



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DA FONTE PROTEICA NA PRODUÇÃO, QUALIDADE E
CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO**

SEVERINO BERNARDINO DE SENA NETTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DA FONTE PROTÉICA NA PRODUÇÃO, QUALIDADE E
CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO**

Severino Bernardino de Sena Netto

Orientador: Dr. Ivo Pivato

Dissertação de Mestrado em Ciências Animais

PUBLICAÇÃO: 150/2016

BRASÍLIA-DF

FEVEREIRO - 2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SENA-NETTO, S. B. EFEITO DA FONTE PROTÉICA NA PRODUÇÃO, QUALIDADE E CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO. BRASÍLIA. FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2015. 89P. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SEF27e Sena Netto, Severino Bernardino de
EFEITO DA FONTE PROTEICA NA PRODUÇÃO, QUALIDADE E
CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN
VITRO / Severino Bernardino de Sena Netto;
orientador Ivo Pivato. -- Brasília, 2016.
89 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência
Animal) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Congelamento Clássico. 2. BSA. 3. Viabilidade.
I. Pivato, Ivo, orient. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA FONTE PROTEICA NA PRODUÇÃO, QUALIDADE E
CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO**

SEVERINO BERNARDINO DE SENA NETTO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS Á OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

IVO PIVATO, Dr.

(ORIENTADOR)

MARGOT ALVES NUNES DODE, PhD (EMBRAPA-CENARGEN)

(EXAMINADORA EXTERNA)

GIANE REGINA PALUDO, Dra. (UnB)

(EXAMINADORA INTERNA)

BRASÍLIA/DF, FEVEREIRO DE 2016

DEDICATÓRIA

Me batizou com seu nome, onde bastava mencionar e ser recebido com alegria eufórica em todos os lugares onde chegava. Frente a qualquer situação bastava sentar-se ao seu lado e estava protegido.

Eu era imbatível em tudo para o Senhor!

E agora tudo que anseio é um dia reencontra-lo em algum lugar que me permita mais uma vez te olhar, fico aqui agora ensaiando as palavras que gostaria de dizer. Mas enquanto este tempo não chega lanço minhas palavras ao vento para que cheguem aos seus ouvidos ... E espero que esteja me olhando, e como Eu esperando o momento de nos encontrarmos novamente.

Dedico tudo ao Senhor, Vovô! (Severino Bernardino de Sena) – In Memoriam

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo pelo dom da vida.

Às minhas 3 mães: Maria Lídia, Maria Rodrigues e Maria Francineide por sempre se esforçarem para me oferecer a melhor formação moral e intelectual.

Ao professor Ivo Pivato, por além de tudo ser um exemplo moral e intelectual.

À Dra. Margot, por toda bondade e ensinamentos ofertados a mim.

Ao amigo José Felipe Sprícigo pela amizade sincera e por muito ter me ensinado. Muito obrigado zé!

À amiga Ligiane, por sempre me ajudar quando precisei, se tornando uma valorosa amiga durante todo tempo.

À Dra. Giane Paludo, pela participação na minha banca examinadora, que foi fundamental para a conclusão do trabalho final. Muito obrigado!

Aos meus colegas: Ana Luiza, Andrielle, Anelise, Carolle, Chico, Oscar, Nathália, Felipe, Renato, João, Malane, Nayara, Márcia, Mateus, Naiara Borges, Thaís, Taynan, Luzia, Thiago, Priscila e todos os estagiários, pelas amizades, brincadeiras e ensinamentos. Muito obrigado!

Aos professores do Programa de pós-graduação em ciências animais da UnB, pelos conhecimentos transmitidos. Muito obrigado!

Aos pesquisadores da EMBRAPA-CERNARGEN pela confiança e pelos conhecimentos passados. Muito obrigado!

A todos os funcionários da Fazenda Sucupira, pelas ajudas quando mais precisei. Muito obrigado!

A todos os outros amigos do curso de Mestrado em Ciências animais e de fora dele, que de algum modo contribuíram para a minha formação pessoal. Muito obrigado!

Ao frigorífico Qualimax por ceder material biológico para a realização desse experimento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos animais, por tornarem o trabalho uma fonte de estímulo, alegria e força. Muito obrigado!

ÍNDICE

	PÁGINAS
RESUMO	X
ABSTRACT	XII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XIV
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	XVI
CAPÍTULO 1	XVIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HIPÓTESE	2
1.2 OBJETIVO GERAL	2
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 CONGELAMENTO CLÁSSICO DOS EMBRIÕES BOVINOS	4
2.2 - EFEITO DO SORO FETAL BOVINO E DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS	11
2.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2: EFEITO DA FONTE PROTÉICA NA PRODUÇÃO, QUALIDADE E CRIORESISTÊNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO	36
RESUMO	37
ABSTRACT	39
1- INTRODUÇÃO	41
2- MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 RECUPERAÇÃO E SELEÇÃO DOS OVÓCITOS	44
2.2 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	44
2.3 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	45
2.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	45
2.5 CONGELAMENTO DOS EMBRIÕES PELO MÉTODO CLÁSSICO	45
2.6 DESCONGELAMENTO E CULTIVO PÓS CRIOPRESERVAÇÃO	45
2.7 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA	46
2.8 EXTRAÇÃO DO RNA E PRODUÇÃO DO CDNA	46
2.9 AVALIAÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS E CÉLULAS APOPTÓTICAS	48
3 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DA FONTE PROTÉICA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS E NA RESPOSTA À CRIOPRESERVAÇÃO.	49
3.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA À CRIOPRESERVAÇÃO PELO CONGELAMENTO LENTO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO NA PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES PROTÉICAS QUANTO À EXPRESSÃO GÊNICA	50
4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51

5.1 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 1	51
5.2 RESULTADOS DO EXPERIMENTO 2	54
5.3 DISCUSSÃO	56
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

RESUMO

EFEITO DA FONTE PROTEICA NA PRODUÇÃO, QUALIDADE E CRIORESISTENCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

Severino Bernardino de Sena Netto¹, Ivo Pivato¹

¹ Faculdade de Agronomia e Veterinária- UnB, DF

Um dos fatores mais limitantes da produção in vitro de embriões (PIVE) é a criopreservação, pois além dos embriões serem mais sensíveis ao frio eles suportam melhor a vitrificação do que o congelamento lento. Mas a vitrificação requer a presença de um técnico especializado para a manipulação embrionária enquanto que o congelamento lento permite a transferência direta. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da substituição do SFB por BSA durante a maturação e cultivo embrionário na resposta à criopreservação utilizando o congelamento lento. Os CCOs obtidos de ovários de abatedouro foram distribuídos em 2 grupos: 1) controle: CCOs maturados e cultivados em meios suplementados com SFB, 2) CCOs maturados e cultivados em meios suplementados com BSA. Em D7 os embriões de cada grupo foram distribuídos em dois tratamentos, fresco e congelado. O experimento 1 avaliou o efeito da fonte proteica na PIVE e a resposta à criopreservação. Após o descongelamento os embriões foram avaliados às 24h e 48h quanto à expansão e eclosão. No experimento 2 foi quantificada a expressão dos genes KRT8, PLAC8, FOSL1, HSP1A1 e HSPA5 por qPCR e quanto ao número total de células e células apoptóticas. Os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e taxa de células apoptóticas foram realizados pelo teste χ^2 e número de células pela ANOVA e teste de Tukey. A taxa de clivagem foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos, entretanto a taxa de blastocisto foi maior ($P<0,05$) no grupo 1 ($42,8\pm 10,1\%$) do que no grupo 2 ($27,9\pm 8,5\%$). Às 24 horas pós-descongelamento o grupo SFB Fresco apresentou maior taxa de eclosão ($P<0,05$) do que os demais. Entretanto, as 48 horas, a taxa de eclosão foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos SFB Controle ($68,1\pm 23,3\%$) e BSA Controle ($70,0\pm 31,0\%$) e SFB Congelado ($39,2\pm 27,1$) e BSA Congelado ($38,2\pm 23,9$). Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos Frescos, e entre os grupos congelados quanto ao número total de células. A percentagem de células apoptóticas foi maior no grupo BSA Congelado do que grupo SFB Fresco, não diferindo ($P<0,05$) dos demais grupos. A expressão do gene KRT8 foi maior ($P<0,05$) no grupo SFB Congelado do que no BSA Congelado, mas foi semelhante ($P>0,05$) entre Congelados e Frescos dentro de cada grupo. O gene PLAC8 foi mais expresso no grupo BSA Fresco do que no grupo SFB Congelado ($P<0,05$). Pode-se

concluir que o uso de BSA em substituição ao SFB causou uma redução na produção de embriões, mas teve resposta semelhante na criopreservação. A expressão diferencial dos genes KRT8 e PLAC8 sugere que os embriões cultivados em BSA são de qualidade superior.

Palavras chave: Congelamento clássico, BSA, Viabilidade.

ABSTRACT

EFFECT OF PROTEIN SOURCE IN THE PRODUCTION, QUALITY AND CRYORESISTANCE OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO

Severino Bernardino de Sena Netto¹, Ivo Pivato¹

¹ School of Agronomy and veterinary Medicine - UnB, DF

One of the most limiting factors in vitro embryos (IVP) is cryopreservation, because besides the embryos are more sensitive to cold they support better vitrification than slow freezing. But vitrification requires the presence of a technical expert for embryo manipulation while slow freezing allows direct transfer. The objective of this study was to evaluate the effect of replacing SFB by BSA during maturation and embryo culture in response to cryopreservation using slow freezing. The COCs obtained from slaughterhouse ovaries were divided into 2 groups: 1) control: COCs matured and grown in media supplemented with SFB, 2) COCs matured and grown in media supplemented with BSA. D7 in the embryos of each group were divided into two treatments, fresh and frozen. Experiment 1 evaluated the effect of protein source in IVP and response to cryopreservation. After thawing the embryos were evaluated at 24 and 48 hours as the expansion and hatching. In experiment 2 was quantified the expression of genes KRT8, PLAC8, FOSL1, HSP1A1 and HSPA5 by qPCR and for the total number of cells and apoptotic cells. The χ^2 test and the number of cells performed the data relating to embryonic development and cell apoptotic rate by ANOVA and Tukey test. Cleavage rate was similar ($P > 0.05$) between groups, however blastocyst rate was higher ($P < 0.05$) in group 1 ($42.8 \pm 10.1\%$) than in group 2 ($27.9 \pm 8.5\%$). At 24 hours post-thaw SFB group Fresh showed the highest hatching rate ($P < 0.05$) than the others. However, the 48 hours, the hatching rate was similar ($P > 0.05$) between SFB Control groups ($68.1 \pm 23.3\%$) and BSA control ($70.0 \pm 31.0\%$) and Frozen SFB (39.2 ± 27.1) and BSA Frozen (38.2 ± 23.9). There was no difference ($P > 0.05$) between groups Fresh, frozen and between groups regarding the total number of cells. The percentage of apoptotic cells was higher in the Frozen BSA group than group SFB Fresh, did not differ ($P < 0.05$) from the other groups. The KRT8 gene expression was higher ($P < 0.05$) in Frozen FBS group than in BSA Frozen, but was similar ($P > 0.05$) between frozen and fresh within each group. The PLAC8 gene was more expressed in the BSA Fresh group than in the Frozen SFB group ($P < 0.05$). It can be concluded that the

use of BSA replacing FBS caused a reduction in embryo production, but had similar response in cryopreservation. The differential expression of KRT8 and PLAC8 genes suggests that embryos cultured in BSA are top quality.

Keywords: Classic Freezing, BSA, Feasibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura	Página
Capítulo 2	
1: A) Blastocistos Expandidos em D8 corado por Hoechst 33342, para contagem do número total de células e B) corado corados pelo TUNEL, para contagem do número de células apoptóticas.	44
2: Nível de transcritos dos genes KRT8, PLAC8, FOSL1, HSP1A1 e HSPA5 analisados por PCR em tempo real em embriões bovinos produzidos na presença de SFB ou BSA.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Capítulo 2	
Tabela 1. Informações para primers específicos utilizados para amplificação dos fragmentos de genes para análise em PCR em tempo real.	43
Tabela 2. Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos maturados e cultivados in vitro na presença de soro fetal bovino (SFB) ou na presença de albumina sérica bovina (BSA), no dia (D) 2 e 7 de cultivo.	47
Tabela 3. Avaliação do congelamento de embriões (D7) maturados e cultivados em diferentes sistemas in vitro na presença de soro fetal bovino (SFB) ou na presença de albumina sérica bovina (BSA), no dia (D) 8 e 9 de cultivo.	49
Tabela 4. Avaliação do número total de células e células apoptóticas de ovócitos bovinos maturados e cultivados in vitro na presença de soro fetal bovino (SFB) ou na presença de albumina sérica bovina (BSA) submetidos ou não submetidos ao congelamento clássico, no dia (D) 8 de cultivo.	50

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

μm = Micrômetro

μg = Micrograma

Be = Blastocisto eclodido

Bi = Blastocisto inicial

Bl = Blastocisto

Bx = Blastocisto expandido

BSA-FAF = Albumina sérica bovina livre de ácido graxo

CIV = Cultivo in vitro

CCO = Complexo Cumulus Oócito

EG = Etileno Glicol

FIV = Fecundação in vitro

FCS = Soro fetal bovino

FSHr = Hormônio folículo estimulante recombinant

LH = Hormônio luteinizante

MIV = Maturação in vitro

Mm = milímetro

ml = mililitro

N_2 = Nitrogênio

O_2 = Oxigênio

PBS = Solução salina em tampão fosfato

q-PCR = Reação em cadeia de polimerase em tempo real

PHE = Penicilamina, hipotaurina e epinefrina

PIVE = Produção in vitro de embriões

Pi = pós-inseminação

mRNA = Ácido ribonucleico mensageiro

SFB = Soro Fetal Bovino

SOF = Fluido sintético do oviduto com aminoácidos

TCM = Tissue culture medium

TE = Transferência de embriões

Capítulo 1

1 - INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro atingiu um total de 211 milhões de cabeças (IBGE 2015). De acordo com Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (2013), as projeções para o comércio de carnes, mostram que o setor deve apresentar intenso crescimento nos próximos anos. Confirmadas estas projeções, a cadeia produtiva da carne bovina terá uma ascensão pronunciada nos próximos anos. Entretanto, para que isso seja possível é necessário aumentar a produtividade do rebanho, o que requer a seleção de animais mais produtivos e o uso de técnicas de multiplicação que sejam rápidas e eficazes.

Apesar da produção de embriões in vivo ter favorecido um melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genético, somente com o surgimento da produção in vitro de embriões (PIVE) é que esse potencial de multiplicação se tornou significativo, isso porque a técnica permite que seja produzida, em média, uma cria por semana, de uma única doadora. Além de aumentar o número de produtos/vaca/ano, essa técnica também permite a utilização de animais de várias idades e em vários estágios fisiológicos como doadoras de ovócitos (Sprícigo 2011).

Essa técnica nos últimos anos passou a ser incorporada nos programas de melhoramento genético. Tanto que, segundo Blondin (2015) a produção mundial de embriões in vitro aumentou significativamente com o passar dos anos, e em 2013 os embriões PIVE representaram 42% do total de embriões produzidos em todo o mundo. Apesar disso, um dos fatores limitantes para a melhor utilização da técnica é falta de um método adequado para criopreservação dos embriões.

Isso porque a criopreservação nos permite o aproveitamento de receptoras com estro natural, além do transporte de embriões congelados ser menos oneroso e possibilitar a

programação de nascimentos adequada ao manejo de cada propriedade. Oferece ainda condições de armazenamento dos embriões enquanto se realiza teste de progênie, e possibilita a criação de bancos de embriões de animais geneticamente superiores ou em risco de extinção (Serapião et al., 2005). É importante observar que, em 2013, a América do Sul produziu 73% dos embriões PIVE enquanto sendo que apenas 5% dos embriões transferidos eram congelados (Blondin 2015).

Em vista disso, estratégias que superem esses problemas, em busca de resultados superiores e mais estáveis para criopreservação de embriões PIVE são necessárias para que tenhamos uma maior utilização da técnica, e conseqüentemente uma difusão mais rápida e eficaz de material genético.

1.1 Hipótese

A Albumina Sérica Bovina em substituição ao Soro Fetal Bovino durante a maturação e cultivo produz embriões com melhor qualidade e maior resistência ao processo de criopreservação.

1.2 Objetivo Geral

- Avaliar do efeito da fonte proteica durante o cultivo na produção e qualidade de embriões bovinos produzidos in vitro.

1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da fonte proteica durante o cultivo in vitro na produção de embriões bovinos
- Avaliar a resposta ao congelamento lento de embriões produzidos in vitro na presença de diferentes fontes proteicas quanto a taxa de reexpansão, número total de células e número de células apoptóticas.

- Avaliar a expressão de genes relacionados ao estresse térmico e viabilidade embrionária em embriões bovinos produzidos in vitro na presença de diferentes fontes proteicas e criopreservados pelo método lento.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Congelamento clássico de embriões bovinos

2.1.1- Introdução

A publicação de Polge et al. (1949) na revista Nature relatando sucesso na congelação de espermatozoides, originou uma gama de estudos na área de criopreservação, que tornou possível a conservação de embriões e células germinativas por períodos indeterminados. O primeiro relato de sobrevivência de embriões mamíferos ao processo de criopreservação foi obtido por Whittingham em 1971, utilizando embriões de camundongos. Posteriormente, diversas pesquisas foram realizadas com sucesso em diferentes espécies, o que resultou no primeiro nascimento de bezerro proveniente de embrião criopreservado (Wilmot & Rowson, 1973). A partir daí a criobiologia se desenvolveu paralelamente aos avanços das pesquisas relacionadas a transferência e produção *in vivo* e *in vitro* de embriões, sofrendo modificações graduais até ser usada como rotina (Mezzalira & Vieira, 2006).

A criopreservação de embriões tem por objetivo a conservação do metabolismo celular em estado de quiescência, para que este possa ser restabelecido após um período de estocagem, retomando seu desenvolvimento normal. Isso é obtido através do armazenamento em baixas temperaturas, que induz a parada da atividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular, possibilitando a conservação de células por tempo indeterminado (Gordon, 1994). Em temperaturas abaixo de -130 °C, o cristalino e o vítreo são os únicos estados físicos existentes e, em ambos, a viscosidade é bastante elevada, a difusão é considerada irrelevante (dependendo do tempo de armazenamento), a energia cinética das moléculas é muito baixa e as reações metabólicas estimuladas por energia térmica ocorrem muito devagar ou são

paralisadas completamente (Kantha, 1985). Desta forma, estando à temperatura do nitrogênio líquido, a viabilidade durante o armazenamento pode ser estendida por grandes períodos de tempo, com manutenção da estabilidade do material genético (Stushnoff & Seufferheld, 1995).

Atualmente, existem dois métodos para a criopreservação de embriões e gametas: o congelamento lento (clássico) e a vitrificação. O congelamento lento tem a vantagem de utilizar baixas concentrações de crioprotetores, as quais estão associadas com toxicidade química e choque osmótico (Arav 2014). Este método pode ser interpretado como uma tentativa de criar um balanço entre vários fatores que determinam a formação de cristais de gelo, fraturas, danos tóxicos e osmóticos, permitindo trocas entre os meios extra e intracelular sem que ocorram sérios efeitos osmóticos e deformidades celulares (Vajta & Kuwayama, 2006). A maioria dos embriões mamíferos é criopreservada através do congelamento lento, utilizando-se baixas concentrações de crioprotetores com lenta permeabilidade e refrigeração controlada por equipamento programável (Vajta & Nagy, 2006). Além disso, a queda da temperatura é controlada mantendo uma curva constante entre 0,3 e 0,5 °C/minuto até atingir -30 à -35 °C, quando são imersos em nitrogênio líquido.

2.1.2- crioprotetores e princípios criobiológicos

Com raríssimas exceções em determinadas espécies, a temperatura do corpo dos mamíferos é estritamente regulada, onde resfriamento de ovócitos e embriões de animais domésticos e seres humanos a temperaturas abaixo de zero é uma situação que nunca se encontra em condições fisiológicas. Por conseguinte, o mecanismo de defesa para sobreviver nessas condições é inadequado e necessita de apoio externo (Vajta & Nagy, 2006). Desta forma, a capacidade de sobrevivência do material biológico ao processo de criopreservação depende de sua tolerância aos agentes crioprotetores, desidratação, resfriamento e reaquecimento (Santos et al., 2008).

Os crioprotetores proporcionam a redução do ponto de congelação do meio, concedendo um período maior para remoção da água intracelular durante todo o resfriamento prévio. Esses possuem ainda a capacidade de interagir com as membranas celulares, contribuindo para a sobrevivência ao estresse provocado pelas mudanças físicas. Em adição, tais substâncias têm a capacidade de proteger os embriões contra as lesões causadas pela elevação das

concentrações dessas soluções, no processo de formação do gelo, durante o resfriamento (Seidel jr. 1986).

Os crioprotetores podem permanecer no interior ou fora da célula e são classificados em permeáveis e não permeáveis. Os permeáveis representam pequenas moléculas que penetram pela membrana celular que atuam diminuindo a temperatura de congelação e prevenindo a formação dos cristais de gelo. Como exemplo temos o propilenoglicol, glicerol, etilenoglicol, dimetilssulfóxido (DMSO), entre outros (Vajta & Nagy, 2006). Já os crioprotetores não permeáveis são representados por moléculas que permanecem no meio extracelular, retirando a água livre e levando à desidratação do espaço intracelular por efeito osmótico (Vajta & Nagy, 2006; Pereira & Marques, 2008), sendo representados pela glicose, lactose, sacarose, PVP, rafinose, manitol, sorbitol, trealose, dentre outros. Porém, a grande maioria dos crioprotetores tem alguns efeitos negativos, como toxicidade e danos osmóticos. A toxicidade é geralmente proporcional à concentração da substância e o tempo de exposição (em temperaturas fisiológicas) (Vajta & Nagy, 2006).

Os principais danos causados a célula no congelamento e descongelamento são a formação de gelo intracelular e o efeito solução (Mazur 1980). Existe uma velocidade ótima no qual se obtém um equilíbrio entre a taxa à qual a água sai da célula e a taxa à qual ela é convertida em gelo. Se esta velocidade de congelamento for mais rápida que a ótima, a célula não tem tempo suficiente para desidratar, e conseqüentemente a água irá congelar no interior da célula. Os cristais de gelo formados irão ocupar os compartimentos intracelulares de forma irregular, podendo afetar a estrutura das membranas e organelas, prejudicando a função celular, dependendo da quantidade e forma dos cristais de gelo intracelulares e os danos podem ser irreversíveis (Mazur 1980). Se a velocidade de congelamento é mais lenta que a ótima ocorrerá uma severa desidratação e o chamado “efeito solução” causará uma redução da sobrevivência.

No congelamento lento, a formação de gelo intracelular pode ser evitada através de um resfriamento celular lento, que permite uma desidratação, onde a água intracelular restante é mantida em um potencial de equilíbrio junto a solução extracelular e o gelo formado (Mazur et al., 2005). Foram postuladas duas hipóteses para a formação de gelo intracelular. A primeira hipótese, postulada por Muldrey & McGann (1990), sugere que o gelo intracelular seja formado em consequência a danos ou defeitos existentes na membrana plasmática, que permitiriam que o gelo extracelular passasse através da membrana. Através do super-

resfriamento celular que ocorre durante a congelação, a força de efluxo da água para o meio extracelular atingiria um valor consideravelmente crítico, causando danos à membrana e permitindo a entrada do gelo extracelular para o meio intracelular. A outra hipótese é a de que o gelo do meio extracelular em contato com a membrana plasmática provocaria a formação de gelo intracelular, levando injúria ao conteúdo celular. Há duas explicações para esta segunda hipótese. Na primeira, Toner et al. (1990) propõem que o gelo extracelular provocaria uma mudança de conformação na membrana, que a transformaria em um nucleador heterogêneo dos conteúdos celulares. Na segunda explicação Mazur (2004), propõe que o gelo extracelular cresceria através de poros já existentes na membrana plasmática, e tal contato direto iria induzir à formação de gelo intracelular.

Outra causa de morte celular que pode acontecer durante o congelamento lento consiste no efeito solução, que envolve uma alteração no citoplasma como resultado da desidratação, aumento na concentração de soluto, alterações de pH, e precipitação de solutos (Mazur et al., 1984). Santos et al., (2008) através de uma revisão de estudos concluiu que os danos celulares causados pelo choque osmótico acontecem em consequência do tipo de agente utilizado e não à capacidade da célula gerenciar o choque osmótico. Da mesma maneira que os cristais de gelo podem lesionar membranas e organelas celulares durante o resfriamento dos embriões, outras crioinjúrias como a toxicidade química pelos crioprotetores e lesão osmótica pela desidratação insuficiente também podem ocorrer durante todo o processo de criopreservação.

O sucesso do congelamento lento é dependente da obtenção de um equilíbrio entre a taxa à qual a água sai da célula e a taxa à qual ela é convertida em gelo. No entanto, esta concentração é insuficiente para impedir a formação de cristais de gelo, sendo, portanto, necessário uma manipulação adicional para minimizar o dano. Assim sendo utiliza-se o procedimento de *seeding* (indução da cristalização) que resultará em crescimento controlado de gelo na solução extracelular.

Vários estudos realizados sobre criobiologia têm mostrado que o congelamento lento utilizando glicerol ou etilenoglicol como crioprotetores são mais eficientes para embriões de PIVE (Hasler et al., 1997; Sommerfeld & Niemann, 1999). Estudos com embriões produzidos *in vivo* têm mostrado que as taxas de não retorno ao cio após a transferência de embriões vitrificados (44,5%) não diferem dos criopreservados por congelamento lento (45,1%) (Van Wagendonk-De Leeuw et al., 1995, 1997).

O congelamento lento é utilizado em todo o mundo para embriões de bovinos, ovinos e caprinos produzidos *in vivo*, resultando em taxas de gestação aceitáveis quando comparado a vitrificação (Almiñana & Cuello 2015). Tanto o congelamento lento (Fair et al., 2001; Dancin et al., 2013) como a vitrificação (Fabian et al., 2005; Cuello et al., 2007; Dalcin et al., 2013; Chrenek et al., 2014) causam mudanças ultraestruturais nos embriões, tais como a acumulação de detritos celulares, aumento de vesículas e mudanças nas microvilosidades. A criopreservação também induz a distribuição anormal de mitocôndrias (Nagai et al., 2006), alterações na forma mitocôndrial e ruptura das suas membranas (Cuello et al., 2007). Apesar de todas estas alterações morfológicas ocorridas a nível celular, o embrião é capaz de se regenerar e impedir a morte celular. Neste caso, a morfologia normal do embrião pode ser quase completamente restabelecida após 24h de cultivo não afetando a sua viabilidade (Vajta et al., 1997).

Ambos os tipos de congelamento afetam a integridade do DNA (Cuello et al., 2005, Fabian et al., 2005, Kader et al., 2009). Considerando-se que o aumento da fragmentação de DNA em embriões criopreservados é, em parte, causada por um excesso de radicais livres, a adição de antioxidantes aos meios de comunicação poderia reduzir este efeito (Hosseini et al., 2009). A maioria dessas alterações estão relacionadas à homeostase, metabolismo e regulação das atividades celulares e fisiológicas, tais como a proliferação celular, ciclo celular, de desenvolvimento, biossíntese, respiração e expressão de genes relacionados ao estresse (Boonkusol et al., 2006; Mamo et al., 2006; Stokes et al., 2007).

Ao comparar os resultados destes métodos de criopreservação baseado na origem de embriões, ou seja comparando os embriões PIVE e embriões produzidos *in vivo* (TE), os embriões TE mostraram taxas de gestação semelhantes (variando entre 39% e 59%) para ambos os procedimentos de congelamento lento e de vitrificação (Massip de 1987; van Wagendonk-de Leeuw et al., 1997; Inaba et al., 2011). Os melhores resultados para embriões PIVE (variando de 52% a 100% de reexpansão e a partir de 36% a 93% de taxa de eclosão) foram conseguidos utilizando a vitrificação (Nedambale et al., 2004; Mucci et al., 2006; Yu et al., 2010; Inaba et al., 2011). Já foi demonstrado que os embriões de PIVE tem uma maior sensibilidade para as técnicas de criopreservação do que os TE (Leibo e Loskutoff, 1993) com base nesta comparação, os embriões destas duas origens demonstraram que não sobrevivem igualmente aos diferentes métodos de criopreservação (revisado por Sudano et al., 2013).

2.1.3- Vantagens

A criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (PIVE) é essencial para a instituição de bancos de germoplasma de animais de produção ou de conservação e principalmente para a troca e comercialização nacional e internacional de genética, evitando o transporte de animais e seus riscos sanitários (Dode & Sprícigo 2014). Além disso, a criopreservação tornou-se particularmente importante no desenvolvimento do comércio internacional de embriões, uma vez que somente estruturas congeladas sob determinadas condições podem ser comercializadas (Mapletoft & Stookey, 1998).

A criopreservação facilita a coordenação da indústria de embriões, pois permite armazenar os embriões excedentes para serem utilizados no momento e situação mais adequada, elevando ainda mais o potencial dessa técnica, pois atualmente, são descartados muitos embriões PIVE, pois os resultados da criopreservação são muito inconstantes e isso leva a perda de material genético e de recursos gastos na produção.

Na prática, os protocolos de congelamento lento geralmente utilizam um único crioprotetor, enquanto vitrificação envolve o uso de misturas de dois crioprotetores em combinação com um açúcar (Palasz e Mapletoft, 1996; Kasai e Mukaida, 2004). Devido a vitrificação requerer altas concentrações de crioprotetores, a toxicidade é uma questão importante a considerar quando se trata de melhorar protocolos de vitrificação, podendo esta alta concentração conduzir a toxicidade química e lesão osmótica. O congelamento lento utiliza baixas concentrações de crioprotetores, entretanto permite a formação de cristais de gelo, que em maior ou menor escala resultarão em lesões celulares. Embora as células refrigeradas desta forma ainda tenham um pouco de água no momento em que são imersas em nitrogênio líquido, esta água intracelular não é suficiente para causar danos, desde que os protocolos adequados de aquecimento sejam utilizados (Visintin et al., 2002). Este método é bastante utilizado principalmente pela facilidade de descongelamento e transferência direta dos embriões para as receptoras na mesma palheta no qual foram congelados (Dode e Spricigo, 2014). Isto facilita significativamente a tecnologia de transferência de embriões, pois reduz o tempo requerido para preparar os embriões para serem transferidos excluindo a necessidade de equipamentos especiais (Palasz & Mapletoft, 1996).

Tanto os ovócitos quanto os embriões sofrem danos significativos durante o processo de resfriamento e aquecimento. No entanto, eles também têm uma considerável capacidade,

muitas vezes, surpreendente para reparar parcial ou totalmente este dano, e na melhor das hipóteses para continuar o desenvolvimento normal.

Assumpção et al., (2008) compararam a sobrevivência de embriões PIVE criopreservados através do congelamento lento, congelamento rápido e vitrificação, observaram maiores taxas de sobrevivência embrionária 96h após o descongelamento utilizando o congelamento lento com 0,5 °C /min (58,8%) quando comparado 2 diferentes protocolos de vitrificação (14% e 36,8%) e congelamento rápido (7,02%) concluindo que este é o melhor método para criopreservar embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Ao contrário dos procedimentos de congelamento lento e vitrificação, protocolos de descongelamento e aquecimento são muito semelhantes, utilizando os dois deles taxas de calor muito altas. Tipicamente, os recipientes de embriões são removidos a partir de nitrogênio líquido e os embriões são colocados em soluções com concentrações decrescentes de sacarose (ou outro açúcar) permitindo a saída dos crioprotetores dos embriões através da produção de um gradiente osmótico. Hoje, o desenvolvimento de métodos de descongelamento e aquecimento diretos e eficientes que permitam a transferência direta dos embriões sem remoção dos crioprotetores é essencial para a utilização de embriões criopreservados em condições de campo (Almiñana & Cuello 2015)

Apesar da PIVE ser considerada uma técnica estabelecida, ainda continua enfrentando um fator limitador, que é a alta sensibilidade dos embriões ao processo de criopreservação. Embriões PIVE são menos resistentes à criopreservação do que os *in vivo*, o que tem sido associado às diferenças nas características físicas e morfológicas desses embriões (Abe et al., 2002). Nos últimos anos as estratégias de criopreservação são basicamente baseadas na velocidade da curva de congelação e o tempo de exposição aos crioprotetores. Porém oferecem resultados insatisfatórios, sendo necessárias mais pesquisas sobre os mecanismos que causam danos durante a criopreservação ou que melhorem a qualidade dos embriões produzidos.

Os esforços para melhorar as taxas de sobrevivência de embriões PIVE se restringem basicamente à modificações nos métodos de criopreservação e modificações nos sistemas de cultivo para tornar os embriões mais criotolerantes. Em vista disso, pesquisas básicas ainda se fazem necessárias para determinar as estruturas, as vias metabólicas e os mecanismos moleculares mais afetados pela criopreservação. Esse conhecimento é importante para a definição de condições de cultivo que levem em consideração as mudanças necessárias para o

desenvolvimento embrionário saudável e que suportem melhor o processo de criopreservação (Dode et al. 2013).

Até o momento, ainda não foi estabelecido um protocolo ideal de criopreservação para embriões sendo necessárias pesquisas preliminares para cada espécie de interesse e características do embrião para selecionar as condições de criopreservação mais adequadas (Almiñana & Cuello, 2015).

2.2 - Efeito do soro fetal bovino e da albumina sérica bovina na criopreservação de embriões bovinos

Historicamente, os meios de cultivo mais utilizados para o desenvolvimento de embriões de mamíferos são suplementados com SFB ou albumina, na forma BSA ou albumina sérica humana (HSA) (Bavister et al., 1992; Gardner e Lane, 1993). Assim, o SFB e a BSA são as fontes proteicas mais comumente utilizadas na suplementação de meios de cultivo para a produção in vitro de embriões bovinos (Mingoti, 2000). São utilizadas geralmente por promover efeitos benéficos durante o desenvolvimento embrionário com a suas propriedades de ligação, dessa forma protegendo contra componentes tóxicos presentes nos meios de cultivo (Flood e Shirley, 1991). Também possuem capacidade de quelar metais pesados e equilibrar o pH (Mehta & Kiessling, 1990) e propriedade surfactante que atua prevenindo a adesão de células a superfícies plásticas e de vidro (Bavister, 1981; Pinyopumintr & Bavister, 1994).

O SFB é acrescido aos meios de maturação e cultivo embrionário, pois proporciona maiores taxas de produção de blastocistos (Leivas et al., 2010). Apesar da suplementação proteica com SFB ser benéfica ao desenvolvimento ovocitário e embrionário in vitro, impossibilita as pesquisas relativas as necessidades nutricionais do ovócito e do embrião durante as fases de desenvolvimento, pois ele é composto por uma variedade de substâncias indefinidas, incluindo os ácidos graxos, fatores de crescimento, substratos energéticos, aminoácidos e vitaminas, com concentrações variáveis dependendo do lote, remessas e fornecedores (Tetzner 2007). A presença de componentes indefinidos no sistema de cultivo dificulta os estudos para determinar o papel que certas substancias ou fatores de crescimento no desenvolvimento embrionário precoce. Meios de cultivo isentos de SFB são necessários não

só para estudar os mecanismos de desenvolvimento embrionário, mas também para a produção de embriões de boa qualidade para transferência, clonagem e transgenia (Gomes et al., 2008).

Vários estudos foram direcionados a substituição do SFB nos sistemas de cultivo *in vitro*, porém os resultados obtidos com estes substitutos têm sido insatisfatórios (Biggers et al., 1997; Nowshar et al., 2000), demonstrando que o desenvolvimento embrionário necessita de fatores encontrados no SFB ou no BSA para diferenciação e proliferação celular (Lim et al., 1999). De fato, análises dos blastocistos cultivados com PVA (Álcool Polivinílico) revelaram taxas reduzidas de metabolismo (Eckert et al., 1998) e conteúdo proteico (Thompson et al., 1998) comparado ao cultivo contendo BSA. Além do que, o PVA não se mostrou capaz de sustentar a reação acrossomal e a fecundação, em várias espécies estudadas (Bavister et al., 1992).

Ali e Sirard (2002) reportaram que o BSA afetou a maturação ovocitária, pois causou atraso no início da meiose, e também alterações no desenvolvimento embrionário, diminuindo a capacidade de desenvolvimento aos estádios de mórula e blastocisto, embora tenha sido observado efeito estimulatório a blastulação.

A utilização do SFB foi amplamente estudada e evidenciaram seu efeito sob a viabilidade do embrião e a variabilidade entre partidas que pode causar uma variação indesejável entre os resultados, além disso, o papel do SFB não seja completamente entendido, já foi demonstrado que este tem um efeito bifásico, pois inibe as divisões iniciais de clivagem e acelera o desenvolvimento de mórula a blastocisto (Gordon 1994; Lonergan et al., 1999).

Outro grande problema em se utilizar SFB na produção *in vitro* de embriões bovinos refere-se às barreiras sanitárias, por ser um produto derivado sanguíneo da própria espécie bovina, representa altos riscos de contaminação com uma série de componentes patogênicos, demonstrando ser um dos principais fatores limitantes na comercialização desses embriões (Tornesi et al., 1993; Milham et al., 1994).

Embriões produzidos em sistemas suplementados com SFB mostram alterações na sua ultraestrutura prejudicando a compactação, blastulação, perfis de expressão de mRNA e síndrome do bezerro grande com maior incidência de natimortos e mortes após o nascimento (Abe et al., 2002; Wreczycki et al., 2004). Dessa forma, pesquisas sobre substâncias que

exercem a mesma função na suplementação proteica, e que possam substituir o SFB nas etapas de maturação, fecundação e cultivo são necessárias.

Há também evidências que demonstram que a exposição prolongada ao SFB pode alterar significativamente tanto a morfologia quanto a bioquímica do embrião (Fair et al., 2001, Abe et al., 1999). O SFB causa efeitos adversos, como o acúmulo de lipídios (Sudano et al., 2010), mudanças na estrutura mitocondrial (Crosier et al., 2000), indução de apoptose (Sudano et al., 2010) e modificações na expressão gênica (Kuzmany et al., 2011). Estes achados ainda sugerem que o SFB pode estar envolvido em apoptose e fragmentação de blastômeros e possivelmente bloqueio no desenvolvimento do embrião (Garcia et al., 2015).

Embriões bovinos que foram fecundados *in vitro*, porém cultivados *in vivo* tiveram criotolerância semelhante aos embriões produzidos inteiramente *in vivo* (Rizos et al., 2002; Lonergan et al., 2003). Entretanto, os embriões produzidos completamente *in vitro* tiveram uma menor criotolerância (Rizos et al., 2002; Lonergan et al., 2003).

O teor de triglicerídeos de blastocistos produzidos *in vivo* é semelhante aos de blastocistos produzidos *in vitro*, na ausência de soro. Por outro lado, o teor de triglicerídeos de embriões cultivados com 10% de soro fetal bovino aumenta de forma constante a partir do estágio de 9/16 células, para um valor em blastocistos eclodidos quase o dobro em condições isentas de soro (Ferguson et al. 1999). Estes resultados indicam que a presença de SFB induz uma excessiva síntese e acumulação de triglicerídeos em embriões. A observação microscópica destes blastocistos obtidos em meio suplementado com SFB mostra excessiva acumulação de gotículas lipídicas, principalmente nas células do trofotoderma. Esta diferença morfológica sugere que o acúmulo exacerbado de lipídios causa a sensibilidade de embriões derivados de meios suplementados com SFB após a criopreservação (Gomes et al., 2008).

Um dos fatores responsáveis pelo menor criotolerância dos embriões PIVE é o maior acúmulo intracelular de lipídeos e uma diminuição na densidade de mitocôndrias maduras quando comparados aos embriões *in vivo* (Crosier et al., 2001; Farin et al., 2004). De acordo com Seidel jr (2006), um possível mecanismo para a redução desta criotolerância dos embriões PIVE é a peroxidação dos lipídios, que é aumentada pelo processo de criopreservação, resultando num aumento dos radicais livres resultantes da deterioração de lipídios poli-insaturados (Beitz, 1996). Com isso, a elevação do conteúdo lipídico nos embriões pode exacerbar a produção de radicais livres estimulando o processo de morte embrionária (Barceló-Fimbres & Seidel jr, 2007).

Outra explicação possível é que o uso do SFB pode promover a incorporação de ácidos graxos saturados e colesterol na membrana embrionária, deixando-a menos permeável e mais rígida, resultando em grande susceptibilidade do embrião PIVE frente à criopreservação (Barceló-Fimbres & Seidel JR, 2007). Estudos anteriores sugeriram que os mecanismos moleculares envolvidos na redução da síntese de lipídios são devidos a redução na expressão de mRNA de enzimas lipogênicas importantes associadas com a síntese de gordura (Baumgard et al., 2002; Gervais et al., 2009).

Estudos mostram que genes relativos ao metabolismo de lipídeos são mais expressos nos embriões in vivo que nos in vitro (Gad et al., 2012). Tais resultados sugerem que esses embriões podem ser incapazes de utilizar os lipídeos internos para a produção de ATP, o que poderia ser devido a uma insuficiente atividade mitocondrial. Isso explicaria outras diferenças morfológicas, como o citoplasma mais escuro observado nos embriões PIVE (Dode et al., 2013).

Desta forma, mudanças nas técnicas de criopreservação não são suficientes para melhorar as taxas de sobrevivência pós-descongelamento, havendo necessidade também de alterações na composição dos meios de cultivo embrionário de embriões PIVE para que se desenvolvam sem um exacerbado acúmulo lipídico intracelular (Leibo & Loskutoff, 1993).

Atualmente, diversos laboratórios já eliminaram o soro do cultivo embrionário, principalmente quando a finalidade é a criopreservação (Dode et al., 2013). Um estudo realizado por Leme (2008) comparou o cultivo embrionário na presença de SFB e de BSA. A taxa de eclosão a 48 h após a vitrificação só foi maior nos embriões cultivados em BSA do que naqueles do SFB quando blastocistos de D6,5 e D7,5 foram vitrificados.

Collado et al., (2015) observaram que a migração inadequada de mitocôndrias e gotículas lipídicas em meios suplementados com SFB, após a fertilização in vitro poderiam afetar não só as taxas de desenvolvimento, mas também o acúmulo de lipídios. Além disso, mostraram que a diminuição da concentração de SFB a 5% pode ser uma alternativa interessante, pois permitiu a redução do acúmulo de lipídios nos embriões sem afetar adversamente a maturação de ovócitos e desenvolvimento embrionário.

Mudanças na técnica de criopreservação permitem uma melhora até certo ponto, mas é indispensável mudanças no próprio embrião para melhorar a sensibilidade à criopreservação (Seidel jr, 2006). Com este objetivo, várias estratégias foram desenvolvidas, como o uso de

agente lipolíticos [forskolin (Paschoal et al., 2012), etossulfato de fenazina (Sudano et al., 2011), L-carnitina (Takahashi et al., 2003)], antioxidantes (Breininger et al., 2005; Feugang et al., 2004; Paudel et al., 2010; Hosseini et al., 2009), ácido linoleico conjugado (Hochi et al., 2003), aumento de pressão hidrostática (Siqueira Filho et al., 2011) e utilização de meios isentos de SFB (Abe et al., 2002).

Por outro lado, este excesso de lipídios citoplasmáticos em embriões bovinos pode ser reduzido através da utilização de meios de cultivo isentos de soro fetal bovino (Abe et al., 2002), pois embriões cultivados em sistemas livres de soro têm uma redução no acúmulo de gotas de lipídeos citoplasmáticos e conseqüentemente maior resistência à criopreservação (Pereira & Marques, 2008).

Muitos dados são sugestivos de que a redução na criotolerância parece estar associada às modificações nas condições de cultivo embrionário bem como a quantidade de lipídios nos embriões produzidos. Mudanças na técnica de criopreservação permitem uma melhora até certo ponto, mas é indispensável mudanças no próprio embrião para melhorar sua resistência à criopreservação (Seidel jr., 2006).

A substituição do SFB por BSA tem um efeito dramático sobre crio-resistência dos embriões, resultando em um nível intermediário entre os embriões produzidos *in vitro* através da suplementação com SFB e aqueles produzidos *in vivo* (Rizos et al., 2003). Além disso, pode ser associado a outras estratégias para produção de embriões mais crio-resistentes. Accorsi et al., (2015) obteve melhores resultados de sobrevivência a criopreservação, utilizando embriões que foram cultivados em meios suplementados com BSA e ácido Linoléico quando comparado ao grupo controle, demonstrando que a BSA pode ser utilizada em associação a outras estratégias quando o objetivo final é a criopreservação dos embriões produzidos.

2.3 - Avaliação da qualidade embrionária

Houveram muitos avanços com relação a produção de embriões *in vitro* nos últimos anos, porém os índices de prenhez em bovinos ainda são inferiores para embriões PIVE quando comparados aos produzidos *in vivo*, resultando em um aumento no custo desta biotécnica (Pontes et al., 2009; Pontes et al., 2011). Possivelmente estes baixos índices ocorrem em conseqüência à menor qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* (Hasler et al., 1995;

Concoran et al., 2006. Hansen et al., 2010) associada à incapacidade de seleção e transferência de apenas os embriões com maior potencial de gerar uma gestação.

Embriões mamíferos no estágio de pré-implantação de espécies diferentes são muito semelhantes e, no entanto, ao mesmo tempo muito diferentes, quando inspecionados através de um microscópio estereoscópico binocular (Van Soom et al., 2003). Antes da fase de blastocisto eclodido, todos eles são constituídos por uma zona pelúcida, um espaço perivitelino e o embrião propriamente dito, mas após uma inspeção mais próxima pode-se perceber que eles diferem na forma e espessura da zona pelúcida, na translucidez/opacidade de blastômeros e na quantidade de fragmentação citoplasmática. Estas diferenças não são apenas óbvias entre espécies, mas, mesmo dentro da mesma espécie, onde a morfologia do embrião pode ser influenciada pela origem embrionária (in vivo contra in vitro) e por condições de cultivo (Van Soom & de Kruif, 1992; Thompson, 1997; Abe et al., 1999; Holm et al., 2002).

É importante acrescentar, que por melhor que seja o método de seleção este é apenas um fator não podendo esquecer que o ambiente uterino é tão importante quanto à qualidade do embrião para o estabelecimento e manutenção de uma gestação. Em vista disso, a avaliação da qualidade do embrião é um elemento determinante para o sucesso da PIVE, pois a seleção e a transferência daqueles de melhor qualidade aumenta a taxa de prenhez, reduzindo os custos e melhorando o aproveitamento de receptoras. (Carvalho & Dode 2014).

2.3.1 - Apoptose

A palavra apoptose (do grego *apo*: separação, *ptôsis*: queda) foi designada em analogia ao fenômeno natural das folhas caírem das árvores ou das pétalas caírem das flores, sendo adotada pela primeira vez na década de 70 designando a forma fisiológica da morte celular (Kerr et al., 1972; Tilly et. al., 1996). Acredita-se que nos embriões, o objetivo deste mecanismo seja a eliminação de algumas células que impedem o potencial de desenvolvimento do trofotoderma e que também possam ser letais para o embrião (Hardy, 1997). Entretanto, um número mínimo de células saudáveis da massa celular interna é necessário para que ocorra a continuidade do desenvolvimento embrionário (Hardy, 1997).

O processo de apoptose surge através da ativação de enzimas específicas e transcrição de genes que desencadeiam um processo de autodigestão regulada por proteases endógenas. Esta

forma de morte celular tem por objetivo a remoção de células lesadas, infectadas, senescentes ou que simplesmente perderam a função no organismo, sem alteração do microambiente celular e livre de inflamação (Tilly et. al., 1996). Embriões de camundongos que foram coletados no estágio de blastocisto desenvolveram-se normalmente mesmo demonstrando boa parte de suas células em apoptose, fortalecendo a ideia de que o processo de apoptose é importante para a manutenção do desenvolvimento destes embriões (Hardy, 1997).

Durante o cultivo *in vitro* a apoptose também pode ser causada pelas condições subótimas do mesmo, e pode ser utilizada como um critério funcional da qualidade embrionária (Makarevich & Markkula 2002). Uma das mudanças peculiares do apoptose é a fragmentação do DNA (Hardy, 1997) a qual pode ser detectada utilizando o teste de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated - UTP nick end - labeling), em que as porções de DNA fragmentadas ou quebradas das células embrionárias são marcadas com d-UTP - fluorescente indicando as células em apoptose (Carvalho & Dode, 2014).

Vários parâmetros já foram correlacionados com a capacidade dos embriões sobreviverem à criopreservação, no qual foi observado que o grau de células apoptóticas apresentou a maior correlação do que o conteúdo de lipídeos (Sudano et al., 2012), reforçando sua utilização como critério para avaliação da qualidade embrionária.

Recentemente, a avaliação de células apoptóticas pelo teste TUNEL é utilizada em associação com a avaliação do potencial de desenvolvimento embrionário. Isto pode ser feito por meio da utilização de antígeno nuclear para a proliferação celular (PCNA), um marcador específico do ciclo celular para identificar células em divisão (Markkuda et al., 2001; Kere et al., 2013).

2.3.2 - Expressão Gênica

A análise de expressão de genes é um instrumento importante utilizado para qualificar os embriões em seus diferentes estágios de desenvolvimento. Vários genes já foram identificados e são utilizados como relacionados com a qualidade dos embriões em bovinos (Rizos et al., 2002; Gutiérrez-Adán et al., 2004; Lonergan et al., 2006; Orozco-Lucero et al., 2014). Muitas diferenças importantes dos embriões produzidos *in vitro* estão relacionadas aos aspectos moleculares, e estudos têm mostrado que esses embriões também são diferentes na expressão de genes importantes para o seu desenvolvimento (Mundim et al., 2009; Machado et al., 2013). Essas diferenças são detectadas, principalmente, com a utilização de estudos do

transcriptoma bovino que apresentaram genes diferencialmente expressos entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Clemente et al., 2011; Mamo et al., 2011).

Existe uma grande quantidade de informações fornecidas pelos estudos de transcriptoma referente ao padrão normal e alterado de genes comprovadamente envolvidos na qualidade embrionária. Diversos estudos têm relatado a existência de diferenças entre a abundância relativa de alguns genes importantes para o desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto e que poderiam explicar a diferença observada na qualidade dos embriões PIVE (Rizos et al., 2002; Lonergan et al., 2006; Mundin et al., 2009; Machado et al., 2013). Com esses valores de expressão é possível a criação de um padrão transcricional que seja específico para embriões que apresentem potencial ou não de gerar um prenhez (Carvalho & Dode 2014).

O transcriptoma pode ser analisado pela técnica de microarranjo, que consiste em uma lâmina contendo milhares de genes, e o RNA/cDNA da amostra é marcado e hibridizado nesta lâmina e, a análise computacional da fluorescência fornece a informação sobre o padrão de expressão de RNA das células que foram analisadas (Carvalho & Dode 2014). A outra estratégia é o sequenciamento (RNA seq), em que ao invés de utilizar a hibridização na lâmina para se obter informação das moléculas de RNA, as amostras são sequenciadas diretamente e a sequência dos transcritos são comparadas a um genoma tido como referência (Malone & Oliver, 2011). No entanto, ainda não se tem dados suficientes do padrão de expressão de genes em blastômeros ou células embrionárias para que se possa estabelecer um sistema de seleção de embriões com alta ou baixa qualidade (Carvalho & Dode 2014). Geralmente a escolha dos genes a serem avaliados nesse tipo de estudo, é baseada no transcriptoma dos embriões de alta e baixa qualidade.

Têm sido também detectado que genes relacionados ao metabolismo de lipídios estão mais expressos nos embriões *in vivo* e menos expressos nos *in vitro* (Gad et al., 2012). Esses resultados sugerem que os embriões PIVE podem apresentar incapacidade de utilizar os lipídios internos para a produção de ATP, o que poderia ser devido à atividade inadequada das mitocôndrias. Isso também explicaria outras diferenças morfológicas, como o citoplasma mais escuro observado nos embriões PIVE (revisado por Dode & Sprícigo 2014)

2.3.2.1 - Gene FOSL 1

FOSL 1 ativa o Fator de transcrição da proteína 1 que está relacionada a uma variedade de processos celulares incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (Young & Colburn 2006). Além disso, regula uma rede de genes relacionados ao controle da invasão celular em uma variedade de sistemas biológicos (Renaud et al., 2014).

FOSL 1 atua na via de sinalização de PI3K/AKT, que é responsável pelo desenvolvimento de linhagens de células do trofoblasto que são essenciais para estabelecer a relação materno-fetal em humanos (Kent et al., 2011). Além disso, pode ter um papel na regulação da invasão do trofoblasto em espécies que apresentam placentação hemocorial (Citado por Leme et al., 2015).

A adesão das células endoteliais a matriz extracelular é mediada através das integrinas, que demonstraram ser bastante necessárias durante os processos tanto angiogênicos quanto vasculogênicos (Malinin et al., 2012). A interação de células endoteliais com a matriz extracelular é essencial para a proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais (Stupack & Cheresh 2004), além disso, é também necessária para a organização e diferenciação dos tecidos (Malinin et al., 2012).

Ao nível morfológico observou-se que, enquanto as células do grupo controle apresentaram um citoesqueleto de actina regularmente organizado em feixes paralelos, já o silenciamento do FOSL1 induziu um alto grau de desorganização do citoesqueleto de actina, quando comparado a um grupo controle (Evellin, 2013). Embriões que apresentaram knockout para FOSL1 morrem devido a defeitos vasculares em tecidos extraembrionários e como resultados de defeitos na placenta devido à montagem incorreta das células endoteliais (Schreiber et al., 2000).

Leme et al., (2015) realizou em um estudo que descreveu o efeito da vitrificação no perfil molecular de embriões bovinos PIVE. O gene FOSL1 apresentou maior expressão em embriões vitrificados, propondo que a apoptose parece estar envolvida na resposta à vitrificação, pois o aumento dos níveis de transcritos de FOSL1 podem indicar um estímulo de uma resposta protetora ou que a apoptose pode ter sido induzida pela lesão das células.

2.3.2 .2 - Os Genes HSPS

As Heat Shock Protein (HSPs) são tradicionalmente classificadas pelo peso molecular. São expressas em todos os vertebrados e desenvolvem diversas funções em vários tipos de tecidos

em fases específicas do desenvolvimento e diferenciação ou induzidas por estresses ambientais (Franck et al., 2004). Elas estão implicadas no aumento da resistência celular ao estresse, na regulação da actina e na dinâmica dos filamentos intermediários (Toivola et al., 2011), inibição de apoptose (Wu et al., 2007) e desenvolvimento da placenta (Hemberger & Cross, 2001).

Diversas HSPs são expressas em células não submetidas ao estresse e desempenham funções importantes na fisiologia celular normal, promovendo a proteção celular contra efeitos deletérios do calor, prevenindo a desnaturação proteica (Kregel, 2002). Suas transcrições são aumentadas com o choque térmico e outros estímulos estressantes e constituem um indicador de estresse em embriões bovinos (Kiang et al., 1998). As HSPs podem estabilizar os efeitos negativos do ambiente como uma resposta ao estresse e, assim, aumentar, a proliferação/reparo celular e a sobrevivência embrionária, inibindo a apoptose e, conseqüentemente, prevenindo a morte celular. A indução da expressão de HSPs inicia poucos minutos após o princípio do estresse térmico, podendo seu pico de expressão ocorrer até diversas horas depois do procedimento (Citado por Sonna et al 2002).

A principal função da HSPB1 é promover termotolerância, crioproteção e auxiliar na sobrevivência celular sob condições de estresse. De fato, estudos recentes detectaram alteração na expressão desse gene em embriões vitrificados comparados com os embriões frescos (Leme 2008). O estresse térmico estimula um complexo programa de expressão e respostas bioquímicas adaptativas na célula. Estas respostas ao estresse celular são de grande interesse, pois biologicamente, a habilidade em sobreviver e se adaptar ao estresse térmico parece ser um requisito fundamental na vida celular. Todavia, existem diferentes caminhos químicos ativados por diferentes estressores, como a morte (sobrevivência e adaptação vs. apoptose) de células sequencialmente expostas a diferentes tipos de estresse parece depender criticamente da seqüência em que esses fatores são aplicados (Sonna et al., 2002) .

Trabalho conduzido por Oliveira et al., (2006) mostrou que diferentes fontes proteicas não necessariamente afetam a relativa abundância de HSP1A1. Indicando que suplementações proteicas podem não ser o fator crítico a contribuir para variação no conteúdo de mRNA entre os embriões derivados in vivo ou in vitro. As HSPs podem também ser afetadas por condições inadequadas de cultivo, sendo sua expressão facilmente induzida por uma variedade de agentes, incluindo aminoácidos análogos, calor e hormônios esteroides.

A identificação de genes HSP específicos que contribuam para a sobrevivência dos embriões pode ser uma oportunidade única para melhorar a proteção dos embriões PIVE de diferentes condições tóxicas, favorecendo a concepção e a manutenção da gestação (Zhang et al., 2011). O fato de embriões nos estádios de duas a quatro células serem mais susceptíveis a elevações de temperatura do que embriões no estágio de mórula deve-se, principalmente, à incapacidade destes embriões em sintetizar HSP1A1 como resposta ao estresse causado pelo calor (Kawarsky e King, 2001). A síntese das HSPs ocorre prematuramente no estágio de oito células devido à completa ativação do genoma embrionário (Ealy et al., 1993). Embriões de camundongos com knockout-HSPA5 morreram, demonstrando ser um gene importante para manutenção da gestação (Daugaard et al., 2007). Durante a janela de implantação, HSPA5 parece proteger as células contra os danos citotóxicos do TNF α (Khan et al., 2008; Chehna-Patel 2011).

2.3.2.3 - Gene PLAC 8

O gene PLAC8 foi chamado assim devido a proteína ser encontrada primeiramente na camada espongiotrofoblasto da placenta de mamíferos (Galaviz-hernandez et al., 2003). Em camundongos, é expressa em altos níveis nas células epiteliais do trato intestinal, no pulmão e em células do sistema imune incluindo macrófagos e granulócitos. A inativação do PLAC8 reduz a capacidade de fagocitar bactérias pelos neutrófilos, ou seja, diminui a imunidade inata (Ledford et al., 2007). O gene também está associado ao câncer em humanos (Mourtada-Maarabouni et al., 2013; Li et al., 2014).

Na PIVE bovina, o PLAC8 é um gene utilizado como marcador de qualidade embrionária (Gómez et al., 2009; Machado et al., 2011; Goovaerts et al., 2011). Já em animais domésticos, o gene PLAC8 ainda não tem sua função bem estabelecida, mas sabe-se que sua expressão está relacionada com o desenvolvimento da placenta (Galaviz-Hernandez et al. 2003; Klein et al., 2006) e exerce um papel na comunicação materno fetal (Gómez et al., 2009). Uma alta expressão desse gene foi relatada em blastocistos bovinos que tiveram sucesso na prenhez quando comparados com aqueles que foram reabsorvidos (El-Sayed et al., 2006) e no endométrio de vacas prenhes em relação as não prenhes (Klein et al. 2006). Diogénes (2015) sugeriu a adição de FGF10 durante a pré-MIV para melhorar a qualidade dos embriões bovinos, pois observou um aumento na expressão relativa do gene PLAC8 quando foi utilizado este procedimento.

2.3.2.4 - Gene KRT 8

A proteína queratina 8 (KRT8), pertence a um grupo de queratinas que são proteínas componentes dos filamentos intermediários predominantes nas células epiteliais. Elas promovem estabilidade mecânica às células, porém são estruturas capazes de responder rapidamente a estímulos celulares (revisado por Magin et al., 2007). O KRT8 tem um papel importante na formação do blastocisto e na sua subsequente implantação, pois é responsável pela formação do citoesqueleto no trofoectoderma. A expressão desse gene apresentou altos níveis na fase de blastocisto bovino estando com baixa expressão nos embriões com 2 células e mórulas (El-Halawany et al., 2005).

A proteína KRT8 é crítica para o desenvolvimento de embriões pós-eclosão (Maddox-Hyttel et al., 2003) e sua deficiência está associada com a morte de embriões de camundongo (Jaquemar et al., 2003). A baixa expressão desse gene também foi relatada em embriões oriundos de transferência nuclear (TN) quando comparados com embriões PIVE (Pfister-Genskow et al., 2005). Machado et al., (2011) avaliou a expressão desse gene em embriões PIVE no dia 14 de desenvolvimento, e relatou uma superexpressão desse gene em embriões fêmeas comparados aos machos. Já as biópsias de embriões do grupo que resultou em reabsorção no início da gestação, revelaram níveis elevados desse gene (Ghanem et al., 2011). Já para embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* não detectaram expressão diferencial do KRT8 nem em embriões de D7 nem de D14 (Machado et al., 2011).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H.. Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro-matured and -fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or serum-supplemented medium. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.325–335, 1999.

ALMIÑANA, C.; CUELLO, C. What is new in the cryopreservation of embryos? **Animal Reproduction**, v.12, p.418-427, 2015.

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.81, p.96-102, 2014.

ASSUMPCÃO, M.E.O.A.; MILAZZOTTO, M.P.; SIMÕES, R.; NICACIO, A.C.; MENDES, C.M.; MELLO, M.R.B.; VISINTIN, J.A.. *In vitro* survival of *in vitro*-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. **Animal Reproduction Science**, v.5, p.116-120, 2008.

BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL, G.E.JR. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on

embryonic development after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.1395-1405, 2007.

BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2155–2163, 2002.

BLONDIN P. Status of embryo production in the world. **Animal Reproduction**. V. 12, n.3, p.356-358,jul/sept. 2015.

BOONKUSOL, D.; GAL, A.B.; BODO, S.; GORHONY, B.; KITIYANANT, Y.; DINNYES, A.. Gene expression profiles and *in vitro* development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.700-708, 2006.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: Mapa/ACS, 96 p2013.

CHEHNA-PATEL, N.; WARTY, N.; SACHDEVA, G.; KHOLE, V. Proteolytic tailoring of the heat shock protein 70 and its implications in the pathogenesis of endometriosis. **Fertility and Sterility**. 95 (5), 1560,7–3. 2011.

CHRENEK, P.; MAKAREVICH, A.V.; POPELKOVÁ, M.; SCHLARMANNOVÁ, J.; TOPORCEROVÁ, S.; OSTRÓ, A.; ZIVČÁK, J.; BOSZE, Z. Ultrastructure of vitrified rabbit transgenic embryos. **Zygote**, v.22, p.558-564, 2014.

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morula e produced in vivo or in vitro. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1459–1365, 2000.

CUELLO, C.; BERTHELOT, F.; MARTINAT-BOTTÉ, F.; VENTURI, E.; GUILLOUET, P.; VÁZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E.A.. Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. **Animal Reproduction Science**, v.85, p.275-286, 2005.

CUELLO, C.; BERTHELOT, F.; DELALEU, B.; VENTURI, E.; PASTOR, L.M.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINAT-BOTTÉ, F.; MARTINEZ, E.A.. The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified-warmed porcine blastocysts: an ultrastructural and cell death study. **Theriogenology**, v.67, p.970-982, 2007a.

DALCIN, L.; SILVA, R.C.; PAULINI, F.; SILVA, B.D.; NEVES, J.P.; LUCCI, C.M. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. **Cryobiology**, v.67, p.137-145, 2013.

DAUGAARD, M., M. ROHDE, AND M. JÄÄTTELÄ. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS Lett.** 581:3702–3710. 2007.

DE OLIVEIRA LEME, L.; DUFORT, I.; SPRICIGO, J.F.W.; BRAGA, T.F.; SIRARD, M.A.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N.. Effect of vitrification using the cryotop method on the gene expression profile of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, 2015.

DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N.Z.; LOPES, F.L.; GASPAR, R.C.; PADILHA, L.C.; COSTA, R.R.; GARCIA, J.M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryo . **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.

DIÓGENES, M.N. Efeito do fator de crescimento de fibroblasto-10 na produção in vitro de embriões bovinos.86 p. Dissertação (mestrado). Universidade de Brasília. Brasília. 2015

DODE, M.A.N.; LEME, L.O.; SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.145-150, 2013.

DODE, M.A.N.; CARVALHO, J.O. Métodos para determinar a qualidade de embriões produzidos in vitro. **Spermova**, v.4(2), p.120-130, 2014.

DODE, M.A.N.; SPRÍCIGO, E J.F.W. CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO. **Spermova**, v.4, p.26 -32, 2014.

EALY AD, DROST M, HANSEN PJ. Physiology and management. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *Journal Dairy Science*, v.76, p.2899-2905, 1993.

FABIAN, D.; GJORRET, J.O.; BERTHELOT, F.; MARTINAT-BOTTE, F.; MADDOX-HYTTEL, P.. 2005. Ultrastructure and cell death of *in vivo* derived and vitrified porcine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, p.155-165, 2005.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTTEL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.186-189, 2001.

GARCIA, S.M.; MARINHO, L.S.R.; LUNARDELLI, P.A.; SENEDA, M.M.; MEIRELLES, F.V.. Developmental Block and Programmed Cell Death in *Bos indicus* Embryos: Effects of Protein Supplementation Source and Developmental Kinetics. **Plosone**, v. 10, n.3, 2015.

GERVAIS, R.; MCFADDEN, J.W.; LENGI, A.J.; CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y. Effects of intravenous infusion of trans-10, cis-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5167–5177, 2009.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. Walling-Ford: CAB International, 1994.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A.. Production,

freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p.141–152, 1995.

HASLER, J.F.; HURTTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; STOKES, J.E.. Survival of ivf-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. **Theriogenology**, v.48, p.563-79, 1997.

HOSSEINI, S.M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; ASGARI, V.; ABEDI, P.; HOSSEINI, L.; OSTADHOSSEINI, S.; MOULAVI, F.; SAFAHANI LANGRROODI, M.; SADEGHI, H.; BAHRAMIAN, H.; EGHBALSAIED, S.H.; NASR-ESFAHANI, M.H.. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.26, p.355-364, 2009.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal. [2016]. Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acesso em: 29/02/2016.

KADER, A.; AGARWAL, A.; ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R.K.; AHMADY, A.; FALCONE, T.. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. **Fertility and Sterility**, v.91, p.2087-2094, 2009.

KARTHA K.K. Meristem culture and germplasm preservation. Cryopreservation of plant cells and organs. **Boca Raton, FL: CRC Press**, 1985. p.115-134.

KASAI, M.; MUKAIDA, T.. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v.9, p.164-170, 2004.

KAWARSKY SJ, KING WA. Expression and localisation of heat shock protein 70 in cultured bovine oocytes and embryos. **Zygote**, v.9, p.39-50, 2001.

KHAN, K. N.; KITAJIMA, M.; IMAMURA, T.; HIRAKI, K.; FUJISHITA, A.; SEKINE, I.; ISHIMARU, T.; MASUZAKI, H. Toll-like receptor 4-mediated growth of endometriosis by human heat-shock protein 70. **Human Reproduction**, 23 (10), 2210–9. 2008.

KERE, M.; SIRIBOON, C.; LO, N.W.; NGUYEN, N.T.; JU, J.C.. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v.59, p.78-84, 2013.

LANE, M.; GARDENR, D. K.. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. **Human Reproduction**, v.13, p.991-997, 1998.

LANE, M.; GARDENR, D.K.. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1109-1117, 2003.

LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, N.M. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.81-94, 1993.

LEME LO. Efeito de diferentes fontes proteicas na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos in vitro. Brasília. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, 2008

LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; FIALHO, S.S.; SALIBA, W.P.; ALVIM, M.T.T.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.. Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos taurus indicus* embryos. **Theriogenology**. v.75, p.429–433, 2011.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M.P. Effect of protein supplementation and presence of antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, v.51, p.1565-76, 1999.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M.P.. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental

characteristics, sex and pregnancy rates following transfer of bovine preimplantation embryos. **Journal of Reproduction and Infertility**, v.117, p.159–167, 1999.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYE, A.M.; KINGSTON, M.; WADE, M.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v. 126, p. 337–346, 2003.

LONERGAN, P.. State-of-the-art embryo Technologies in cattle. **Society for Reproduction and Fertility**, v.64, p.315-325, 2007.

MACHADO, G. M.; CAIXETA, E. S.; LUCCI, C. M RUMPF. R.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N.. Post-hatching development of bovine embryos in vitro: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, p. 1-12, 2011.

MALININ, N.L.; PLUSKOTA, E.; BYZOVA, T.V.. Integrin signaling in vascular function. **Current Opinion in Hematology**, v.19, p.206–211, 2012.

MAMO, S.; BODO, S.; KOBOLAK, J.; POLGAR, Z.; TOLGYESI, G.; DINNYES, A.. Gene expression profiles of vitrified *in vivo* derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1380-1392, 2006.

MAPLETOFT R.J; STOOKEY J.M. Procedimentos sanitários gerais e considerações de bem estar associados com a produção in vivo de embriões. In: Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed. Champaign, IL: **IETS**, 180p. 1998.

MAZUR P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. Proc. 9th **Int conr Animal Reproduction** p.99 1980.

MAZUR, P.. Principles of cryobiology. In: Lane N, Fuller BJ, Benson EE (Ed.). Life in the frozen state. **Boca Raton, FL: CRC Press**, p.3-65, 2004.

MAZUR, P.; SEKI, S.; PINN, I.L.; KLEINHANS, F.W.; EDASHIGE, K.. Extra and intracellular ice formation in mouse oocytes. **Cryobiology**, v.51, p.29-53, 2005.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D. Criopreservação de ovócitos e embriões bovinos. In: XX Reunião Anual da SBTE, 2006, Araxá MG. **Acta Scientiae Veterinariae** (UFRGS. Impresso). Porto Alegre RS: UFRGS. v. 34. p. 191-196. 2006

MULDREY, K.; MCGANN, L.E. Mechanism of intracellular ice formation. **Biophysical Journal**, v.57, p.525-532, 1990.

NAGAI, S.; MABUCHI, T.; HIRATA, S.; SHODA, T.; KASAI, T.; YOKOTA, S.; SHITARA, H.; YONEKAWA, H.; HOSHI, K.. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. **The Tohoku Journal Of Experimental Medicine**, v.210, p.137-144, 2006.

OLIVEIRA, A.T.; LOPES, R.F.; RODRIGUES, J.L.. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.129–136, 2006.

OROZCO-LUCERO, E.; DUFORT, I.; ROBERT, C.; SIRARD, M.. Rapidly Cleaving Bovine Two-Cell Embryos Have Better Developmental Potential and a Distinctive mRNA Pattern. **Molecular Reproduction and Development**, v.81, p.31–41, 2014.

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J.. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p.127-149, 1996.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, v.9, p.267-277, 2008.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S.. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666-668, 1949.

PONTES, J.H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.G.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.; OLIVEIRA, J.A.; HSLER, J.F.; SENEDA, M.M.. Comparison of

embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690-797, 2009.

PONTES, J.H.; MELO, STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES BV, RUBIN KC, SENEDA MM. 2011. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a largescale commercial program using Nelore cattle donors. **Theriogenology**, 75:1640-1646, 2011.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v.56, p.1–16, 2001.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYOGARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of Reproduction**, v.66, p.589-595, 2002.

RIZOS, D.; LONERGAN, P.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234–248, 2002.

SANTOS, R.R; CELESTINO, J.J.H; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9-15, 2008.

SCHREIBER, M.; WANG, Z.Q.; JOCHUM, W.; FETKA, I.; ELLIOTT, C.; WAGNER, E. F.. Placental vascularisation requires the AP-1 component Fra1. **Development**, v.127, p.4937–4948, 2000.

SEIDEL, JR.G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos. Short course proceedings. **Presented by Animal**

Reproduction Laboratory, Colorado State university, Fort Collins, Colorado, USA: 6,
1986.

SEIDEL, G.E.JR.. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation.
Theriogenology, v.65, p.228–235, 2006.

SERAPIÃO R. V.; SÁ W. F.; FERREIRA A. M.; CAMARGO L. S. A.; GILARDI S. G. T.;
VIANA J. H. M.; RAMOS A. A.; NOGUEIRA L. A. G. Criopreservação de embriões
bovinos produzidos in vitro. **Revista brasileira de. Ciência Veterinária.**, v. 12, n. 1/3, p. 58-
61, jan./dez. 2005

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H..Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos
using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95-105,
1999.

SPRICIGO JFW. Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes estágios da meiose pelo
método de Cryotop: Avaliação de danos morfológicos, funcionais e moleculares.
Brasília.2008.Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Faculdade de agronomia e
medicina veterinária, Universidade de Brasília- DF, 2011.

STOKES, P.J.; HAWKHEAD, J.A.; FAWTHROP, R.K.; PICTON, H.M.; SHARMA, V.;
LEESE, H.J.; HOUGHTON, F.D.. Metabolism of human embryos following
cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical
IVF. **Human Reproduction**, v.22, p.829-835, 2007.

STUPACK, D.G.; CHERESH, D.A.. Integrins and angiogenesis. **Current Topics in
Developmental Biology**, v.64, p.207–238, 2004.

STUSHNOF C.; SEUFFERHELD M. Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic
resources. In: Bajaj YPS (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of
plant germplasm. **Berlin: Springer-Verlag**, 1995. p.87-101.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.; CROCOMO, L.F.; DE LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F.. 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.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; CROCOMO, L.F.; MAGALHAES, L.C.; JUNIOR, A.M.; MACHADO, R.; LANDIM ALVARENGA, F.C.. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, p.1-8, 2012.

TETZNER, TAD. Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção in vitro de embriões bovinos . Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

THOMPSON, J.G.; GARDNER, D.K.; PUGH, P.A.; MCMILLAN, W.H.; TERVIT, H.R.. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.53, p.1385-1391, 1995.

TONER, M.; CARVALHO, E.G.; KAREL, M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. **Journal of Applied Physiology**, v.67, p.338-354, 1990.

VAJTA, G.. Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, p.719-27, 2013.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? **Review on vitrification. Reprod Biomed Online**, v.12, p.779-796, 2006.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p.236-244, 2006.

VAJTA, G.; HYTTEL, P.; CALLESEN, H.. Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. **Molecular Reproduction and Development**, v.48, p.9-17, 1997.

VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; DE KRUIF, A.. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.47-56, 1997.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; KRUIP, T.A.; RALL, W.F.. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. **Cryobiology**, v.32, p.157-167, 1995.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; RALL, W.F.. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology**, v.48, p.1071-1085, 1997.

VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.B.; NICÁCIO, A.C.; ASSUMPCAO, M.E.O.A.. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different. **Theriogenology**, v.57, p.345-359, 2002.

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D.. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.280-289, 2007.

WHITTINGAM, D.G.. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v.233, p.125-126, 1971.

WILMUT, I.; ROWSON, L.E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Veterinary Record**, v.92, p.686- 690, 1973.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; LEMME, E.; KORSawe, K.; NIEMANN, H.. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-

derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome?
Animal Reproduction Science, v.82–83, p.593–603, 2004.

ZHANG B, PEÑAGARICANO F, DRIVER A, CHEN H, KHATIB H. Differential expression of heat shock protein genes and their splice variants in bovine preimplantation embryos. **Journal Dairy Science**, v.94, p.4174-4182, 2011.

Capítulo 2

RESUMO

EFEITO DA FONTE PROTEICA NA PRODUÇÃO, QUALIDADE E CRIORESISTENCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO

Severino Bernardino de Sena Netto¹, Ivo Pivato¹

¹ Faculdade de Agronomia e Veterinária- UnB, DF

Um dos fatores mais limitantes da produção in vitro de embriões (PIVE) é a criopreservação, pois além dos embriões serem mais sensíveis ao frio eles suportam melhor a vitrificação do que o congelamento lento. Mas a vitrificação requer a presença de um técnico especializado para a manipulação embrionária enquanto que o congelamento lento permite a transferência direta. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da substituição do SFB por BSA durante a maturação e cultivo embrionário na resposta à criopreservação utilizando o congelamento lento. Os CCOs obtidos de ovários de abatedouro foram distribuídos em 2 grupos: 1) controle: CCOs maturados e cultivados em meios suplementados com SFB, 2) CCOs maturados e cultivados em meios suplementados com BSA. Em D7 os embriões de cada grupo foram distribuídos em dois tratamentos, fresco e congelado. O experimento 1 avaliou o efeito da fonte protéica na PIVE e a resposta à criopreservação. Após o descongelamento os embriões foram avaliados às 24h e 48h quanto à expansão e eclosão. No experimento 2 foi quantificada a expressão dos genes KRT8, PLAC8, FOSL1, HSP1A1 e HSPA5 por qPCR e quanto ao número total de células e células apoptóticas. Os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e taxa de células apoptóticas foram realizados pelo teste χ^2 e número de células pela ANOVA e teste de Tukey. A taxa de clivagem foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos, entretanto a taxa de blastocisto foi maior ($P<0,05$) no grupo 1 ($42,8\pm 10,1\%$) do que no grupo 2 ($27,9\pm 8,5\%$). Às 24 horas pós-descongelamento o grupo SFB Fresco apresentou maior taxa de eclosão ($P<0,05$) do que os demais. Entretanto, as 48 horas, a taxa de eclosão foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos SFB Controle ($68,1\pm 23,3\%$) e BSA Controle ($70,0\pm 31,0\%$) e SFB Congelado ($39,2\pm 27,1$) e BSA Congelado ($38,2\pm 23,9$). Não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos Frescos, e entre os grupos congelados quanto ao número total de células. A percentagem de células apoptóticas foi maior no grupo BSA Congelado do que grupo SFB Fresco, não diferindo ($P<0,05$) dos demais grupos. A expressão do gene KRT8 foi maior ($P<0,05$) no grupo SFB Congelado do que no BSA Congelado, mas foi semelhante ($P>0,05$) entre Congelados e Frescos dentro de cada grupo. O gene PLAC8 foi

mais expresso no grupo BSA Fresco do que no grupo SFB Congelado ($P < 0,05$). Pode-se concluir que o uso de BSA em substituição ao SFB causou uma redução na produção de embriões, mas teve resposta semelhante na criopreservação. A expressão diferencial dos genes KRT8 e PLAC8 sugere que os embriões cultivados em BSA são de qualidade superior.

Palavras chave: Congelamento clássico, BSA, Viabilidade.

ABSTRACT

EFFECT OF PROTEIN SOURCE IN THE PRODUCTION, QUALITY AND CRYORESISTANCE OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO

Severino Bernardino de Sena Netto¹, Ivo Pivato¹

¹ School of Agronomy and veterinary Medicine - UnB, DF

One of the most limiting factors in vitro embryos (IVP) is cryopreservation, because besides the embryos are more sensitive to cold they support better vitrification than slow freezing. But vitrification requires the presence of a technical expert for embryo manipulation while slow freezing allows direct transfer. The objective of this study was to evaluate the effect of replacing SFB by BSA during maturation and embryo culture in response to cryopreservation using slow freezing. The COCs obtained from slaughterhouse ovaries were divided into 2 groups: 1) control: COCs matured and grown in media supplemented with SFB, 2) COCs matured and grown in media supplemented with BSA. D7 in the embryos of each group were divided into two treatments, fresh and frozen. Experiment 1 evaluated the effect of protein source in IVP and response to cryopreservation. After thawing the embryos were evaluated at 24 and 48 hours as the expansion and hatching. In experiment 2 was quantified the expression of genes KRT8, PLAC8, FOSL1, HSP1A1 and HSPA5 by qPCR and for the total number of cells and apoptotic cells. The χ^2 test and the number of cells performed the data relating to embryonic development and cell apoptotic rate by ANOVA and Tukey test. Cleavage rate was similar ($P > 0.05$) between groups, however blastocyst rate was higher ($P < 0.05$) in group 1 ($42.8 \pm 10.1\%$) than in group 2 ($27.9 \pm 8.5\%$). At 24 hours post-thaw SFB group Fresh showed the highest hatching rate ($P < 0.05$) than the others. However, the 48 hours, the hatching rate was similar ($P > 0.05$) between SFB Control groups ($68.1 \pm 23.3\%$) and BSA control ($70.0 \pm 31.0\%$) and Frozen SFB (39.2 ± 27.1) and BSA Frozen (38.2 ± 23.9). There was no difference ($P > 0.05$) between groups Fresh, frozen and between groups regarding the total number of cells. The percentage of apoptotic cells was higher in the Frozen BSA group than group SFB Fresh, did not differ ($P < 0.05$) from the other groups. The KRT8 gene expression was higher ($P < 0.05$) in Frozen FBS group than in BSA Frozen, but was similar ($P > 0.05$) between frozen and fresh within each group. The PLAC8 gene was more expressed in the BSA Fresh group than in the Frozen SFB group ($P < 0.05$). It can be concluded that the

use of BSA replacing FBS caused a reduction in embryo production, but had similar response in cryopreservation. The differential expression of KRT8 and PLAC8 genes suggests that embryos cultured in BSA are top quality.

Keywords: Classic Freezing, BSA, Feasibility.

1 - INTRODUÇÃO

A produção mundial de embriões bovinos in vitro aumentou significativamente com o passar dos anos, e em 2013 os embriões PIVE representaram 42% do total de embriões produzidos em todo o mundo (Blondin 2015). Apesar disso, um dos fatores limitantes para a melhor utilização da técnica é falta de um método adequado para criopreservação dos embriões. É importante observar que, em 2013, a América do Sul produziu 73% dos embriões PIVE do mundo, sendo que apenas 5% dos embriões transferidos eram congelados (Blondin 2015).

A criopreservação de embriões permite o aproveitamento de receptoras com estro natural, além do transporte de embriões congelados ser menos oneroso e possibilitar a programação de nascimentos adequada ao manejo de cada propriedade. Oferece ainda condições de armazenamento dos embriões enquanto se realiza teste de progênie, e possibilita a criação de bancos de embriões de animais geneticamente superiores ou em risco de extinção (Serapião et al. 2005). Além disso, é uma técnica fundamental para a comercialização de embriões, sendo estratégica para o país que tem o potencial de ser o maior exportador de genético tropical.

Atualmente existem dois métodos utilizados para criopreservação de embriões: o congelamento lento ou clássico e a vitrificação. O congelamento lento pode ser interpretado como uma tentativa de criar um balanço entre vários fatores que determinam a formação de cristais de gelo, fraturas, danos tóxicos e osmóticos, permitindo trocas entre os meios extra e intracelular sem que ocorram sérios efeitos osmóticos e deformidades celulares (Vajta e Kuwayama, 2006) e ainda apresenta a vantagem dos embriões serem transferidos na própria palheta em que foram congelados facilitando assim a disseminação e a logística da transferência de embriões.

Ao comparar os resultados destes métodos de criopreservação comparando os embriões PIVE e embriões produzidos *in vivo* (TE), os embriões TE mostraram taxas de gestação semelhantes (variando entre 39% e 59%) para ambos os procedimentos de congelamento, o lento e a vitrificação (Massip de 1987; van Wagendonk-de Leeuw et al., 1997; Inaba et al., 2011). Já para embriões PIVE o melhor resultado foi obtido com a vitrificação (variando de 52% a 100% a taxa de reexpansão e 36% a 93% a de eclosão) (Nedambale et al., 2004; Mucci et al., 2006; Yu et al., 2010; Inaba et al., 2011). Foi demonstrado que os embriões de PIVE tem uma maior sensibilidade para as técnicas de criopreservação do que os TE (Leibo e Loskutoff, 1993) e que os embriões destas duas origens demonstraram que não sobrevivem igualmente aos diferentes métodos de criopreservações (revisado por Sudano et al., 2013). Esta menor resistência à criopreservação foi associada a diferentes características físicas e morfológicas encontradas nesses embriões (Enright et al., 2000; Abe et al., 2002). Entre as diferenças pode-se mencionar que embriões PIVE tendem a conter maior quantidade de vacúolos, reduzida expressão de comunicações intercelulares, compactação menos pronunciada, disco embrionário geralmente menor com menos células e menor quantidade de células totais quando comparados aos embriões *in vivo* (Crosier et al., 2000; Lonergan et al., 2006). Além disso, possuem um grande acúmulo intracelular de lipídios e um decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras quando comparado com embriões *in vivo* (Crosier et al., 2000; Farin et al., 2004).

Mudanças na técnica de criopreservação permitem uma melhora até certo ponto, mas é indispensável mudanças no próprio embrião para melhorar a resistência à criopreservação (Seidel jr, 2006). Com este objetivo, várias estratégias foram desenvolvidas, como o uso de agente lipolíticos [forskolin (Paschoal et al., 2012), etossulfato de fenazina (Sudano et al., 2011), L-carnitina (Takahashi et al., 2003)], antioxidantes (Breininger et al., 2005; Hosseini et al., 2009), ácido linoleico conjugado (Hochi et al., 1999), aumento de pressão hidrostática (Siqueira Filho et al., 2011) e utilização de meios isentos de SFB (Abe et al., 2002).

De acordo com a literatura, a principal característica que afeta a criotolerância do embrião PIVE e que tem sido alvo das pesquisas nessa área, é o exacerbado conteúdo lipídico existente no seu citoplasma (Abe et al., 2002; Barcelo-Fimbres et al., 2007). Apesar de não estar claro como e porque a acumulação lipídica ocorre no citoplasma destes embriões, tal acúmulo tem sido atribuído à presença de soro. De fato, a concentração de SFB afeta o número de gotas lipídicas presentes no citoplasma do embrião PIVE (Leroy et al., 2005; Sudano et al., 2012a).

Embriões cultivados em sistemas livres de soro têm uma redução no acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas e maior resistência à criopreservação (Pereira et al., 2008).

A BSA é uma fonte proteica que pode ser utilizada como alternativa quando a finalidade é a criopreservação dos embriões, pois como citado anteriormente os embriões que são cultivados em sistemas livres de SFB tem uma maior criotolerância. Convém ressaltar, entretanto, que na grande maioria dos estudos a fonte proteica só é alterada durante o cultivo embrionário e, que estudos em que ambas as etapas MIV e CIV foram realizadas na ausência de soro ainda são escassos (Collado et al., 2015; Oliveira et al., 2006; Leme 2008; Moreno et al., 2015).

Por outro lado, a maioria dos autores relatam resultados positivos com a vitrificação de embriões bovinos PIVE (Leme, 2008; Inaba et al., 2011), sendo, até o presente, a técnica mais utilizada para esse tipo de embrião. Apesar disso, é uma técnica que exige a presença de um técnico experiente no momento do aquecimento impedindo a transferência direta destes embriões.

O presente estudo utilizou a substituição da fonte proteica do sistema de PIVE de SFB por BSA e a utilização do congelamento lento para a criopreservação. O objetivo foi obter embriões com maior criotolerância para serem utilizados em um método de criopreservação, que apresenta entre outras vantagens a possibilidade de transferência direta facilitando assim a disseminação e a logística da utilização dos embriões produzidos in vitro.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Recuperação e Seleção dos ovócitos

Os ovários foram coletados de fêmeas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) em abatedouros locais imediatamente após o abate e transportados em solução salina (NaCl 0,9%), suplementada com estreptomicina (50 µg/ml) e penicilina (100 µg/ml) à temperatura de 35 a 36°C. O tempo de transporte entre o abate até o momento da aspiração dos folículos foi observado para não exceder o limite de 6 horas.

Os complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro com o auxílio de seringa de 10 ml e agulha de calibre 18G. O material aspirado foi depositado em tubos plásticos de 15 ml (TPP®, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça). Os tubos contendo o líquido folicular aspirado foram mantidos em banho-maria (36°C) por 5 minutos para sedimentação das células. Após a sedimentação, foi retirado 10 ml do líquido folicular sobrenadante, que foi centrifugado por 10 minutos (37 °C, 700 g) e utilizado para procura e seleção dos CCOs. Os CCOs foram transferidos para gota de fluido folicular, no qual foram selecionados os de qualidade I e II (Caixeta e Dode, 2008).

2.2 - Maturação In Vitro (MIV)

Imediatamente após a seleção, os ovócitos foram lavados e transferidos para o meio de maturação. A maturação foi realizada por um período de 24 horas e o meio consistiu de TCM-199 (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) com sais de Earl's suplementado com 0,075 mg/ml de amicacina, 1µg/ml de L-glutamina, 1µM de Piruvato, 1µM de Cisteamina e 10⁻¹ UI/ml de FSH recombinante [rFSH (Gonal-F®, Merck Serono, Rockland, MA, USA)], 10% de Soro fetal Bovino (SFB) ou 0,4% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA- FAF).

Os CCOs foram cultivados em gotas de 200 µl com cerca de 30 estruturas e cobertas com óleo siliconado (360 Medical fluid 350 CST-DOWN CORNING®, New York, Canton, EUA) a 38,5 °C em 5% CO₂ em ar.

2.3 - Fecundação In Vitro (FIV)

Após a MIV os ovócitos foram transferidos para gotas de 200 µl de meio de fecundação que consistia de *Tyrode's albumin lactate pyruvate* [TALP (Parrish et al. 1995)] suplementado com 0,5 mM de penicilamina, 0,25mM de hipotaurina, 25 mM de epinefrina e 10 µg/ml de heparina.

Sêmen congelado da mesma partida de um touro da raça Nelore, previamente testado para a produção in vitro de embriões foi utilizado para todos os tratamentos e réplicas. O sêmen foi descongelado á 36 °C por 30 segundos. Após o descongelamento, os espermatozoides foram selecionados pelo método de gradiente de Percoll 90 e 45% (GE® Healthcare , Piscataway , NJ, USA) utilizando (400 µl) em microtubos de 2 ml, centrifugados por 5 minutos a 5.400g. O pellet foi ressuspensionado e adicionado na gota de fecundação de forma a se obter uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides móveis/ml.

Os ovócitos foram coincubados com os espermatozoides a 38,5 °C e 5% de CO² em ar por um período de 18-20 horas. O dia da inseminação foi considerado 0 (D0).

2.4 - Cultivo in Vitro (CIV)

Após o período de fecundação, os possíveis zigotos foram pipetados para remoção das células do *cumulus* e transferidos para o meio de fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (Holm et al., 1998), 0,34 mM de sódio tri-citrato, 2,77 mM de myo-inositol e 5% de SFB ou 0,4% de BSA em gotas de 200 µl, cobertas por óleo mineral. O cultivo foi realizado por 8 dias em estufa a 38,5 °C e com 5% de CO² em ar.

Os embriões foram observados em D2 para avaliação da clivagem e em D6, D7 pós-inseminação (p.i.) para as taxa de blastocistos.

2.5 - Congelamento dos embriões pelo método lento

No D7 os embriões foram avaliados quanto à qualidade e estágio de desenvolvimento somente embriões grau I (classificação IETS) no estágio de blastocistos expandidos (Bx) foram utilizados. Para a congelamento foi utilizado 1,5M de Etilenoglicol (EG). Os embriões foram lavados em solução de PBS e em seguida transferidos para gotas de EG e logo após, foram envasados em palhetas de 0,25 mL, sendo que permaneceram um tempo máximo de 10 minutos no EG antes de iniciar o congelamento. As palhetas foram colocadas na máquina de congelamento (FREEZE CONTROL®, Model CL-863 System, Cryologic, Australia) que já estava estabilizada a -6,2°C e, após 2 minutos de estabilização foi realizado a indução da cristalização (*seeding*), quando foi iniciada a curva de congelamento de - 0,5 °C por minuto, até atingir a temperatura de -35 °C. Após o termino da curva as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido (N₂L).

2.6 - Descongelação e cultivo pós-criopreservação

As palhetas foram retiradas do N₂L, mantidas por 5 segundos em temperatura ambiente e, então imersas em água aquecida a 33 °C por 30 segundos. Em seguida, os embriões foram lavados e transferidos para gota de cultivo correspondente ao grupo

experimental para avaliação de seu desenvolvimento. Os embriões foram avaliados quanto a reexpansão e eclosão as 24h e 48 h pós descongelamento. Os grupos controle de ambos os tratamentos permaneceram na bancada em meio de manutenção durante o congelamento e descongelamento e após foram lavados e transferidos para gota de cultivo correspondente ao grupo experimental correspondente ao seu tratamento.

2.7 - Quantificação da Expressão gênica

Os blastocistos eclodidos (Be) observados nos momentos designados para avaliação (D8) foram lavados 4 vezes em gotas de solução salina em tampão fosfato (PBS) isento de cálcio e magnésio, estocados em microtubo contendo RNA *later* e armazenados a -20 °C até o momento da extração do RNA.

Foram utilizados 3 pools contendo 6 embriões de cada grupo. Foi quantificada a expressão dos genes KRT8 (Keratin 8, Type II) e PLAC8 (Placenta-Specific 8) relacionados a qualidade embrionária, o gene FOSL1 (FOS-Like Antigen 1)- relacionado a apoptose e os genes HSP1A1 (*heat shock protein A1*) e HSPA5- (*heat shock protein A5*) relacionados ao estresse térmico. Os genes PPIA (Peptidylprolyl Isomerase A) e GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) foram utilizados como genes constitutivos.

2.8 - Extração do RNA e produção do cDNA

O RNA total foi isolado usando o Kit RNeasy Plus Micro (Qiagen®, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante (com pequenas modificações). O volume total de RNA isolado foi utilizado para a síntese de cDNA, usando o kit First-Strand cDNA Synthesis (invitrogen) – SuperScript® III (200 U / μ L) e primer Oligo-dT (0,5 μ g / μ L) em um volume final de 40 μ L. As reações foram realizadas a 65 °C por 5 minutos e 50 °C por 50 minutos, seguido pela inativação da enzima a 85 °C por 5 minutos. A análise do qPCR foi realizada usando Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (76 – 110%) por cálculos usando as curvas padrões relativas no programa 7500 2.0.3 (Applied Biosystems). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto de PCR foi determinada pela análise da curva de *melting* e tamanho do amplicon em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L usando cDNA correspondente a 0,33 de um embrião. As condições dos ciclos do PCR foram 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos e então anelamento a 60 °C por 30 segundos. O nome, a sequência e concentração do primer, tamanho do amplicon e temperatura de anelamento de cada gene estão listadas na Tabela 1.

O nível de expressão dos dois genes constitutivos, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) e Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) foram submetidos ao programa de análise GeNorm, que indicou os genes PPIA e GAPDH como os mais estáveis. O gene GAPDH foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa

de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência pelo método Pfaffl (Pfaffl 2001).

Tabela 1. Informações para primers específicos utilizados para amplificação dos fragmentos de genes para análise em PCR em tempo real.

Genes	Sequência dos primer	Tamanho do Amplicon (bp)	Concentração do Primer (nM)	Número de acesso Ao Banco de Gene /Referencia
GAPDH	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	118	300	NM_001034034.2 (Leme et al. 2015)
PPIA	F:GCC ATG GAG CGC TTT GG R:CCA CAG TCA GCA ATG GTG ATC T	65	300	NM_178320.2 (Leme et al. 2015)
KRT8	F: TGT GAA GAA GAT TGA GAC CCG CGA R: AAA CCT CAG GTC TCC TGT GCA GAT	160	300	X12877 (El-Sayed <i>et al.</i> 2006)
PLAC8	F: GAC TGG CAG ACT GGC ATC TT R: CTC ATG GCG ACA CTT GAT CC	140	300	NM_016619 (El-Sayed <i>et al.</i> 2006)
HSPA5	F: CGT GGC CAC TAA TGG AGA TAC R: CTC TGT TGT CCT TCC GAA CAT	119	300	NM_001075148.1 (Leme et al. 2015)
HSP1A1	F:CAA GAT CAC CAT CAC CAA CG R:AAA TCA CCT CCT GGC ACT TG	219	300	NM_174550.1 (Leme et al. 2015)
FOSL1	F: GCT TCC TAG TAG AGC CAA AG R: GAA GAG GTG ATG AAG ACC ATA G	200	300	NM_001205985.1 (Leme et al. 2015)

F: *primer forward*; R: *primer reverse*

(Leme et al. 2015)

2.9 - Avaliação do número total de células e células apoptóticas

Foram utilizados blastocistos expandidos (Bx) observados as 24h pós-descongelamento para determinar o número total de células e de células apoptóticas. Os embriões foram corados utilizando a técnica de TUNEL. Os blastocistos foram retirados da placa de cultivo e em seguida lavados em PBS aquecido (Life Technologies, cidade, estado Estados Unidos) suplementado com BSA (1 mg/mL) antes da fixação em paraformaldeído a 4%, durante 60 minutos. Todo o processo foi realizado à temperatura ambiente, no escuro. Após o período de incubação os embriões foram lavados em solução contendo PBS+BSA. Após lavagem, os blastocistos foram mantidos em solução permeabilizadora por 1 hora à 2-8 °C. Para a avaliação, foram incluídos grupos controles positivo e negativo. Os blastocistos (exceto controles negativos) foram, então, corados pelo TUNEL por 60 minutos à 37°C e posteriormente com e Hoechst 33342, durante 10 minutos. Finalmente, os blastocistos foram lavados em BSA e observados sob um microscópio fluorescente. Para cada blastocisto, o número total de células individuais (núcleos azuis, Hoechst 33342) e o número total de células apoptóticas (núcleos verdes, TUNEL) foi determinado. A proporção de células apoptóticas foi definida como a porcentagem de células apoptóticas sobre o número total de células (Figura 1).

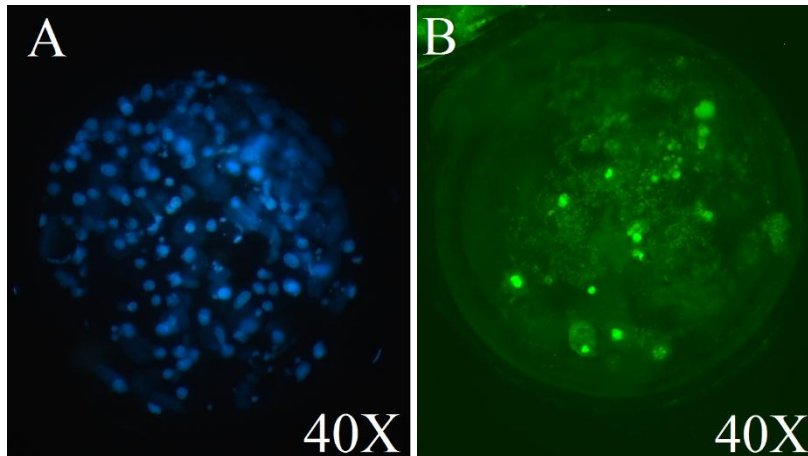


Fig. 1: A) Blastocistos Expandidos em D8 corados por Hoechst 33342, para contagem do número total de células e B) corado corados pelo TUNEL, para contagem do número de células apoptóticas.

3 - Delineamento Experimental

Para avaliação do efeito da fonte proteica durante o cultivo na produção, resistência a criopreservação e qualidade de embriões bovinos produzidos in vitro foram realizados dois experimentos.

3.1 - Experimento 1: Efeito da fonte proteica na produção in vitro de embriões bovinos e na resposta à criopreservação.

O objetivo deste experimento foi verificar se a fonte proteica utilizada como suplemento nos meios de cultivo afeta a quantidade e qualidade de embriões e a resposta desses embriões à criopreservação. Foram utilizados 1.283 ovócitos de grau I e II obtidos de ovários de abatedouro, oriundos de 11 réplicas. Após a seleção os CCOs foram distribuídos em 2 tratamentos: T1 controle: onde os meios foram suplementados com SFB MIV (5%) e CIV (10%); e T2, BSA, o meio MIV (0,4%) e CIV (0,4%). No D2 foi avaliada a taxa de clivagem e nos D6, D7 a taxa de blastocisto. Para avaliação da resposta à criopreservação, blastocistos expandidos (Bx) classificados com Grau I (embrião simétrico, blastômeros de mesmo tamanho, cor uniforme e sem presença de células extrusas) de cada tratamento, foram subdivididos em Grupo Fresco e Grupo Congelado, sendo que no grupo congelado os embriões foram submetidos ao congelamento lento. O tempo necessário para realizar o congelamento foi de 90 minutos período esse em que os embriões do grupo Fresco permaneceram em meio de manutenção sob placa aquecedora a temperatura de 36 °C.

Após o descongelamento os embriões do grupo Congelado e os do grupo Fresco retornaram para o cultivo em meio SOF. Foram avaliados às 24h e 48h pós-descongelamento quanto a reexpansão, eclosão e degeneração. Os embriões que apresentavam reexpansão e/ou eclosão no momento da avaliação foram considerados como viáveis e, os embriões que apresentaram alterações morfológicas, degenerações e fragmentações foram considerados degenerados.

Além disso, o experimento 1 objetivou avaliar o número total de células e número de células apoptóticas. Foi utilizado um total de 443 embriões no estágio de Bx em D7 produzidos na presença de BSA (n=194) ou SFB (n=279). Metade dos embriões de cada grupo foi submetida congelamento lento e o restante foi utilizado como controle (Fresco).

Após o congelamento/descongelamento os embriões foram cultivados por 24 horas e então utilizados para o teste de TUNEL. Para cada blastocisto foi determinado, o número total de células (núcleos azuis, Hoechst 33342,) e o número total de células apoptóticas (núcleos verdes, TUNEL).

3.2 -Experimento 2: Avaliação da resposta à criopreservação pelo congelamento lento de embriões produzidos in vitro na presença de diferentes fontes proteicas quanto à expressão gênica

Os embriões de cada tratamento (SFB e BSA) foram avaliados no D7 e aqueles no estágio de Bx foram utilizados para o experimento. Foram divididos em dois grupos: 1) Fresco, 2) Criopreservado. Após a criopreservação os embriões foram cultivados e avaliados às 24 e 48 horas de cultivo pós-criopreservação, sendo que aqueles que se apresentavam eclodidos no momento da avaliação foram armazenados em *RNA later* para posterior análise molecular. Foi quantificada a expressão dos genes KRT8 (Keratin 8, Type II) e PLAC8 (Placenta-Specific 8) – relacionados a qualidade embrionária, o gene FOSL1 (FOS-Like Antigen 1)-relacionado a apoptose e os genes HSP1A1 (heat shock protein A1) e HSPA5- (heat shock protein A5) relacionados ao estresse térmico. Os genes PPIA (Peptidylprolyl Isomerase A) e GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) foram utilizados como constitutivos. Foram utilizados 3 pools contendo 6 embriões de cada grupo.

4 - Análise Estatística

Os dados referentes ao desenvolvimento embrionário foram analisados pelo teste Qui-quadrado ($P < 0,05$). A comparação entre os tratamentos quanto ao número total de células foi realizada utilizando o teste ANOVA com teste de Tukey e para o número de células apoptóticas, foi usado o Kruskal-Wallis. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta Ct$ com correção da eficiência pelo método Pfaffl. No experimento 2 foram utilizados os testes ANOVA e Kruskal-Wallis. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Todas as análises foram realizadas pelo programa Prophet, versão 5.0 (BBN systems and Technologies, 1996)

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5-1 Experimento 1: Efeito da fonte proteica na produção in vitro de embriões bovinos e na resposta à criopreservação.

Nesse experimento a produção de embriões e a resposta desses a criopreservação foi comparada entre dois sistemas de cultivo que variaram quanto à suplementação proteica dos meios. Os dados relativos a produção de embriões é apresentada na tabela 2. Pode-se observar que a taxa de clivagem foi semelhante entre os dois sistemas ($P > 0,05$). Entretanto, o grupo em que todo o cultivo foi realizado na presença de BSA apresentou menor produção de blastocistos em D7 ($P < 0,05$), sendo que a percentagem desses blastocistos que estavam expandidos também foi menor do que os cultivados na presença de SFB ($P < 0,05$).

Tabela 2. Avaliação do desenvolvimento embrionário de ovócitos bovinos maturados e cultivados in vitro na presença de soro fetal bovino (SFB) ou na presença de albumina sérica bovina (BSA).

Tratamento	n	Clivagem D2	Blastocisto D7	Blastocisto expandido
		n (%)	n (%)	D7* n (%)
		(Média)	(Média)	(Média)
SFB	579	478 (82,6) ^a	248 (42,8) ^a	186 (75,0) ^a
BSA	723	577 (79,2) ^a	202 (27,9) ^b	129 (63,8) ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

* Porcentagem de blastocistos expandidos calculada em relação ao total de blastocistos em D7.

Quando a criotolerância dos embriões produzidos pelos dois sistemas foi analisada observou-se que às 24 horas pós-descongelamento os grupos criopreservados apresentaram taxa de reexpansão e de eclosão semelhantes ($P > 0,05$), e não diferiram do controle cultivado na presença de BSA (Tabela 2).

Às 48 horas pós-descongelamento, a taxa de eclosão foi semelhante ($P > 0,05$) para os grupos BSA e SFB tanto nos frescos (controle) quanto nos criopreservados (Tabela 2). Entretanto, os grupos criopreservados, independente da fonte proteica, apresentaram taxa de eclosão inferior ($P < 0,05$) à dos grupos frescos. Foi observada diferença quanto a taxa de eclosão e de embriões viáveis, entre os grupos frescos e congelados, sendo observado menores taxas nos grupos congelados ($P < 0,05$).

Tabela 3. Avaliação pós-descongelamento de embriões bovinos produzidos in vitro na presença de soro fetal bovino (SFB) ou na presença de albumina sérica bovina (BSA) e congelados no dia (D) 7 de cultivo.

Tratamento	Total	24 horas								48 horas							
		Reexpansão		Eclusão		Degenerados		Viáveis		Reexpansão		Eclusão		Degenerados		Viáveis	
		N	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
SFB Controle	69	37	(53.6) ^b	30	(43.5) ^a	2	(2.9) ^{ab}	67	(97.1) ^a	18	(26.1) ^b	47	(68.1) ^a	4	(5.8) ^a	65	(94.2) ^a
SFB Congelado	97	71	(73.2) ^a	15	(15.5) ^b	11	(11.3) ^c	86	(88.7) ^b	42	(43.3) ^a	38	(39.2) ^b	18	(18.6) ^b	79	(81.4) ^b
BSA Controle	50	41	(82.0) ^a	9	(18.0) ^b	0	(0.0) ^a	50	(100.0) ^a	14	(28.0) ^{ab}	36	(72.0) ^a	0	(0.0) ^a	50	(100.0) ^a
BSA Congelado	63	51	(81.0) ^a	6	(9.5) ^b	6	(9.5) ^{bc}	57	(90.5) ^{ab}	26	(41.3) ^{ab}	24	(38.1) ^b	13	(20.6) ^b	50	(79.4) ^b

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa por χ^2 ($P < 0,05$).

A resposta ao congelamento lento de embriões produzidos in vitro cultivados na presença de BSA apresentou maior número total de células pós-descongelamento (24h) do que o grupo SFB ($P<0,05$). Entretanto o número de células apoptóticas foi maior no grupo BSA ($P<0,05$) (Tabela 3). Os grupos controle, tanto BSA quanto SFB, foram semelhantes quanto ao número total de células ($P>0,05$), sendo que o grupo BSA apresentou maior número de células apoptóticas ($P<0,05$) (Tabela 3).

Foi avaliada a relação entre o número total de células e número de células apoptóticas, e o tratamento BSA Congelado apresentou maior relação quando comparado ao grupo SFB Controle ($P<0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Avaliação do número total de células e células apoptóticas de Blastocistos D8 produzidos in vitro na presença de soro fetal bovino (SFB) ou na presença de albumina sérica bovina (BSA) submetidos ou não ao congelamento clássico, no dia (D) 8 de cultivo.

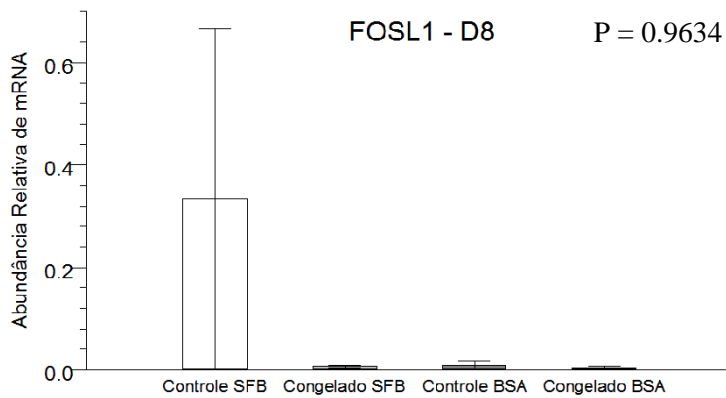
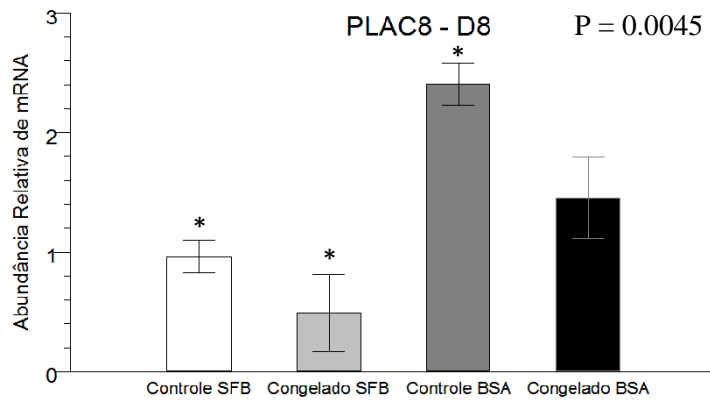
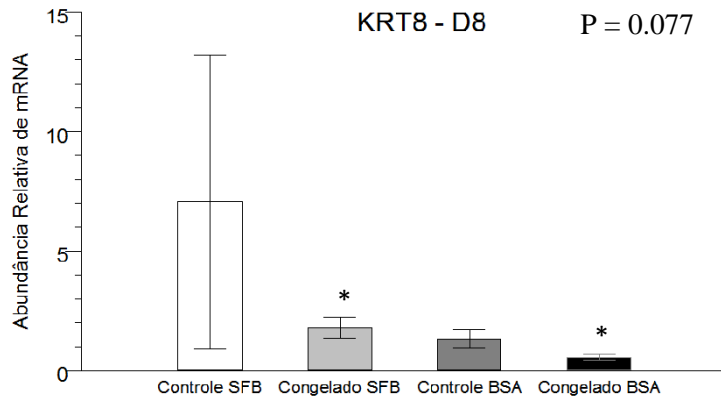
Tratamento	n	Total de células	Total de células apoptóticas	Células apoptóticas
		(Média±DP)	(Média±DP)	(%)
SFB Controle	23	126±27,6 ^a	3,5±2,0 ^b	2,70% ^a
SFB congelado	21	110,2±20,7 ^b	5,8±2,8 ^a	5,27% ^{ab}
BSA Controle	20	132,3±17,1 ^a	6,8±2,6 ^a	5,14% ^{ab}
BSA congelado	20	114,1±18,8 ^c	10,7±2,6 ^c	9,38% ^b

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa por χ^2 ($P<0,05$).

5.2- Experimento 2: Avaliação da resposta à criopreservação de embriões produzidos in vitro na presença de diferentes fontes proteicas quanto à expressão gênica

Esse experimento teve como objetivo avaliar o padrão de expressão gênica de embriões frescos e congelados eclodidos em D8. Foi quantificada a expressão dos genes KRT8, PLAC8, FOSL1, HSP1A1 e HSPA5. Os resultados mostraram que a expressão do gene KRT8 foi maior ($P<0,05$) nos embriões do grupo congelado SFB do que nos do grupo congelado BSA. Entretanto, a expressão desse gene foi semelhante entre criopreservados e frescos dentro de cada grupo. Já para o gene PLAC8 o grupo controle BSA apresentou maior padrão de expressão quando comparado aos grupos Controle SFB e ao Grupo Congelado SFB

($P < 0,05$). Para os demais genes avaliados, FOSL1, HSP1A1 e HSPA5, nenhuma alteração no padrão de expressão foi detectada entre os grupos ($P < 0,05$).



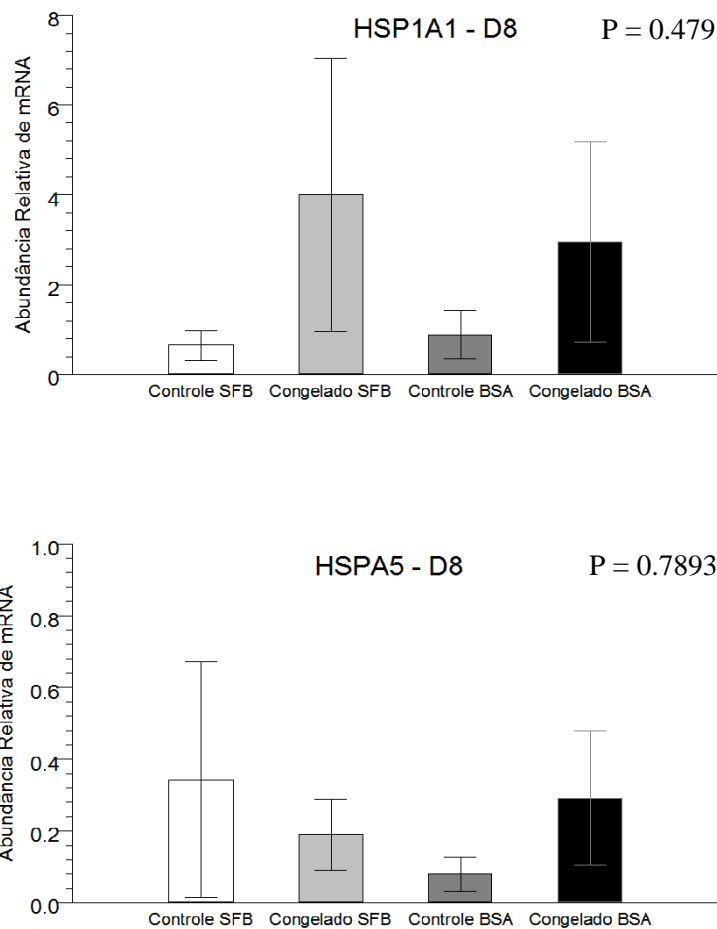


Figura 2 - Nível de transcritos dos genes KRT8, PLAC8, FOSL1, HSP1A1 e HSPA5 analisados por PCR em tempo real em embriões bovinos produzidos in vitro na presença de SFB ou BSA. Os dados (média ± EPM) foram normalizados pelos genes PPIA e GAPDH e expressos em relação à amostra controle, através do método $\Delta\Delta C_t$ com correção da eficiência.

- Asterisco nas barras indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

5.3 - Discussão

Um dos problemas limitantes no uso da técnica de PIVE é a dificuldade de criopreservar os embriões. Vários estudos sugerem que o principal fator responsável pela menor crioresistência dos embriões PIVE é o acúmulo intracelular de lipídeos (Goméz et al., 2008). Apesar de não estar muito claro o que provoca esse acúmulo de lipídeos, existem muitas evidências de que este fato está diretamente relacionado à suplementação do meio com SFB (Sudano et al., 2012).

Existem muitos dados sugestivos de que os embriões bovinos com elevado teor de lipídios são mais sensíveis a procedimentos de criopreservação e que o meio de cultivo pode influenciar esta sensibilidade (Abe et al., 2002). Porém, quando cultivados em sistemas livres de soro têm uma redução no acúmulo de gotas de lipídeos citoplasmáticas e conseqüentemente maior resistência à criopreservação (Pereira e Marques, 2008). A BSA é uma fonte proteica que pode ser utilizada como alternativa quando se tem como finalidade a criopreservação, pois exclui os efeitos indesejáveis ocasionados pelo SFB, produzindo embriões de melhor qualidade.

Por outro lado, a maioria dos autores relata resultados positivos com a vitrificação de embriões bovinos PIVE (Leme, 2008; Inaba et al., 2011), sendo, até o presente, a técnica mais utilizada para esse tipo de embrião. Entretanto esta é uma técnica que exige a presença de um técnico experiente no momento do aquecimento impedindo a transferência direta desses embriões.

Os resultados obtidos no experimento 1 mostraram que a taxa de clivagem foi semelhante entre os grupos, entretanto, a taxa de blastocisto foi inferior no grupo cultivado na presença de BSA em todas as etapas da PIVE. Vários estudos tem mostrado que a presença de soro durante o cultivo embrionário produz mais embriões do que quando esse é substituído por BSA ou outras macromoléculas (Leme 2008 ; Biggers et al., 1997 ; Nowshari et al., 2000). Portanto, a menor produção de embriões no grupo BSA já era esperado. Convém ressaltar, entretanto, que na grande parte desses estudos a fonte proteica só é alterada durante o cultivo embrionário e, que estudos em que ambas as etapas MIV e CIV foram realizadas na ausência de soro ainda são escassos (Collado et al., 2015; Oliveira et al., 2006; Leme 2008; Moreno et al., 2015). Considerando essa diminuição na produção quando o soro é retirado do sistema, os resultados do presente estudo de quase 30% de blastocistos no D7 de cultivo, mostram que a eficiência do sistema é superior a observada nos outros estudos (Collado et al., 2015; Oliveira et al., 2006; Leme 2008; Moreno et al., 2015).

Quando a velocidade de desenvolvimento dos embriões foi avaliada observou-se que apesar da maioria dos embriões em D7 encontrar-se em estágio de blastocisto expandido em ambos os tratamentos, o grupo SFB apresentou maior taxa de expansão que o grupo BSA.

Esses resultados confirmam a existência do efeito bifásico do SFB, no qual inibe as divisões iniciais de clivagem e acelera o desenvolvimento de mórula a blastocisto

(Gilardi et. al 2004 ; Gordon 1994, Lonergan et. al 1999). Ainda é desconhecido o mecanismo de estimulação do soro nesta etapa do desenvolvimento embrionário, porém esse estímulo é relacionado a ação de fatores de crescimento e/ou de aminoácidos, ou, ainda às suas propriedades antioxidantes que reduzem a formação de superóxidos (Bavister, 1995). Essas características induzem a maior produção de embriões que atingem o estágio de blastocisto mais cedo. Considerando que a velocidade de desenvolvimento dos embriões PIVE está relacionada à sua qualidade e, portanto, embriões que se desenvolvem mais cedo têm maior chance de gerar prenhez (Florentino et al., 2013) poderia se assumir que os embriões do grupo SFB teriam melhor qualidade do que os do BSA. Entretanto, deve-se levar em conta que a BSA por ter deficiência de elementos estimuladores do desenvolvimento de blastocistos (Tricoire et. al 1999), os embriões tem ciclos celulares mais lentos e atingem o estágio de blastocisto mais tardiamente (Holm et al., 2002). Portanto, a velocidade de desenvolvimento talvez não seja um bom parâmetro de qualidade embrionária.

No experimento 1, também foi avaliado o comportamento de embriões suplementados com SFB ou BSA, frente ao congelamento lento. Observou-se que às 24 horas de cultivo, o grupo SFB fresco apresentou maior taxa de reexpansão e de eclosão comparado aos demais grupos. Porém às 48 horas pós-descongelamento, os grupos cultivados com SFB e BSA apresentaram taxa de eclosão semelhante tanto nos frescos como nos criopreservados. Estes dados estão de acordo com LEME, (2008), que observou que a taxa de eclosão 48h após a vitrificação foi semelhante nos embriões que foram cultivados na presença de BSA e cultivados na presença de SFB.

A taxa de eclosão às 24 horas foi maior no SFB do que nos demais grupos, mas como mencionado anteriormente, os embriões cultivados em BSA tem um desenvolvimento embrionário mais lento, o que se confirma quando se observa a taxa de eclosão as 48 horas que é semelhante entre SFB e BSA. Esta diferença pode não estar relacionada com qualidade e sim com o efeito bifásico induzido pelo SFB como demonstrado anteriormente.

Era esperado que a BSA oferecesse uma melhor resposta a criopreservação, porém não foram observados elementos que indicassem essa melhor eficiência. Trabalhos citam que blastocistos que se desenvolvem mais rápido ou que apresentam maior diâmetro são de melhor qualidade e mais favoráveis a sobreviver à criopreservação (Saha et al., 1996; George et al., 2008). No nosso estudo utilizamos apenas embriões de melhor qualidade tanto dos meios suplementados com BSA quanto SFB para testar a criotolerância e estes apresentaram

capacidade semelhante de suportar as crioinjúrias ocasionadas pelo processo de criopreservação

Estudos propõem que a sobrevivência de embriões PIVE cultivados em meios com SFB possuem menor criotolerância em relação aos cultivados em meios acrescidos de BSA (Carnegie et al., 1999; Nedambale et al., 2004; Lonergan et al., 2006;). Porém, neste trabalho, nenhuma diferença entre os grupos BSA e SFB foi observada na taxa de embriões viáveis, apesar de ambos serem inferiores ao grupo fresco.

Na avaliação do número total de células dos embriões produzidos pelos dois sistemas, observou-se que às 24 horas de cultivo o grupo SFB fresco apresentou número de células semelhante ao grupo BSA fresco e maior número de células quando comparado aos grupos SFB e BSA congelados. Estes dados reforçam os achados por Nedambale et al., (2004) e Carolan et al., (1995) que observaram a adição de SFB causa aumento do número de células quando comparado a grupos não suplementados. Estes resultados reforçam que a qualidade embrionária é um fator importante para prever a resposta a criopreservação, pois como foram congelados apenas embriões de melhor qualidade, este pode ser o motivo de não haver diferença entre os grupos congelados.

Quanto a avaliação do número de células apoptóticas, o grupo SFB fresco apresentou menor número de células apoptóticas quando comparado aos demais grupos e o grupo BSA congelado apresentou maior número de células apoptóticas. Estes dados diferem dos encontrados por Sudano et al., (2011) que observaram que o número de células apoptóticas aumenta de forma constante ao aumento suplementação do meio com SFB, apresentando uma proporcionalidade direta. Esta variação entre estes resultados pode ter ocorrido principalmente devido as diferenças nos sistemas de cultivo embrionário e método de criopreservação utilizado em cada trabalho.

A relação entre o número total de células e número de células apoptóticas, mostrou que o tratamento BSA Congelado apresentou maior relação quando comparado ao grupo SFB Controle. A apoptose desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário e na homeostase celular, atuando como um mecanismo de controle de qualidade para remoção células que estão danificadas, não funcionais, anormais, e em número excessivo (Jacobson et al., 1997; Meier et al., 2000; Paula-Lopes & Hansen, 2002). Sendo assim, o número de células apoptóticas é um parâmetro para avaliação da qualidade embrionária. O grupo BSA teve um aumento de células apoptóticas comparado ao SFB, considerando que a apoptose é um

processo fisiológico este aumento pode indicar que os embriões cultivados em BSA estão sendo mais eficientes no mecanismo de remoção celular.

Dos genes avaliados apenas o KRT8 e PLAC8 tiveram expressão afetada pelos tratamentos. O grupo SFB congelado teve um aumento da expressão do gene KRT8 em comparação aos embriões do grupo BSA Congelado. Este gene tem um importante papel na formação do blastocisto e na sua subsequente implantação, pois é responsável pela formação do citoesqueleto no trofoectoderma, além de ser crítico para o desenvolvimento de embriões pós-eclosão (Maddox-Hyttel et al. 2003). Este gene é associado a qualidade embrionária e a maior expressão do KRT8 pode explicar a razão dos embriões cultivados em SFB formarem a blastocle mais cedo, quando comparados a embriões cultivados em BSA, como foi relatado anteriormente devido ao efeito bifásico.

Machado et al., (2011) avaliou a expressão desse gene em embriões PIVE no dia 14 de desenvolvimento, e relatou uma superexpressão desse gene em embriões fêmeas comparados aos machos. Biópsias de embriões que resultaram em reabsorção no início da gestação, revelaram níveis elevados desse gene (Ghanem et al., 2011). Assim sendo, os embriões do grupo SFB congelados apresentaram maior expressão deste gene, podendo também indicar uma menor eficiência na implantação dos mesmos.

Os embriões eclodidos do Grupo Controle BSA apresentaram maior expressão do gene PLAC8. Na PIVE bovina, o PLAC8 é um gene utilizado como marcador de qualidade embrionária (Gómez et al., 2009; Machado et al., 2011; Goovaerts et al 2011). Em animais domésticos, o gene PLAC8 ainda não tem sua função bem estabelecida, mas sabe-se que sua expressão está relacionada com o desenvolvimento da placenta (Galaviz-Hernandez et al., 2003; Klein et al., 2006) e exerce um papel na comunicação materno fetal (Gómez et al., 2009). Uma alta expressão desse gene foi relatada em blastocistos bovinos que tiveram sucesso na prenhez quando comparados com aqueles que foram reabsorvidos (El-Sayed et al., 2006) e no endométrio de vacas prenhes em relação as não prenhes (Klein et al. 2006). Os resultados reforçam que embriões cultivados somente com a BSA, apresentam melhor qualidade embrionária, fornecendo indícios de que tem maior capacidade de gerar uma prenhez quando comparados aos embriões cultivados somente em SFB.

Não encontramos diferença na resposta a criopreservação entre os tratamentos, demonstrando a possibilidade de utilizar o congelamento lento e que embriões de boa qualidade sobrevivem ao processo de criopreservação independente da fonte proteica. Além disso, o padrão de

expressão dos genes KRT8 e PLAC8 apresentado mostram que os embriões cultivados em BSA, mesmo apresentando menores taxas de produção apresentam melhor qualidade sugerindo que possam ter maior sucesso nas taxas de gestação.

6 - CONCLUSÃO

- A utilização de BSA em substituição ao SFB causa uma redução na produção de embriões, e resposta semelhante ao congelamento lento.
- A expressão diferencial dos genes KRT8 e PLAC8 sugere que os embriões cultivados em BSA são de qualidade superior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H.. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002.

BARCELO-FIMBRES M.; SEIDEL G. E. JR. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Mol Reprod Dev**, 74:1395-405, 2007.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction**. Update, v.1, p.91-148, 1995.

BIGGERS J.D; SUMMERS M.C; MCGINNIS L.K. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitute for bovine serum albumin in culture media for mouse pre-implantation embryos. **Human Reproduction Update** 1997;3: 125–35.

BLONDIN P. Status of embryo production in the world . **animal reproduction**. V. 12, n.3, p.356-358,jul/sept. 2015.

BREININGER E; BEORLEGUI N. B; O'FLAHERTY C. M; BECONI M. T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, p.2126-2135, 2005.

CARNEGIE J.A.; MORGAN J.J.; MCDIARMID N.; DURNFORD. R. Influence of protein supplements on the secretion of leukaemia inhibitory factor by mitomycin-pretreated Vero cells: possible application to the *in vitro* production of bovine blastocysts with high cryotolerance. **Journal of Reproduction and Fertility**. 1999 Sep;117 (1):41-8.

CAROLAN C.; LONERGAN P.; LANGENDONCK A. VAN; MERRNILLOD P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology** 43:1115-1 128.1995.

COLLADO, M.; SARAIVA, N.Z.; LOPES, F.L.; GASPAR, R.C.; PADILHA, L.C.; COSTA, R.R.; GARCIA, J.M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryo . **Reproduction, Fertility and Development**, 2015.

CROSIER A. E; FARIN P. W; DYKSTRA M. J.; ALEXANDER J. E.; FARIN C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1375-1385, 2001.

ENRIGHT B. P.; LONERGAN P.; DINNYES A.; FAIR T.; WARD F. A.; YANG X.; BOLAND M. P. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, 54:659-73, 2000.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D.. Large-scale transcriptional analysis

of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiological Genomics**, v. 28, p. 84– 96, 2006.

FARIN C. E.; FARIN P. W.; PIEDRAHITA J. A. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v.82, E-Suppl, p.E53-E62, 2004.

FLORENTINO C. M; MARIANI A. C. B; SOUZA J. F; DIAS F.E. F; SANTOS H. D; ARRIVABENE M; SOUSA J. A. T; NEVES W. C; CAVALCANTE T. V; WISCHRAL A. Pregnancy Rates Bovine Recipients Inovulated with in Vitro Produced (IVP) Embryos in the Legal Amazon. **Journal of Animal Science Advantage**. 233-242.2013.

GALAVIZ-HERNANDEZ, C.; STAGG, C.; RIDDER, G.; TANAKA, T. S., KO, M. S.H., SCHLESSINGER, D.; NAGARAJA, R.. Plac8 and Plac9 , novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. **Gene**, v. 309, p. 81–89, 2003.

GEORGE F.; DANIAUX C.; GENICOT G.; VERHAEGHE B.; LAMBERT P.; DONNAY I. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: embryo development and quality before and after transient transfer. **Theriogenology**, v.69, p.612-623, 2008.

GILARDI S.G.T.; SÁ W.F.; CAMARGO L.S.A.; FERREIRA A.M.; MACHADO M.A.; SERAPIÃO R.V.; SOARES A.B.M.; PINHO T.G.; VIANA J.H.M. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, n.5, p.623-627, 2004.

GOOVAERTS, I.G.F.; LEROY, J.L.M.R.; RIZOS, D.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; JORSSEN, E.P.A.; BOLS, P.E.J. Single in vitro bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profile. **Theriogenology**, v. 76, p. 1293–1303, 2011.

GÓMEZ, E.; RODRÍGUEZ A.; MUÑOZ M.; CAAMAÑO J.N.; HIDALGO C.O.; MORÁN E.; FACAL N.; DÍEZ C.. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology** 69 1013-1021. (2008).

GOMEZ, E.; GUTIERREZ-ADAN, A.; DIEZ, C.; BERM-EJO ALVAREZ, P.; MUNOZ, M.; RODRIGUEZ, A.; OTERO, J.; ALVAREZ-VIEJO, M.; MARTIN, D.; CARROCERA, S.; CAAMANO, J.N.. Biological differences between in vitro produced bovine embryos and parthenotes. **Reproduction**, v. 137, p. 285–295, 2009.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **Walling-Ford: CAB International**, 1994.

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**, 52: 497-504, 1999.

HOLM P.; BOOTH P.J.; CALLESEN H. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo - and in vitro -derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. **Reproduction**. 123, 553–565.2002.

HOSSEINI S. M.; FOROUZANFAR M.; HAJIAN M.; ASGARI V.; ABEDI P.; HOSSEINI L.; OSTADHOSSEINI S.; MOULAVI F.; SAFAHANI LANGRROODI M.; SADEGHI H.; BAHRAMIAN H.; EGHBALESAIED SH.; NASR-ESFAHANI M. H. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important?. **J Assist Reprod Genet**, 26: 355-64, 2009.

INABA Y.; AIKAWA Y.; HIRAI T.; HASHIYADA Y.; YAMANOUCHI T.; MISUMI K.; OHTAKE M.; SOMFAI T.; KOBAYASHI S.; SAITO N.; MATOBA S.; KONISHI K.; IMAI K. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. **Journal of Reproduction and Development**, v.57, p.437-43, 2011.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, p. 347–354, 1997.

KLEIN, C.; BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S.E.; EINSPANIER, R.; MEYER, H.H.D.; SCHMIDT, S.E.M.; REICHENBACH, H.D.; VERMEHREN, M.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the pre-attachment period. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 253–264, 2006.

LEIBO S. P.; LOSKUTOFF N. M. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, 39:8194.1993.

LEME LO. Efeito de diferentes fontes proteicas na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos in vitro. Brasília. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF, 2008.

LEROY J. L.; OPSOMER G.; DE VliegHER S.; VANHOLDER T.; GOOSSENS L.; GELDHOF A.; BOLS P. E.; DE KRUIF A.; VAN SOOM A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. **Theriogenology**, 64: 2022-36, 2005.

LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M.P. Effect of protein supplementation and presence of antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. **Theriogenology**, v.51, p.1565-76, 1999.

LONERGAN P.; FAIR T.; CORCORAN D.; EVANS A.C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**. 65:137–152. 2006.

MACHADO, G. M.; CAIXETA, E. S.; LUCCI, C. M RUMPF. R.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N.. Post-hatching development of bovine embryos in vitro: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, p. 1-12, 2011.

MADDOX-HYTTEL, P.; ALEXOPOULOS, N.I.; VAJTA, G.; LEWIS, I.; ROGERS, P.; CANN, L.; CALLESEN, H.; TVEDEN-NYBORG, P.; TROUNSON, A.. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. **Reproduction**, v. 125, p. 607–23, 2003.

MASSIP A.; VAN DER ZWALMENP.; ECTORS [F.](#) Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**. Volume 27, Issue 1, Pages 69–79. [1987](#).

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. *Nature*, v. 407, p.796–801, 2000.

MORENO D.; NEIRA A.; DUBREIL L.; LIEGEOIS L.; DESTRUMELLE S.; MICHAUD S.; THORIN C.; BRIAND-AMIRAT L.; BENCHARIF, D.; TAINTURIER D. Development of a serum and BSA-free medium for the in vitro bovine embryo production. **Theriogenology**. 15;84 (7):1053-60. 2015.

MUCCI N.; ALLER J.; KAISER G. G.; HOZBOR F.; CABODEVILA J.; ALBERIO R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, 65:1551-1562. 2006.

NEDAMBALE T.L.; DINNYES A.; GROEN W.; DOBRINSKY J.R.; TIAN X.C.; YANG X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**. 62 437–449. 2004.

NOWSHARI M.A.; BREM G. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. **Theriogenology**.53:1157–66. 2000.

OLIVEIRA, A.T.; LOPES, R.F.; RODRIGUES, J.L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro with different serum concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.129–136, 2006.

PASCHOAL D. M.; SUDANO M. J.; GUASTALI M. D.; DIAS MAZIERO R. R.; CROCOMO L. F.; OÑA MAGALHÃES L.C.; RASCADO T. S.; MARTINS A.; LANDIM-ALVARENGA F. C. Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, p.1-12, 2012.

PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**., v. 66, p. 1169–1177, 2002.

PEREIRA R.M.; MARQUES C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, v.9, p.267-277, 2008.

SAHA S.; RAJAMAHENDRAN R.; BOEDIONO A.; SUMANTRI C.; SUZUKI T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. **Theriogenology**, v.46, p.331343, 1996.

SERAPIÃO R. V.; SÁ W. F.; FERREIRA A. M.; CAMARGO L. S. A.; GILARDI S. G. T.; VIANA J. H. M.; RAMOS A. A.; NOGUEIRA L. A. G. Criopreservação de embriões

bovinos produzidos in vitro. **Revista brasileira de. Ciência Veterinária.**, v. 12, n. 1/3, p. 58-61, jan./dez. 2005.

SIQUEIRA FILHO E.; CAIXETA E. S.; PRIBENSZKY C.; MOLNAR M.; HORVATH A.; HARNOS A.; FRANCO M. M.; RUMPF R. Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw in vitro development and gene expression. **Reproduction Fertility and Development**, v.23, p.585-590, 2011.

SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; MAGALHÃES, L.C.; CROCOMO, L.F.; DE LIMA-NETO, J.F.; LANDIM-ALVARENGA, F. 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.; PASCHOAL, D.M.; RASCADO, T.S.; CROCOMO, L.F.; MAGALHAES, L.C.; JUNIOR, A.M.; MACHADO, R.; LANDIM ALVARENGA, F.C.. Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. **Zygote**, p.1-8, 2012.

SUDANO M. J.; PASCHOAL D. M.; MAZIERO R. R. D.; RASCADO T. S.; GUASTALI M. D.; CROCOMO L. F.; MAGALHÃES L. C. O.; MONTEIRO B. A.; MARTINS JR. A.; MACHADO R.; LANDIM-ALVARENGA. F. D. C. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Animal Reproduction**, v.10, n.3, p.160-167, Jul./Sept. 2013

TAKAHASHI T.; INABA Y.; SOMFAI T.; KANEDA M.; GESHI M.; NAGAI T.; MANABE N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Reprod Fertil Dev**. 25:589-99, 2013.

TRICOIRE, H.; TOUZÉ, J.L.; MERMILLOD, P. Effect of fetal calf serum on the quality of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology**, v.51, p.257, 1999.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p.236-244, 2006

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW A. M.; DEN DAAS J. H.; RALL W. F. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and threestep dilution. **Theriogenology**, 48:1071-1084. 1997

YU X. L.; DENG W.; LIU F. J.; LI Y. H.; LI X. X.; ZHANG Y. L.; ZAN L. S. Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. **Theriogenology**, 73:474-479. 2010.