

Papel do ácido trans-vacênico e do ácido linoleico conjugado na maturação *in vitro* e seus impactos no desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos *in vitro*

Luiza Bastos Guimarães⁽¹⁾, Naiara Zoccal Saraiva⁽³⁾, Alexandre Marcos de Melo⁽¹⁾, Clara Slade Oliveira⁽²⁾, Carolina Capobiango Romano Quintão⁽²⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/Fapemig), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Analistas, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: luizabgjf@gmail.com

Resumo — Os ácidos graxos insaturados (AGI) desempenham papel crucial na fertilidade bovina, com destaque para o ácido linoleico conjugado cis-9, trans-11 (CLA c9, t11), que melhora a competência oocitária e cuja síntese é mediada pela enzima estearoil-CoA dessaturase 1 (SCD1). Este estudo teve como objetivo investigar a regulação da SCD1 durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos, suplementando o meio de cultivo com diferentes concentrações do precursor (ácido trans-vacênico - AV) e do produto (ácido linoleico conjugado - CLA) da SCD1. Foram analisados os efeitos desses ácidos graxos sobre o desenvolvimento, número total de células, atividade mitocondrial e índice apoptótico dos embriões. Observou-se aumento significativo na taxa de embriões ($p < 0,05$) com a concentração de 100 μM de CLA, sem alterações ($p > 0,05$) no número total de blastômeros ou no índice apoptótico entre os grupos. Os grupos suplementados com AV e CLA apresentaram menor acúmulo lipídico ($p < 0,05$) em comparação ao controle (meio base BSA). Em conclusão, a suplementação com precursores e produtos da SCD1 reduziu o acúmulo lipídico, e na concentração de 100 μM , o CLA aumentou a taxa de blastocistos em meio livre de soro fetal bovino, evidenciando potenciais benefícios desse AGI.

Termos para indexação: ácido linoleico conjugado, competência oocitária, estearoil-CoA dessaturase 1, maturação *in vitro*.

Role of trans-vaccenic acid and CLA in IVM and their impacts on bovine embryo development and quality *in vitro*

Abstract — Unsaturated fatty acids (UFAs) play a crucial role in bovine fertility, with special emphasis on conjugated linoleic acid cis-9, trans-11 (CLA c9, t11), which improves oocyte competence and whose synthesis is mediated by the enzyme stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1). This study aimed to investigate SCD1 regulation during the *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes by supplementing the culture medium with different concentrations of the precursor (trans-vaccenic acid - TVA) and the product (conjugated linoleic acid - CLA) of SCD1. The effects of these fatty acids on embryo development, total cell number, mitochondrial activity, and apoptotic index were analyzed. A significant increase in embryo rate ($p < 0.05$) was observed with the 100 μM concentration of CLA, with no changes ($p > 0.05$) in total blastomere number or apoptotic index between groups. The groups supplemented with TVA and CLA showed lower lipid accumulation ($p < 0.05$) compared to the control (BSA-based medium). In conclusion, supplementation with SCD1 precursors and products reduced lipid accumulation, and at 100 μM , CLA increased blastocyst rates in serum-free medium, highlighting potential benefits of this UFA.

Index terms: conjugated linoleic acid, *in vitro* maturation, oocyte competence, stearoyl-CoA desaturase 1.

Introdução

O Brasil é um dos líderes na produção de embriões *in vitro*, mas a taxa de desenvolvimento, que varia em média entre 30% e 40%, não progrediu substancialmente desde os anos 1990 (Lonergan et al., 2016; Viana, 2020). Pesquisas recentes buscam otimizar tanto a taxa de desenvolvimento como a qualidade dos embriões produzidos (Choudhary et al., 2016). Fatores como a qualidade dos gametas e condições de cultivo inadequadas ainda limitam o sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE).

O CLA (c9, t11), sintetizado pela SCD1 a partir do ácido trans-vacênico, tem sido relacionado às melhores taxas de criotolerância embrionária, devido à alteração no perfil lipídico das membranas embrionárias e à redução do acúmulo de gotas lipídicas intracitoplasmáticas (Leão et al., 2015). Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da modulação da atividade da SCD1 no desenvolvimento embrionário, número total de células, atividade mitocondrial e índice apoptótico de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Os resultados desse trabalho vão ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, sobretudo no seguinte objetivos específico: ODS 8 - Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos.

Material e métodos

Oócitos bovinos foram recuperados de ovários de fêmeas abatidas e transportados para o laboratório em solução salina estéril a 30-35 °C. Folículos de 2 a 7 mm foram aspirados e os oócitos selecionados foram distribuídos nos seguintes grupos: A – controle com 8 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA); B – controle com dimetilsulfóxido (DMSO); C e D – 100 e 150 µM de AV, respectivamente; E, F e G – 50, 100 e 150 µM de CLA, respectivamente. Os oócitos foram maturados *in vitro* por 24 horas a 38,5 °C, em 5% de CO₂. Após a MIV, os oócitos foram fecundados, com espermatozóides previamente selecionados, em meio TALP-FIV suplementado. Os zigotos resultantes foram cultivados por sete dias em meio SOF (Synthetic Oviduct Fluid - Fluido ovidutal sintético) modificado com BSA e 1,5% de soro fetal bovino (SFB), sendo mantidos em estufa até o estágio de blastocisto. As taxas de clivagem foram avaliadas 48 horas após a fertilização *in vitro* (FIV), e o desenvolvimento até blastocisto foi verificado no sétimo dia após a FIV (D7). No D7, os blastocistos foram fixados e avaliados quanto ao número total de células (corante 4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI), conteúdo lipídico (Nile Red) (Saraiva et al., 2023) e apoptose (Técnica de TUNEL- Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). As imagens foram capturadas por microscópio de fluorescência e analisadas pelo software Image J. Os dados foram submetidos à ANOVA one-way e as médias comparadas pelo teste de Tukey, com significância de 5%.

Resultados e discussão

Os resultados de clivagem e desenvolvimento embrionário indicam que em relação ao uso de precursor da enzima SCD1, ácido trans-vacênico, o grupo 150µM foi inferior àquele 100µM em termos de embriões clivados e de blastocistos, sendo que o grupo 100µM possibilitou resultados similares aos obtidos no grupo controle BSA. Quando o meio foi suplementado diretamente com o produto da SCD1 (CLA), foi observado que a maior concentração (150µM) se mostrou prejudicial ao desenvolvimento embrionário, proporcionando taxas

inferiores ($p < 0,05$) tanto na clivagem quanto na produção de blastocistos. Por sua vez, o grupo 100 μ M se mostrou superior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos com CLA e grupo controle BSA (Tabela 1).

Tabela 1. Valores referentes às taxas de clivagem e produção de blastocistos (D7) após MIV por 24h em meio base contendo 8 mg/mL de BSA e ácido trans-vacênico (AV) nas concentrações 100 e 150 μ M ou ácido linoleico conjugado (CLA) nas concentrações 50, 100 e 150 μ M.

Grupos	Embriões clivados n(%)	Embriões clivados n(%)
Controle BSA	97/131 (74,0) ^a	42/181 (23,2) ^{bc}
Controle DMSO	92/125 (73,6) ^a	43/125 (34,4) ^a
100 μ M AV	101/130 (77,7) ^a	36/130 (27,7) ^{ab}
150 μ M AV	78/128 (60,9) ^b	21/128 (16,4) ^c
50 μ M CLA	84/116 (72,4) ^a	22/116 (19,0) ^{bc}
100 μ M CLA	76/102 (74,5) ^a	37/102 (36,3) ^a
150 μ M CLA	41/126 (32,5) ^c	3/126 (2,4) ^d

a,b,c Valores com sobrescritos diferentes entre linhas dentro de uma mesma coluna diferem entre si ($p < 0,05$, Qui-quadrado). Os percentuais de clivados e de blastocistos foram calculados pelo número total de oócitos.

Não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos avaliados em relação ao número total de blastômeros (Figura 1A) e ao índice apoptótico (Figura 1B). Em relação ao acúmulo lipídico, observou-se que todos os grupos tratados com AV e CLA mostraram níveis inferiores ($p < 0,05$) de área lipídica em comparação ao controle BSA (Figura 1C).

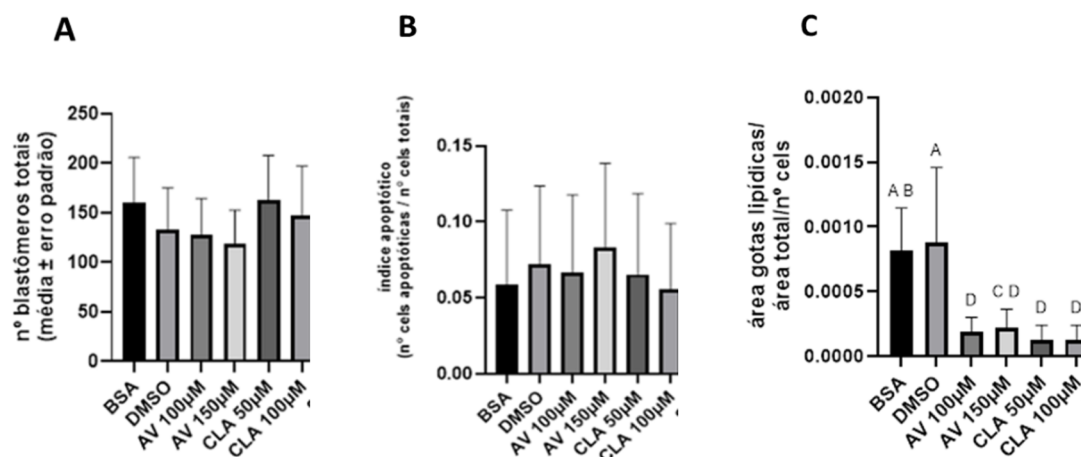


Figura 1. (A) Número blastômeros totais; (B) índice apoptótico (n° células apoptóticas/ n° células totais; %); (C) Níveis de lipídios de blastocistos bovinos produzidos após maturação in vitro nos tratamentos com ácido graxo trans-vacênico (AV) nas concentrações de 100 e 150 μ M ou ácido graxo linoleico conjugado cis 9, trans 11 (CLA) nas concentrações de 50 e 100 μ M. BSA – grupo controle sem SFB; DMSO – diluidor dos AGs. As colunas do gráfico correspondem às médias e as barras correspondem ao erro padrão de cada grupo experimental.

Conclusões

A suplementação do meio MIV com precursores e produtos da enzima SCD1 promoveu redução do acúmulo lipídico nos embriões produzidos, sendo que a concentração de 100 μ M de CLA, inclusive, permitiu maior taxa de desenvolvimento embrionário em meio livre de SFB, o que sinaliza para um potencial benefício desse AGI na etapa inicial da PIVE.

Agradecimentos

À Embrapa Gado de Leite e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela oportunidade da bolsa recebida do Programa Pibic e pelo financiamento do projeto (APQ 02041-22).

Referências

CHOUDHARY, K. K.; KAVYA, K. M.; JEROME, A.; SHARMA, R. K. Advances In reproductive biotechnologies. **Veterinary World**, v. 9, n. 4, p. 388-395, 2016. DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.388-395>.

LEÃO, B. C. S.; ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; CABRAL, E. C.; COELHO, M. B.; FERREIRA, C. R.; EBERLIN, M. N.; ACCORSI, M. F.; NOGUEIRA, É.; MINGOTI, G. Z. Improved embryonic cryosurvival observed after in vitro supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. **Theriogenology**, v. 84, n. 1, p. 127-136, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.023>.

LONERGAN, P.; FORDE, N.; SPENCER, T. The role of progesterone in embryo development in cattle. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 28, n. 1/2, p. 66-74, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1071/rd15326>.

SARAIVA, N. Z.; OLIVEIRA, C. S.; QUINTAO, C. C. R.; CAMARGO, L. S. de A. **Avaliação do acúmulo lipídico em embriões bovinos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. 19 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 280). Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1157254>. Acesso em: 5 set. 2024.

VIANA, J. H. M. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 36, n. 4, p. 8-25, 2020. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2019.pdf. Acesso em: 5 set. 2024.