras. Cie. Vet.*, n.16, v.2, p. 77-82, 2009.
- HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.79, p.245-264, 2003.
- HEYMAN, Y., CHESNE, P., CHUPIN, D. et al. Improvement of survival rate of frozen cattle blastocysts after transfer with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*, v.27, p.477-484, 1987.
- HOCHI, S., KIMURA, K., HANADA, A. Effect os linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology*, v.52, p.497-504, 1999.
- HOLM, P., BOOTH, P. J., SCHMIDT, M. H. et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol or without serum-proteins. *Theriogenology*, v.52, p.683-700, 1999.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. Retirado de: www.ibge.gov.br Acessado em: 01/04/2014.
- INABA, Y., AIKAWA, Y., HIRAI, T. et al. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using cryotop. *Journal of Reprod. Devel.*, v. 57, n. 4, 2011.
- ISACHENKO, V., FOLCH, J., ISACHENKO, E. et al. Double vitrification of rat embryos at diferente developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*, v. 60, p. 445-452, 2003.
- KEPLER, C. R., HIRONS, K. P., McNEILL, J. J. et al. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, v. 241, p.1350-1354, 1966.
- KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, v. 67, p. 73-80, 2007.
- KUWAYAMA, M., VAJTA, G., IEDA, S. et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod. Biomed. Online*, v. 11, p. 608-614, 2005.
- LANE, M., SCHOOLCRAFT, W. B., GARDNER, D. K. et al. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.*, v. 72, p. 1073-1078, 1999.
- LARMAN, M. G., GARDNER, D. K. Vitrifying mouse oocytes and embryos with super-cooled air. *Hum. Reprod.*, v. 25, 2010.
- LEROY, J. L. M. R., STURMEY, R. G., VAN HOECK, V. et al. Suplementação de lipídeos na dieta de vacas para a

- performance reprodutiva, viabilidade oocitária e embrionária: existe benefício real? *Anim. Reprod.*, v.10, n.3, p. 151-159, 2013.
- LEROY, J. L. M. R., GENICOT, G., VAN SOOM, A. *et al.* The use of fluorescent dye, Nile Red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocyte. *Theriogenology*, v. 63, p. 1181-1194, 2005.
- LOMBARDO, Y. B., CHICCO, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. *J. Nut. Biochem.*, v.17, p.1-13, 2006.
- LU, K. H., SEIDEL JR., G. E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically sorted sperm. *Theriogenology*, v. 62, p.819-830, 2004.
- MADALENA, F. E. Por que F1? In: 5o Encontro de Produtores de Gado Leiteiro F1, 2004, Belo Horizonte, MG. *Anais do 5o Encontro de Produtores de Gado Leiteiro F1*. BHTE: FEPMVZ Editora p.1 - 21, 2004.
- MARINHO, L. S. R. . Ácido linoléico conjugado na criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Dissertação (mestrado). Universidade do Estado de Santa Catarina, 76p., 2010.
- MARTIN, J., VALEILLE, K. Conjugated linoleic acid: all the same or to everyone its own function? *Reprod. Nutr. Dev.*, v.42, p.525-536, 2002.
- MATSUMOTO, H., JIANG, J. Y., TANAKA, T. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, v. 42, p. 139-144, 2001.
- MERTON, J. S., KNIJN, H. M., FLAPPER, H. *et al.* Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology*, v. 80, p. 365-371, 2013.
- MEZZALIRA, A., VIEIRA, A. D. Cryopreservation of cows oocytes and embryos. *Acta Scient. Vet.*, v.34, n. 1, p.191-196, 2006.
- MITCHELL, P. L., McLEOD, R. S. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis: studies in animal models. *Biochem. Cell Biol.*, v. 86, p. 293-301, 2008.
- OLIVEIRA, P. A., RUAS, J. R. M., CONCEIÇÃO, P. R. M. Avaliação das características produtivas e reprodutivas de vacas F1 Holandês X Nelore. XIII Seminário de Pesquisa e Pós-graduação. Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão. Universidade Estadual de Montes Claros, 2012.
- PARK, Y., STORKSON, K.J., ALBRIGHT, K. J. *et al.* Evidence that the trans-10, cis-12 isomer os conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*, v.34, p.235-241, 1999.
- PARRISH, J. J., KROGRNAES, A., SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and percoll method on success of “*in vitro*” fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. V.44, p.859-869, 1995.
- PEREIRA, R. M., CARVALHAIS, I., PIMENTA, J. *et al.* Biopsed and vitrified bovine embryos viability is improved by tras10, cis12 conjugated linoleic aid supplementatios during *in vitro* embryo culture. *Anim. Reprod. Sci.*, v.106, p.322-332, 2008.
- PEREIRA, R. M., BAPTISTA, M. C., VASQUES, M. I. *et al.* Cryosurvival of bovine blastocists is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic

- acid (10t,12c CLA). *Anim. Reprod. Sci.*, v.98, p.293-301, 2007.
- PETERSON, D. G., MATITASHVILI, E. A., BAUMAN, D. E. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increase trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nut.*, v. 133, p.3098-3102, 2003.
- PETYIM, S., MAKEMAHAR, O., KUNATHIKOM, S. *et al.* The successful pregnancy and birth of a healthy baby after human blastocyst vitrification using Cryo-E, first case in Siriraj Hospital. *J. Med. Assoc. Thai.*, v. 92, p. 1116-1121, 2009.
- PONTES, J. H. F., SILVA, K. C. F., BASSO, A. C. *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*, v.74, p.1349-1355, 2010.
- PONTES, J. H. F., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B. V. *et al.* Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods on the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.
- PORTMANN, M., NAGY, Z. P., BEHR, B. Evaluation of blastocyst survival following vitrification / warming using two different closed carrier systems. *Hum. Reprod.*, v. 25, 2010.
- RAHME, L.S.T.R. Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, 42p., 2012.
- RALL, W. F., FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 ° C by vitrification. *Nature*, v. 313, p. 573-575, 1985.
- ROBERTSON, I., NELSON, R. Certificação e identificação de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A., SEIDEL, S. M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*, 3. Ed. P.180, 1999.
- RUAS, J. R. M., SILVA, M. A. E., FERREIRA, J. J. Desempenho produtivo e reprodutivo de vacas F1 Holandês X Zebu em rebanhos da EPAMIG. *Anais do 6º Encontro de Produtores de Gado Leiteiro F1*, n.6, p.146-186, 2008.
- SÁ FILHO, M. F., AYRES, H., FERREIRA, R. M. *et al.* Equine corionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomt-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*, v. 73, p. 651-658, 2010.
- SANCHES, B. V., MARINHO, L. S. R., FILHO, B. D. O. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVP-derived *Bos indicus* embryo to a forskolin before vitrification. *Theriogenology*, v. 80, p. 372-377, 2013.
- SATA, R., TSUJII, H., ABE, H. *et al.* Fatty acid composition os bovine embryos cultured em sérum-free and sérum-containing medium during early embryonic development. *J. Reprod. Dev.*, v.45, p.97-103, 1999.
- SCHMITZ, G., ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lip. Res.*, v.47, p.147-155, 2008.
- SEIDEL, G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their criopreservation. *Theriogenology*, v. 65, p. 228-235, 2006.
- SILVA FILHO, A. H. S. Métodos de indução e sincronização do estro e da ovulação em novilhas mestiças (*Bos taurus* vs *Bos indicus*) pré-púberes e púberes. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, 80p., 2006.
- STEWART, B. M., BLOCK, J., MORELLI, P. *et al.* Efficacy of embryo transfer en lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos

- produced in vitro with sex-sorted semen. *J. Dairy Sci.* v. 94, p. 3437-3445, 2011.
- STOCK, L. A., ZOCCAL, R. Mudanças na produção mundial de leite. Milkpoint. Postado em 16/08/2013. Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/panorama/mudancas-na-producao-mundial-de-leite-85143n.aspx>> . Acesso em: 14/04/2014.
- SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., MAZIEIRO, R. R. D. *et al.* Melhorando a capacidade de sobrevivência após a criopreservação: uma abordagem embrionária. *Anim. Reprod.*, v.10, n.3, p. 59-66, 2013.
- SUDANO, M. J., SANTOS, V. G., TATA, A. *et al.* Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. *Biol. Reprod.*, v. 87, p. 1-11, 2012.
- SUDANO, M. J., PASCHOAL, D. M., RASCADO, T. S. *et al.* Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, v.75, p.1211-1220, 2011.
- SUDANO, M. J., BERNAL, P. N., FALA, A. M. *et al.*, Falha da ovulação em tratamentos superovulatórios com eCG em vacas Nelore (relato de caso). In: *Anais do 2º Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste*, São Carlos, 2007. Retirado de: SUDANO, M. J., ALVARENGA, M. A., ALVARENGA, F. C. L. *et al.* Falhas da ovulação após tratamento superovulatório com eCG em vacas Nelore (*Bos indicus*). *Vet. Zootec.*, v. 16, n. 4, p. 592-600, 2009.
- SUGIYAMA, R., NAKAGAWA, K., SHIRAI, A. *et al.* Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). *J. Assist. Reprod. Genet.*, v. 27, p. 161-167, 2010.
- TSANG, W. H., CHOW, K. L. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*, v. 46, p. 550-552, 2009.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. Washington, Dairy: World Markets and Trade, 2013. Disponível em: <<http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/dairy-market/dairy-market-12-14-2013.pdf>>. Acesso em: 01/05/2014.
- VAJTA, G. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion. *Reprod. BioMed. Online*, v. 19, s. 3, 2009.
- VAJTA, G., KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v. 65, p. 236-244, 2006.
- VAJTA, G. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60, p. 357-364, 2000.
- VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 51, p. 53-58, 1998.
- VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T. *et al.* Overall efficiency of in vitro embryo production and vitrification in cattle. *Theriogenology*, v.45, p.683-689, 1996.
- VANDERZWALMEN, P., BERTIN, G., DEBAUCHE, C. *et al.* In vitro survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertil. Steril.*, v. 74, supl., p. 215-216, 2000.
- VIANA, J. M. H., SIQUEIRA, L. G. B., PALHAO, M. P., CAMARGO, L. S. A. Features and perspective of the Brazilian in vitro embryo industry. *Anim. Reprod.*, v. 9, n. 1, p. 12-18, 2012.
- VIANA, J. H. M., SIQUEIRA, L. G. B., PALHÃO, M. P. *et al.* Use of In Vitro fertilization technique in the last decade and

- its effects on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Scient. Vet.*, p. 661-674, 2010.
- VIANA, J. H. M., CAMARGO, L. S. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Scient. Vet.*, v.3, p.915-924, 2007.
- VILELA, D. Cruzamento errado pode deteriorar genética. *Noticiário Tortuga*. São Paulo, ano 49, n.432, 2003.
- WEST, D. B., DELANY, J. P., CAMET, P. M. et al. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol.*, v. 275, p. 667-672, 1998.
- WEST, D. B., BLOHM, F. Y., TRUETT, A. A. et al. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J. Nutr.*, v. 130, p. 2471-2477, 2000.
- WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P., MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C e -269°C. *Science*, v. 178, p. 411-414, 1972.
- WOLFE, J, BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, v. 39, p. 103-129, 1999.
- XU, J., CHAUBAL, S. A., DU, F. Optimising IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology*, v. 71, p. 39-47, 2009.
- XU, J., GUO, Z., SU, L. et al. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 2510-2518, 2006.
- YANG, X., JIANG, S., FOOTE, R. H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 34, p. 94-100, 1993.
- YAVIN, S., AROYO, A., ROTH, Z. et al. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum. Reprod.*, v. 24, p. 797-804, 2009.