



## EFEITOS DA CANOLA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE NOVILHAS DA RAÇA HOLANDES

Izabela Gil Pimenta Lemos<sup>1</sup>, Paulo Augusto Aguiar de Faria<sup>2</sup>, Fabio Luiz Bim Cavalieri<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI- UniCesumar. izabelagilpimentalemos@hotmail.com

<sup>2</sup>Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. paulo260344@gmail.com

<sup>3</sup>Orientador, Doutor, Docente no Curso de Medicina Veterinária, UNICESUMAR. Pesquisador do Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. fabio.cavalieri@unicesumar.edu.br

### RESUMO

Esta pesquisa tem a intenção de estudar o resultado da inserção de grão de canola e fontes de ácidos graxos essenciais na dieta de novilhas de alta competência genética da raça holandês, com o intuito de avaliar seus impactos nos parâmetros de produção de embriões bovinos *in vitro*. As produções *in vitro* se realizará no laboratório Comercial Bio-Maringá no Centro de Biotecnologia Unicesumar (BIOTEC). O experimento acontecerá na Fazenda Várzea Grande, que está localizada na cidade de Floresta no Estado do Paraná, onde utilizará 32 novilhas com idade entre 12 a 15 meses, da raça holandês, pesando em média 340 kg. Os animais serão divididos em: grupo 1 controle (CTL) e grupo 2 canola (CAN), nas coletas serão analisadas: amostras de trato, sangue, líquido folicular e acontecerá várias aspirações foliculares (OPUs). Durante o experimento, será realizado fertilizações *in vitro* para avaliar a taxa de clivagem, produção de blastocisto e criotolerância de embriões.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ácidos graxos essenciais; Blastocistos; Fertilização.

### 1. INTRODUÇÃO

A nutrição adequada na reprodução bovina é essencial e a inclusão de ácidos graxos essenciais, como ômega-3 e ômega-6, pode afetar positivamente o desempenho reprodutivo dos animais (Caldari-Torres et al., 2011; Wonnacott et al., 2010; Herrera-Camacho et al., 2011).

A puberdade em novilhas taurinas está relacionada ao peso corporal e a deficiência nutricional pode retardar esse crescimento (de Figueiredo et al., 2008; Perry, 2016).

Estudos sugerem que a adição de fontes de gordura na dieta dos bovinos pode melhorar a reprodução, produção e economia, afetando o ambiente folicular ovariano e a função do corpo lúteo. Melhorar a nutrição, genética e desempenho reprodutivo é essencial para atingir uma produção desejada na indústria pecuária (Saples et al., 1998; Mattos et al., 2000; Scaliante-Junior, 2021).

O trabalho em questão visa avaliar a implementação de grãos de canola como fonte de ácido graxo essencial na alimentação de novilhas holandesas e seus efeitos na produção *in vitro* de embriões.

### 2. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1 ANIMAIS, ALIMENTAÇÃO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A pesquisa utilizará 52 novilhas doadoras de óócitos da raça holandesa, com peso médio de 350 kg, escore de condição corporal entre 3,0 e 3,5, e idade entre 12 a 15 meses. As doadoras vão ser divididas em grupos de forma aleatória para receberem diferentes



tratamentos: aspiração folicular em dois momentos distintos (entre 4 e 8 dias após a ovulação) e duas dietas experimentais (com e sem linhaça em grão).

Durante 90 dias, as novilhas serão alimentadas com dietas que atendem as exigências nutricionais do gado leiteiro de acordo com o NCR (2001), considerando novilhas holandesas com peso de 360 kg e ganho diário médio de 700 g. A alimentação será fornecida duas vezes ao dia (8h e 16h), com medição das sobras pela manhã para avaliar o consumo dos alimentos.

## 2.2 ASPIRAÇÃO FOLICULAR E RECUPERAÇÃO DOS OÓCITOS

Para a aspiração dos folículos em vacas, será utilizado um ultrassom ALOKA SSD-50 com um transdutor. A aspiração será feita com uma agulha 20G conectada a um tubo. O vácuo necessário será obtido por meio de uma bomba. Os ovócitos aspirados serão inseridos em uma solução contendo 2,0% de (SFB), 25 UI/mL de heparina sódica e 98,0% de PBS.

As novilhas receberão anestesia peridural com 5 mL de lidocaína a 2% e após a vulva será higienizada. Será implantado um transdutor até final do saco vaginal e os ovários serão manuseados por meio do reto. Os folículos serão classificados em três categorias de acordo com seu tamanho. Após serão aspirados com uma agulha e uma bomba de vácuo.

Em seguida a aspiração, os oócitos serão lavados e classificados em viáveis e inviáveis com base em sua aparência.

## 2.3 SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E EVOLUÇÃO

Após o período de 90 dias de dieta, os animais serão protocolados para a sincronização da ovulação. Será utilizada uma combinação de benzoato de estradiol e progesterona intravaginal, consequentemente, após nove dias esse dispositivo será retirado e ocorrerá a aplicação de D-cloprosteno de sódio, cipionato de estradiol, gonadotrofina coriônica equina. No dia 0 (D8) é onde ocorre ovulação, dessa forma, acontecerá a aspiração folicular das novilhas respectivamente entre quatro e oito dias após o dia zero, ou possível ovulação.

## 2.4 PRODUÇÃO IN VITRO DOS EMBRIÕES

O laboratório da Unicesumar será usado para a produção in vitro de embriões, usando COCs selecionados. Os oócitos serão lavados e colocados em placas com meio de maturação. Após a maturação, os oócitos serão fertilizados usando sêmen para sexagem da fêmea holandesa. Os zigotos serão cultivados in vitro e a taxa de clivagem será avaliada após 48 horas. Após sete dias, a taxa de formação de blastocistos será analisada.

## 2.5 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Após 48 horas (dia 2 - D2), avaliará a taxa de clivagem. Os embriões serão realocados para continuar o desenvolvimento em uma atmosfera fechada. No 7º dia da cultura in vitro (CIV), a taxa de blastocistos de qualidade grau I será avaliada, seguindo critérios do Manual da IETS 1998. No dia 10 de cultivo, a taxa de blastocistos que eclodiram será analisada.

## 2.6 CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DO BLASTOCISTOS



Para avaliar a tolerância à criopreservação, os blastocistos (qualidade 1 e 2) dos tratamentos serão criopreservados no 7º dia de cultivo. Será utilizado o método lento de congelamento, controlando a temperatura. No envasamento, os embriões serão armazenados individualmente em palhetas e serão posicionados na coluna do meio por 7 minutos. Após, as palhetas serão transferidas para a crio câmara da máquina de congelamento por mais 5 minutos. Em seguida, será realizado o congelamento das extremidades das palhetas. O descongelamento dos embriões será feito em duas partes: 10 segundos no ar e 20 segundos em banho-maria a 25°C.

## 2.7 TOLERÂNCIA E CRIOPRESERVAÇÃO

Após o descongelamento, os embriões serão realocados na mesma placa de cultivo. Após 12 horas, será avaliada a taxa de sobrevivência dos embriões com base na re-expansão do blastocele. Os embriões serão mantidos na estufa por mais 72 horas para completar o desenvolvimento e avaliar as taxas de eclosão. O período total em cultivo será de 10 dias.

## 2.8 PERFIL METABÓLICO

No início do protocolo de sincronização e no dia da aspiração folicular, serão coletadas amostras de sangue das veias coccígeas das novilhas. O plasma será separado, para análises posteriores dos índices de colesterol total.

## 2.9 CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS OVARIANAS

Durante a aspiração dos folículos (D4 e D8 após o cio), serão realizadas avaliações nos ovários das doadoras para registrar a presença de corpo lúteo (CL) e folículo dominante, bem como seus tamanhos e volumes. Cada corpo lúteo também será avaliado quanto à perfusão sanguínea usando o Color-Doppler e transdutor.

## 2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações recolhidas para caracterizar as estruturas ovarianas vão ser relacionadas com o momento da onda folicular, onde cada grupo experimental se encontra, por meio de regressão logística múltipla. As taxas de clivagem e blastócitos serão calculada e depois comparadas. As informações analisadas de expressão gênica e detecção de proteínas vão passar por análise de variação e das médias comparadas.

## 2.11 COMITÊ DE ÉTICA

Os dados coletados através de protocolos de técnicas empregadas, serão submetidos para avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário de Maringá / UNICESUMAR.



### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através desse trabalho espera-se que com a inserção da canola na dieta de novilhas da raça holandês, obtenha impactos positivos na taxa de desenvolvimento embrionário e sua viabilidade, também influenciando no perfil hormonal desses animais, dessa forma aumentando a produtividade.

### REFERÊNCIAS

- Cardoso, C. J. T., De Lima, A. C. B., Da Silva, W. A. L., Souza-Cáceres, M. B., Pereira, D. M., De Oliveira, M. V. M., Nogueira, É., & De Andrade Melo-Sterza, F. (2019). **Supplementation of cows with linseed: Effects on antral follicle count, oocyte quality, and nutritional and plasma metabolite parameters.** *Semina: Ciencias Agrarias*, 40(6), 2637–2650. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6p2637>
- Cavalieri, F. B., Santos, G. T., Matsushita, M., Petit, H. V., Rigolon, L. P., Silva, D., Horst, J. A., Capovilla, L. C., & Ramos, F. S. (2005). **Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flaxseed.** *Canadian Journal of Animal Science*, 85(3), 413–416. <https://doi.org/10.4141/A04-088>
- Costa, R. L. D. da, & Fontes, R. da S. (2010). **Ácidos graxos na nutrição e reprodução de ruminantes.** *Pubvet*, 4(24), 873.
- de Figueiredo, D. M., Paulino, M. F., Detmann, E., de Souza, M. G., Couto, V. R. M., & Sales, M. F. L. (2008). **Estratégias de suplementação para antecipação da idade à puberdade para novilhas de corte em pastagem tropical.** *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 30(4), 415-423.
- De Marchi, F.E.; Romero, J.V.; Damasceno, J.C.; Grande, P.A.; Zeoula, L.M.; Santos, G.T., 2015. **Pelleting associated with the addition of sodium monensin increases the conjugated linoleic acids concentration in the milk of dairy cow fed canola seeds.** *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 28:1095-1104.
- Gandra, J. R., Barletta, R. V., Mingoti, R. D., Verdurico, L. C., Freitas, J. E., Oliveira, L. J., Takiya, C. S., Kfouri, J. R., Wiltbank, M. C., & Renno, F. P. (2016). **Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows.** *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4590–4606. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9974>
- Herrera-Camacho, J., Soberano-Martinez, A., Duran, K. E. O., Aguilar-Perez, C., & Ku-Vera, J. C. (2011). **Effect of fatty acids on reproductive performance of ruminants.** In *Artificial Insemination in Farm Animals*. IntechOpen
- MATTOS R.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. **Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants.** *Reviews in Reproduction*, v.5, n.1, p.38-45, 2000
- Neves, C.A.; Santos, W.B.R.; Santos, G.T.; Silva, D.C.; Jobim, C.C.; Santos, F.S.; Visentainer, J.V.; Petit, H.V., 2009. **Production performance and milk composition of dairy cows fed extruded canola seeds treated with or without lignosulfonate.** *Animal Feed Science and Technology*, 154: 83-92



PERRY, G. A. **Factors affecting puberty in replacement beef heifers.**  
Theriogenology, v.86, p.373-378, 2016.

Petit, H.V.; Cavalieri, F.B.; Dos Santos, G.T.; Morgan, J.; Sharpe, P., 2008. **Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed and the success of embryo transfer.** Journal of Dairy Science, 91: 1786-1790. DOI: 10.3168/jds.2007-0782.

Pugliesi, G.; Rezende, R.G.; Silva, J.C.B.; Lopes, E.; Nishimura, T.K.; Baruselli, P.S.; Madureira, E.H.; Binelli, M. (2017). **Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF e bovinos.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, 41(1)140-150.

Robinson, J. J., Ashworth, C. J., Rooke, J. A., Mitchell, L. M., & McEvoy, T. G. (2006). **Nutrition and fertility in ruminant livestock.** *Animal Feed Science and Technology*, 126(3-4), 259-276.

Santos, W.B.R.; Santos, G.T.; Neves, C.A.; De Marchi, F.E.; Kazama, D.C.S.; Ítavo, L.C.V.; Damasceno, J.C.; Petit, H.V., 2012. **Rumen fermentation and nutrient flow to the omasum in Holstein cows fed extruded canola seeds treated or not with lignosulfonate.** Revista Brasileira de Zootecnia, 41: 1747-1755.

Scaliante Júnior, João Ricardo. **Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas nelore suplementadas com semente de girassol.** 2021.

Staples, C. R., Burke, J. M., & Thatcher, W. W. (1998). **Influence of Supplemental Fats on Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows.** *Journal of Dairy Science*, 81(3), 856–871. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75644-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75644-9)

Wonnacott, K. E., Kwong, W. Y., Hughes, J., Salter, A. M., Lea, R. G., Garnsworthy, P. C., & Sinclair, K. D. (2010). **Dietary omega-3 and-6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos.** *Reproduction*, 139(1).