

Efeito da adição do ácido linoleico conjugado no cultivo *in vitro* de embriões F1 Holandês x Zebu na sobrevivência pós-vitrificação

[Effect of conjugated linoleic acid addition in *in vitro* culture medium in F1 Holstein X Zebu embryo survival post vitrification]

A.C. Leite, V.B. Andrade, E.B.M. Silva, A.M. Borges

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Avaliou-se o efeito da adição do ácido linoleico conjugado (CLA) ao meio de cultivo *in vitro* na viabilidade pós-vitrificação de embriões F1 Holandês x Zebu. Foram utilizados três meios de cultivo: controle ($n=340$ oócitos): meio SOF e soro fetal bovino (SFB), sem o CLA; SFB+CLA ($n=359$ oócitos): meio SOF, SFB e CLA; CLA ($n=339$ oócitos): meio SOF e CLA, sem o SFB. Todos os blastocistos produzidos foram submetidos à vitrificação, pelo método de *Open Pulled Straw*. Quinze blastocistos de cada tratamento foram fixados para quantificação lipídica por coloração com *Sudan Black B*. Para avaliar a viabilidade embrionária, foi observada a capacidade de reexpansão e eclosão pós-aquecimento dos embriões (controle=27; SFB+CLA=30; CLA=17). Foram realizadas transferências em um ou dois embriões por receptora para avaliação da sobrevivência *in vivo*: T1 [receptoras que receberam um blastocisto ($n=17$ embriões, sendo controle=5, SFB+CLA=6 e CLA=6)]; T2 [receptoras que receberam dois blastocistos, ($n=54$ embriões, sendo controle=18, SFB+CLA=14 e CLA=22)]. Não houve diferença nas taxas de clivagem (62,1%; 74,0%; 74,0% 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 (37,1%; 35,4%; 28,3% para controle; SFB+CLA; CLA, respectivamente) ($P>0,05$). Houve diminuição de gotículas lipídicas nos embriões cultivados em meio suplementado com CLA em relação aos embriões cultivados na presença do SFB e na ausência do CLA ($P<0,05$). A taxa de reexpansão foi maior no grupo controle (70,4%) em relação ao CLA (47,1%) e menor no grupo SFB+CLA (43,3%) ($P<0,05$). O CLA foi eficaz em reduzir a deposição de lipídeos intracitoplasmáticos nas células embrionárias, porém não houve diferença de viabilidade após a desvitrificação dos embriões.

Palavras-chave: ácido linoleico conjugado, ácido linoleico conjugado *trans-10*, *cis-12*, CLA, criopreservação de embriões, vitrificação de embriões

ABSTRACT

The effect of adding conjugated linoleic acid (CLA) to the culture media on the viability after cryopreservation of F1 Holstein X Zebu embryos was evaluated. Three different culture media were tested: control ($n = 340$ oocytes): SOF medium and fetal bovine serum (FBS) without the CLA; FBS + CLA ($n = 359$ oocytes): SOF, FBS and CLA; CLA ($n = 339$ oocytes): SOF and CLA without the FBS. The produced blastocysts were subjected to vitrification, by the *Open Pulled Straw* method. Fifteen blastocysts per treatment were fixed for lipid quantification by staining with *Sudan Black B*. Embryo re-expansion and hatching capability were used to assess viability (control = 27; FBS + CLA = 30; CLA = 17). Transfers of one or two embryos to recipients were performed to evaluate *in vivo* survival: T1 [recipients that received one blastocyst ($n=17$ embryos, Control=5, FBS+CLA=6 and CLA=6)]; T2 [recipients that received two blastocysts ($n =54$ embryos, Control=18, FBS+CLA=14 and CLA=22)]. There was no difference in cleavage rate (62.1%; 74%; 74% for Control; FBS + CLA, CLA, respectively), blastocyst production in relation to the cleaved structures (59.7%; 47.7%; 38.3% for Control; FBS + CLA, CLA, respectively) and blastocyst production relative to the total

oocytes (37.1%, 35.4%, 28.3% for Control; FBS + CLA, CLA, respectively) between treatments ($P > 0.05$). A reduction of lipid droplets was observed in embryos cultured in medium supplemented with CLA compared to embryos cultured in the FCS in the absence and presence of CLA ($P < 0.05$). The reexpansion rate was higher in the Control group (70.4%) compared to the CLA (47.1%) and lowest for FBS+CLA (43.3%) ($P < 0.05$). The hatching rates were similar among treatments, 42.1%; 23.1%; 25% for control; SFB + CLA; CLA respectively ($P > 0.05$). Only one pregnancy was observed in early and confirmatory diagnosis, as the result of a Control group embryo transfer. Although embryos cultured with CLA have shown smaller intracytoplasmic lipid content, no difference was observed in viability following vitrification between treatments.

Keywords: conjugated linoleic acid, conjugated linoleic acid trans-10, cis-12, CLA, embryo cryopreservation, embryo vitrification

INTRODUÇÃO

Atualmente, o maior obstáculo para disseminação da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é a baixa taxa de sobrevivência dos embriões ao descongelamento. O alto teor lipídico citoplasmático implica reduções na qualidade embrionária e na resistência ao congelamento deles (Pereira *et al.*, 2007) (Mezzalira e Vieira, 2006). A criopreservação de embriões e gametas possibilita a manutenção da viabilidade de embriões excedentes e a utilização do estro natural de receptoras, que resulta em taxas de gestação mais altas do que os animais sincronizados, além de diminuir o custo com aplicação de hormônios (Gonçalves *et al.*, 2008). Nesse contexto, são realizados diversos estudos sobre criopreservação 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).

A vitrificação é a técnica de criopreservação cujos resultados são os mais consistentes em embriões PIVE, pois as altas velocidades de resfriamento e o tempo reduzido de exposição das células embrionárias a temperaturas críticas e aos efeitos tóxicos dos crioprotetores minimizam os danos à membrana das células embrionárias (Dinnyes *et al.*, 2000; Mezzalira e Vieira, 2006; Gonçalves *et al.*, 2008).

Uma estratégia para se obterem embriões bovinos produzidos *in vitro* de melhor qualidade e aumentar a sobrevivência deles pós-descongelamento seria a adição do ácido linoleico conjugado *trans-10*, *cis-12* (CLA) no meio de cultura. O CLA é um ácido graxo poli-insaturado natural que apresenta atividade antiarterosclerótica, antiobesidade e inibidora da

expressão de genes 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 esse 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 e, assim, podendo apresentar efeitos positivos na criopreservação de embriões bovinos (Hochi *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Rahme, 2012).

Considerando-se a importância de fêmeas mestiças F1 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 do CLA no meio de cultivo *in vitro* como estratégia para diminuir a quantidade de gotículas intracelulares de gordura depositadas nos embriões, de modo a melhorar sua congelabilidade pelo processo de vitrificação.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Fecundação *In Vitro* de Embriões do EV-UFMG, durante o período de outubro de 2012 a abril de 2014. Todos os procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo nº 134/2012). Todos os reagentes utilizados no trabalho foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), exceto quando explicitado.

Os embriões foram produzidos de oócitos de ovários de fêmeas Nelore, obtidos em matadouro, transportados até o laboratório em solução fisiológica (0,9% de NaCl) aquecida a 35°C, em tempo não superior a quatro horas após o término do abate. Os folículos com diâmetro

Efeito da adição...

entre 2 e 8mm foram puncionados com o auxílio de seringa e agulha descartáveis; em seguida, os complexos *cumulus-oophorus* (CCOs) aspirados foram classificados de acordo com a qualidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus* (Constantinescu e Schatten, 2007). Os CCOs de graus I e II selecionados foram divididos aleatoriamente em três grupos e, sequencialmente, foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 24 horas, em estufa incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico, 95% de umidade em meio base de TCM-199 bicarbonato (Gibco Life Technologies, Grand Island, EUA), acrescido de 10% de SFB, 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-V®, Bioniche Inc, Canadá), 5g/mL de LH (Lutropin-V®, Bioniche Inc., Canadá), 10µg/mL de estradiol, 22µg/mL de piruvato e 83,4µg/mL de amicacina. Para a fecundação *in vitro* (FIV), utilizou-se 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. A seleção de espermatozoides viáveis para a FIV foi realizada utilizando-se o método do gradiente descontínuo de Percoll. O *pellet* resultante da centrifugação foi lavado em meio de capacitação espermática (TALP-SÊMEN), e a concentração foi ajustada para $0,3 \times 10^6$ espermatozoides/mL (Xu et al., 2006). O meio de FIV utilizado foi constituído por FERT-TALP (Parrish et al., 1995), suplementado com amicacina (83,4µg/mL), penicilamina (27µg/mL), hipotaurina (1µg/mL), epinefrina (0,3µg/mL), albumina sérica bovina (5µg/mL), piruvato (22µg/mL) e heparina (10µg/mL). Os CCOs foram fecundados e incubados nas mesmas condições da MIV, por um período de 18 a 22 horas, sendo o dia da fecundação considerado o D0. Os meios de maturação e fecundação não diferiam entre os grupos experimentais, somente os meios de cultivo apresentavam diferença de composição entre os tratamentos.

Após a FIV, os zigotos foram debridados das células do CCOs, utilizando-se micropipeta automática e, posteriormente, estes foram submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV), em três tratamentos: meio *Synthetic Oviduct Fluid Medium* (SOF) suplementado com 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) e 2,5% de soro fetal bovino (SFB; grupo controle) ($n = 340$);

meio SOF suplementado com 0,5% de BSA, 2,5% de SFB e 100µM de ácido linoleico conjugado (CLA; grupo SFB+CLA) ($n = 359$); meio SOF contendo 0,5% de BSA, 100µM de CLA e sem SFB (grupo CLA) ($n = 339$). 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 pelo método de *Open Pulled Straw* (OPS) e armazenados em nitrogênio líquido a -196°C, por no mínimo duas semanas, de acordo com cada tratamento.

Os embriões selecionados para vitrificação foram lavados em solução DPBS acrescida de 5% de SFB (*Holding Medium – HM*) e, então, desidratados por um minuto, em solução de 10% de etilenoglicol e 10% de DMSO em HM. Posteriormente, os embriões foram desidratados novamente em uma segunda solução contendo 20% de etilenoglicol e 20% de DMSO, por 20 segundos, e envasados em OPS (Vajta et al., 1996).

Após a vitrificação, 45 blastocistos (15 blastocistos de cada grupo experimental) foram fixados para posterior quantificação do conteúdo lipídico por coloração com *Sudan Black B* (Merck Ag Darmstadt, Alemanha), conforme descrito por Sudano et al. (2012), o que está demonstrado na Fig. 1.

Setenta e quatro blastocistos (sendo controle = 28, SFB+CLA = 29 e CLA = 17) foram desvitrificados e cultivados em estufa incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade, para avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro*, observando-se a reexpansão e a eclosão dos embriões 24, 48 e 72 horas após o início do cultivo. Setenta e um blastocistos (sendo controle = 23, SFB+CLA = 20 e CLA = 28) foram transferidos para fêmeas receptoras de embrião para avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro* por meio da taxa de gestação. Foram realizadas transferências de um ou dois embriões por receptora para avaliação da sobrevivência *in vivo*: T1 [receptoras que receberam um blastocisto ($n = 17$ embriões, sendo controle = 5, SFB+CLA = 6 e CLA = 6)]; T2 [receptoras que receberam dois blastocistos, ($n = 54$ embriões, sendo controle = 18, SFB+CLA = 14 e CLA = 22)].

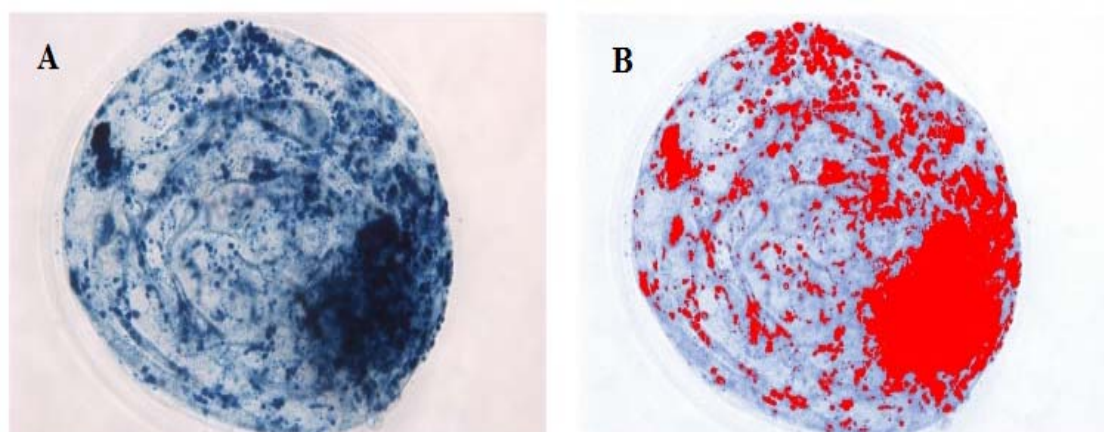


Figura 1: Quantificação lipídica de embriões bovinos por coloração com *Sudan Black B*. Imagem obtida por microscópio óptico com objetiva de 40x. (A) Embrião corado por *Sudan Black B*. (B) Conversão *color-threshold* para quantificação da área ocupada pelas gotículas lipídicas por meio do *software Image J* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

O experimento seguiu um delineamento inteiramente ao acaso. Os grupos de oócitos foram considerados as unidades experimentais. Os resultados de taxas de clivagem e blastocisto, segundo rotina laboratorial, foram considerados como réplicas, enquanto o teor de lipídeos foi analisado para cada embrião separadamente. 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%. O programa de estatística utilizado para comparação dos resultados obtidos no presente trabalho foi o *GraphPad InStat*. Para os resultados de embriões clivados, produção de embriões em relação ao total de clivados e produção de embriões em relação ao total de oócitos inseminados, foi utilizado o teste de Tukey. Para avaliação da viabilidade embrionária *in vitro*, a reexpansão e a 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença ou a ausência do soro fetal bovino e/ou do ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-12* (CLA) no meio de cultivo de embriões não interferiu na clivagem embrionária (Tab. 1). O mesmo fato ocorreu com a taxa de produção de blastocistos avaliada no sétimo dia de cultivo embrionário (D7), a qual não diferiu entre os grupos experimentais (Tab. 1).

Tabela 1. 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%)

Percentual médio de clivagem, produção de embriões/clivados e produção de embrião/total ($P > 0,05$).

Pereira *et al.* (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 o desenvolvimento para o estágio de blastocisto, assim como foi encontrado no presente estudo. Com base nesses resultados, 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 100µM de CLA *trans-10*, *cis-12*, Pereira *et al.* (2008) e Marinho (2010) também encontraram taxas de clivagem média próximas a 70%; já Rahme (2012) encontrou taxas de clivagem ligeiramente inferiores, de 46% e 51,9%, sendo utilizado nesses trabalhos sêmen convencional. Marinho (2010) encontrou taxa de clivagem de 74% para embriões cultivados em meio contendo 100µM de CLA e clivagem superior (79%) para embriões cultivados em 50µM de CLA. Porém, em relação à taxa de produção de blastocistos, a concentração de 100µM 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 SFB e o grupo com SFB acrescido de CLA. Já para o grupo sem SFB acrescido de CLA, verificou taxa de 15%, indicando sua menor eficiência na produção *in vitro* de embriões ($P<0,05$). Pereira *et al.* (2008) não observou prejuízos à produção de embriões em meio de cultivo suplementado com CLA e sem SFB ($23,2\% \pm 1,3$) em relação à produção de embriões convencional com SFB ($22,9\% \pm 1,5$), porém, comparando-se as taxas encontradas com as de Pereira *et al.* (2008), entre grupos experimentais semelhantes, as taxas de produção de blastocistos deste estudo, para todos os grupos experimentais, foram superiores, pois, no trabalho comparativo, os embriões foram criopreservados e biopsados.

O conteúdo lipídico intracitoplasmático nos blastômeros embrionários, para os diferentes grupos experimentais, foi avaliado na área ocupada por gotas lipídicas marcadas pelo

corante *Sudan Black B* dos blastocistos submetidos à coloração. Houve diminuição de gotículas lipídicas nos embriões cultivados em meio suplementado com CLA em relação aos embriões cultivados na presença do SFB e na ausência do CLA ($P<0,05$). O grupo CLA apresentou menor área corada, representada por 272.554,5 *pixels*, referente a 22% da área dos embriões submetidos à coloração. O grupo SFB+CLA apresentou área média ocupada pelos lipídeos corados de 301.960,7 *pixels*, referente a 26,7% da área total dos blastocistos desse grupo. Finalmente, o teor lipídico foi superior no grupo com SFB e sem CLA comparado aos demais grupos experimentais ($P<0,05$), apresentando área média de lipídeos de 413.124,9 *pixels*, correspondente à ocupação de 29,6% da área média dos blastocistos desse grupo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Batista (2009) e Rahme (2012), que reportaram redução significativa na quantidade de lipídeos em embriões cultivados em meio acrescido de SFB e CLA. 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.

As taxas de reexpansão e de eclosão foram inferiores nos grupos contendo CLA e CLA+SFB, comparadas às do grupo controle (Tab. 2). Também trabalhando com o CLA, Pereira *et al.* (2008) obtiveram taxa de reexpansão de 77,5% e Rahme (2012) encontrou taxa de 64,6% para 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, Pereira *et al.* (2008) e Rahme (2012) obtiveram, respectivamente, 60% e 86%. Rahme (2012) obteve taxa de eclosão de 56,2% em meio contendo somente o CLA.

De maneira semelhante ao encontrado no presente estudo, Batista *et al.* (2014) encontraram taxas de eclosão inferiores aos de Pereira *et al.* (2008) e Rahme (2012). No presente trabalho, foram observados 14% de eclosão para o grupo controle e 16,5% para o grupo de embriões cultivados com SFB e CLA.

Diante desse resultado, foi apresentada a hipótese de que a suplementação do meio de cultivo com o CLA pode ter afetado os mecanismos associados com a digestão enzimática da zona pelúcida pelo trofoblasto, prejudicando a capacidade de eclosão do embrião.

Vajta *et al.* (1996), mediante a utilização do método de *Open Pulled Straw* (OPS) para

vitricificação de embriões, obtiveram taxas de reexpansão variando entre 81 e 92% e taxa de eclosão entre 50 e 75%, demonstrando que o método é eficiente para vitricificar embriões produzidos em condições convencionais e que, portanto, os resultados encontrados para sobrevivência embrionária pós-desvitricificação não estão ligados à técnica de criopreservação utilizada no trabalho.

Tabela 2. Taxas de reexpansão e eclosão dos embriões bovinos produzidos *in vitro* e submetidos à vitricificação no sétimo dia de cultivo, de acordo com o grupo experimental

Tratamento	Nº de embriões reaquecidos		Taxas de reexpansão		Taxas de eclosão	
	<i>n</i>		<i>n</i> (%)		<i>n</i> (%)	
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 ($P < 0,05$).

Uma possível explicação para que a diminuição da deposição lipídica nos blastômeros não tenha sido referendada pelas taxas de reexpansão e eclosão embrionárias é que o cultivo *in vitro* com altas concentrações de CLA, durante longos períodos, pode ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário (Absalón-Medina *et al.*, 2014). Possivelmente, a concentração de 15µM do CLA *trans-10*, *cis-12* ou a suplementação do meio de cultivo com isômeros do ácido linoleico conjugado 36 horas antes da

vitricificação tenha resultados mais promissores (Absalón-Medina *et al.*, 2014).

Pereira *et al.* (2007) encontraram taxas satisfatórias de reexpansão (84,7% ± 4,1) e eclosão (63,7% ± 4,1) pós-descongelamento de embriões cultivados com CLA. Esses resultados foram decorrentes da renovação diária do meio de cultivo e da adição do antioxidante glutathione para mitigar os danos causados pelo estresse oxidativo resultante da peroxidação de lipídeos intracitoplasmáticos.

Tabela 3. Taxas de reexpansão e eclosão de embriões bovinos em 24, 48 e 72 horas de cultivo pós-desvitricificação, de acordo com o grupo experimental

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)

Cultivo pós-desvitricificação de embriões bovinos produzidos em meio suplementado ou não com soro fetal bovino (SFB) e ácido linoleico conjugado (CLA). Médias seguidas de letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste exato de Fisher ($P < 0,05$).

Diferentemente do esperado, os embriões do grupo controle evoluíram mais lentamente do que os embriões dos demais tratamentos (Tab. 3). Segundo Abe e Hoshi (2003), a presença do SFB nos meios de cultivo *in vitro* acelera o

desenvolvimento embrionário. Reiterando os resultados anteriores, Marinho (2010) encontrou que a ausência do SFB nos meios de cultivo *in vitro* atrasa a clivagem embrionária, haja vista que fornece fatores de crescimento, hormônios,

nutrientes e componentes antioxidantes, aumentando a produção de embriões e acelerando o desenvolvimento embrionário (Abe e Hoshi, 2003).

Na avaliação da sobrevivência embrionária após a transferência para receptoras de embrião, apenas uma gestação foi verificada nos diagnósticos precoce e confirmatório, resultado da transferência de um embrião do grupo controle. As taxas de gestação para os grupos controle, SFB+CLA e CLA foram, respectivamente, de 4,35% (1/23), 0% (0/20) e 0% (0/28). 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*.

CONCLUSÕES

A adição do ácido linoleico conjugado em meios de cultivo *in vitro*, na presença ou não do soro fetal bovino, não reduziu a produção de blastocistos, sendo possível conseguir taxas de clivagem e produção de embrionárias semelhantes a meios que não contêm esse composto. O isômero do ácido linoleico conjugado *trans-10, cis-12* foi eficaz em reduzir a deposição de lipídeos intracitoplasmáticos nas células embrionárias, porém não houve diferença de viabilidade após a desvitrificação dos embriões. Possivelmente, modificações na dose e no momento de administração do CLA ou a associação do CLA com substâncias que aumentam a produção de antioxidantes poderão incrementar os resultados de sobrevivência embrionária obtidos neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Fapemig (Projeto CVZ APQ 0912-12), ao CNPq (Projeto 484602/2012-8) e à Capes, pelo apoio financeiro; ao Cenatte Embriões, pelo fornecimento dos meios e pelo suporte técnico; à Epamig, pela parceria.

REFERÊNCIAS

ABE, H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J. Reprod. Dev.*, v.49, p.193-202, 2003.

ABSALÓN-MEDINA, V.A.; BEDFORD-GAUS, S.J.; GILBERT, R.O. *et al.* The effects of conjugated linoleic acid isomers *cis-9, trans-11* and *trans-10, cis-12* on *in vitro* bovine embryo production and cryopreservation. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.6164-6176, 2014.

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*. 2009. Dissertação (Mestrado) - Escola de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG.

BATISTA, R.I.T.P.; RAPOSO, N.R.B.; CAMPOS-JÚNIOR, P.H.A. *et al.* *Trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid reduces neutral lipid content and may affect cryotolerance of *in vitro*-produced crossbred bovine embryos. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, v.5, p.1-8, 2014.

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, p.236-248, 2011.

CONSTANTINESCU, G.M.; SCHATTEN, H. *Comparative reproductive biology*. Carlton: Blackwell Publishing, 2007. 402p.

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.

GONÇALVES, P.B.D.; VISITIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L. *et al.* Produção *in vitro* de embriões. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Rocca, 2008. p.261-301.

HOCHI, S.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro*-produced bovine morulae. *Theriogenology*, v.52, p.497-504, 1999.

MARINHO, L.S.R. Ácido linoleico conjugado na criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2010. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, SC.

- MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D. Cryopreservation of cows oocytes and embryos. *Acta Sci. Vet.*, v.34, 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.
- PARRISH, J.J.; KROGRNAES, A.; SUSKOPARRISH, 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.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I. et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Anim. Reprod. Sci.*, v.98, p.293-301, 2007.
- 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.
- RAHME, L.S.T.R. *Efeito do ácido linoléico conjugado na sobrevivência pós criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro*. 2012. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- 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.
- 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.
- 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.