

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

**AVALIAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
VITRIFICADOS POR *CRYOTOP***

LIGIANE DE OLIVEIRA LEME

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

Brasília / DF

Mai de 2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

**AVALIAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*
VITRIFICADOS POR *CRYOTOP***

LIGIANE DE OLIVEIRA LEME

Orientação: Dra. Margot Alves Nunes Dode

Tese de Doutorado em Ciências Animais

PUBLICAÇÃO: 186D/2017

Brasília / DF

Mai de 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA – FAV

AVALIAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE EMBRIÕES BOVINOS
PRODUZIDOS *IN VITRO* VITRIFICADOS POR *CRYOTOP*

LIGIANE DE OLIVEIRA LEME

Tese de Doutorado apresentado ao curso de Pós-Graduação em Ciências Animais da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovada por:

Dra. Margot Alves Nunes Dode (Orientadora/Embrapa/UnB)

CPF: 395.928.980 – 49

Dr. Maurício Machaim Franco (Examinador Externo/Embrapa/UFU)

CPF: 517.692.476 – 53

Dr. José Felipe Warmling Spricigo (Examinador Externo/IFC)

CPF: 053.548.809-20

Dra. Giane Regina Paludo (Examinadora Interno/UnB)

CPF: 618.131.689-20

Dr. Ivo Pivato (Examinador Interno – Suplente/UnB)

CPF: 259.264.970-00

Brasília / DF, 03 de Maio de 2017.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

LEME, L.O. **Avaliação molecular e funcional de embriões bovinos produzidos *in vitro* vitrificados por *Cryotop***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 94p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando a reprodução desta Tese de Doutorado para empréstimo, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pela autora à Universidade de Brasília e acha-se arquivado pela Secretaria do Programa. A autora e sua orientadora reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta Tese de Doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora ou da sua orientadora. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

LEME, L.O. **Avaliação molecular e funcional de embriões bovinos produzidos *in vitro* vitrificados por *Cryotop***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 94p. Tese de Doutorado (Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

1. Criopreservação. 2. Vitrificação. 3. PIV. 4. Cinética embrionária. 5. Expressão Gênica. 6. Sexagem. 7. Efeito Touro. I. DODE, MAN. II. Doutora.

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

À minha **família**, aos que estão perto ou mais distante (em quilometragem, mas não no coração e nas orações!), pelo apoio incondicional nas decisões que tenho tomado na vida. Em especial ao meu esposo, **Márcio**, sempre presente, acompanhando e amparando em todo e qualquer momento.... Obrigada pela compreensão!

À **Dra. Margot Dode**, pelo exemplo profissional e pessoal que tanto admiro. Obrigada por me aceitar no retorno às pesquisas!!

À equipe de **pesquisadores, alunos e funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia** pelo convívio e pela colaboração diária, que moldam e complementam nossa formação.

Ao apoio financeiro das instituições que fizeram parte destes anos do curso: **Universidade de Brasília; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); **FAP-DF** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal); **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Objetivos	4
1.2. Hipótese	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Diferenças entre embriões produzidos <i>in vitro</i> e produzidos <i>in vivo</i>	6
2.2. Fatores que afetam a criopreservação	7
2.2.1. Métodos de criopreservação	7
2.2.2. Estágio / Qualidade do embrião	9
2.2.3. Sexo / Qualidade do embrião	11
2.3. Efeito do Touro na Produção <i>in vitro</i> de embriões	13
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 2	34
RESUMO	35
ABSTRACT.....	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAIS E MÉTODOS	40
2.1. Local dos experimentos	40
2.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	40
2.3. Vitrificação dos embriões	41
2.4. Determinação de genes diferencialmente expressos por microarranjo	42
2.5. Análise Funcional da expressão diferencial de genes	43
2.6. Validação dos resultados do microarranjo pela PCR em Tempo Real (qPCR) ...	43
2.7. Análise Estatística	45
3. RESULTADOS	46
3.1. Análise do Transcriptoma em larga escala.....	47
3.2. Caracterização Funcional	47
3.3. Validação dos genes pelo qPCR	48

4.	DISCUSSÃO.....	51
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
	CAPÍTULO 3	61
	RESUMO	62
	ABSTRACT.....	64
1.	INTRODUÇÃO	66
1.1.	Objetivos	69
1.2.	Hipótese	69
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.1.	Local dos experimentos	70
2.2.	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	70
2.3.	Vitrificação dos embriões	72
2.4.	Avaliação do Sexo dos Embriões.....	73
2.5.	Análise Estatística.....	74
3.	RESULTADOS.....	75
4.	DISCUSSÃO	81
5.	CONCLUSÃO	86
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

RESUMO

AVALIAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* VITRIFICADOS POR *CRYOTOP*

Ligiane de Oliveira Leme¹; **Margot Alves Nunes Dode**^{1, 2}

¹ Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Programa de pós-graduação em Ciências Animais; ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília / DF

O sucesso da criopreservação de embriões bovinos é essencial para melhor aproveitamento de embriões produzidos em excesso, para o estabelecimento de bancos de germoplasma e para comercialização de genética. Neste estudo, foi analisada a alteração na expressão de genes induzida pelo procedimento de vitrificação por *Cryotop* em blastocistos bovinos usando lâminas de microarranjo *EmbryoGENE*. Embriões bovinos produzidos *in vitro* em estágio de blastocisto (144 a 156 horas pós-inseminação) foram vitrificados com *Cryotop* e não vitrificados (controle). Após 4 horas de cultivo, embriões que re-expandiram ou evoluíram para o estágio de blastocisto expandido foram usados para análises do microarranjo e para quantificação em reação de cadeia de polimerase em tempo real (qPCR). As análises da expressão global revelaram 43 genes diferencialmente expressos em embriões vitrificados comparados aos do grupo controle ($p < 0,05$). Um total de 9 genes foram validados por qPCR, dos quais o *FOSL1*, envolvido no processo de apoptose, mostrou expressão diferencial ($p < 0,05$) para ambos os métodos, estando super-expresso em embriões vitrificados. Os

resultados sugerem que a apoptose tem um papel fundamental na resposta de embriões ao processo de vitrificação. Considerando que a resposta à vitrificação está muito relacionada à qualidade do embrião, levantou-se a hipótese de que a seleção dos embriões para a vitrificação poderia influenciar também a diferença na proporção macho:fêmea, devido a velocidade de desenvolvimento e tolerância ao estresse. Por isso, na segunda etapa deste estudo, foi avaliado o efeito de touros na cinética do desenvolvimento embrionário e na resposta dos embriões à criopreservação. Para isso foram utilizados 5 touros e comparou-se além da produção de embriões, a resposta à criopreservação pelo método *Cryotop* dos embriões produzidos. Inicialmente, embriões em estágio de blastocisto foram vitrificados (144 a 156 horas pós-inseminação), para avaliação da criotolerância relativa aos touros; enquanto que embriões em estágio de blastocisto expandido foram removidos do cultivo no D6, D7 e D8, e sexados, para avaliação da cinética de desenvolvimento. Na segunda etapa, embriões em estágio de blastocisto expandido foram vitrificados (168 horas pós-inseminação). Todos os embriões (re-expandidos, evoluídos para o estágio de blastocisto eclodido e degenerados), de ambos tratamentos, com 24 horas de cultivo pós-vitrificação foram usados para sexagem. Os resultados sugerem que a escolha do touro, apesar de não interferir na cinética de desenvolvimento embrionário ($p>0,05$), afeta a produção de blastocistos e também a resposta à criopreservação ($p<0,05$). E ainda, que os touros que produzem embriões mais crioresistentes nem sempre são os que produzem maior taxa de embriões PIV. Além disso, embriões macho e fêmea têm a mesma capacidade de resposta à vitrificação por *Cryotop*.

Palavras-chave: Vitrificação; Transcriptoma; Expressão Gênica; Microarranjo; Sexagem; Proporção macho:fêmea; Cinética Embrionária.

ABSTRACT

MOLECULAR AND FUNCTIONAL EVALUATION OF BOVINE *IN VITRO* PRODUCED EMBRYOS VITRIFIED BY *CRYOTOP* METHOD

The cryopreservation success of bovine embryos is essential for the better use of excess produced embryos, for the establishment of germplasm banks and genetics commercialization. In this study, gene expression alteration induced by the *Cryotop* vitrification procedure in bovine blastocysts using EmbryoGENE microarray slides was analyzed. Bovine *in vitro* produced embryos at blastocyst stage (144 to 156 hours post-insemination) were vitrified with *Cryotop* and non-vitrified (control). After 4 hours of culture, re-expanded or expanded blastocyst stage embryos were submitted to microarray analyzes and real time polymerase chain reaction (qPCR) quantification. Global gene expression analysis revealed 43 differentially expressed genes in vitrified embryos compared to control group ($p < 0.05$). Nine genes in total were evaluated by qPCR, of which *FOSL1*, involved in apoptosis process, showed differential expression ($p < 0.05$) for both methods, being overexpressed in vitrified embryos. The results suggest that apoptosis plays a key role in embryos response of vitrification process. Considering that vitrification response is closely related to embryo quality, it was hypothesized that embryos selection for vitrification could also influence the difference in male:female ratio due to developmental speed and stress tolerance. Therefore, in the second stage of this study, the bull's influence on embryo developmental kinetics and embryo response to cryopreservation was evaluated. For this, five bulls were taken and

embryos cryopreservation by *Cryotop* method was compared in addition to embryo production. Initially, blastocyst stage embryos were vitrified (144 to 156 hours post-insemination), to evaluate the cryotolerance relative to the bulls; while expanded blastocyst stage embryos were removed from culture at D6, D7 and D8, then sexed for developmental kinetics. As a second experiment, expanded blastocyst stage embryos were vitrified (168 hours post-insemination). All embryos (re-expanded, hatched blastocyst stage e, and degenerated) of both treatments, with 24 hours post-vitrification culture were used for sexing. The results suggest that sire's choice, although not interfering in embryonic development kinetics, affects the blastocysts rates and the cryopreservation response. Besides, bulls producing more cryoresistent embryos are not always the ones that produce the highest IVP embryo rate. In addition, male and female embryos have the same *Cryotop* vitrification response.

Key words: Vitrification; Transcriptome; Gene Expression; Microarray; Sexing; Male:Female ratio; Embryo kinetics.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

- Figura 2.1:** Gráfico de Volcano: expressão de genes de embriões Vitricificados e Controles..... 47
- Figura 2.3:** Quantidade relativa de mRNA dos genes analisados pelo qPCR em blastocistos bovinos de tratamentos Controle e Vitricificados. 49
- Figura 2.2:** Fluxo simétrico de *fold-change* (log2) de análise de comparação da Validação pelo qPCR e Microarranjo..... 49
- Figura 2.4:** Análise de interação das vias do *Ingenuity*..... 50

Capítulo 3

- Figura 3.1:** Resultados da reação de cadeia polimerase para embriões bovinos individuais, em gel de agarose 1,5%. 74

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 2.1: Informações sobre os *primers* específicos usados para análise da amplificação dos fragmentos dos genes pela qPCR. 45

Tabela 2.2: Taxas de sobrevivência e re-expansão/progressão de blastocistos (BL) vitrificados e não vitrificados (Controle), pelo método *Cryotop* avaliadas às 4 horas de cultivo após a desvitrificação. 46

Capítulo 3

Tabela 3.1: Taxas de clivagem (D2) e de Blastocistos no dia 6 de desenvolvimento (D6) de 5 touros (T) da raça Nelore utilizados para a produção *in vitro* de embriões. ... 77

Tabela 3.2: Efeito do touro (T) na taxa de sobrevivência e desenvolvimento às 4 e 24 horas após o aquecimento, dos embriões produzidos *in vitro* e vitrificados em estágio de blastocistos (BL) em D6. 78

Tabela 3.3: Efeito do touro (T) no sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro* em estágio de blastocisto expandido (BX) nos dias 6 (D6), 7 (D7) e 8 (D8) de desenvolvimento. 79

Tabela 3.4: Taxa de sobrevivência e desenvolvimento de blastocistos expandidos (BX) em D7, vitrificados pelo método *Cryotop* e avaliados 24 horas após aquecimento. 80

Tabela 3.5: Frequência do sexo de embriões bovinos criopreservados por *Cryotop* no dia 7 (D7) de desenvolvimento e avaliados 24 horas após o aquecimento conforme o estágio de desenvolvimento. 80

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem um grande potencial para acelerar o ganho genético, pois possibilita a multiplicação mais rápida de animais melhoradores e permite a produção de embriões com valor agregado. Inicialmente a técnica de PIVE era utilizada no Brasil apenas para fins de pesquisa. Entretanto, desde o início da década passada, sobreveio o uso em larga escala para a multiplicação comercial (Viana *et al.*, 2010), sendo o país atualmente um dos maiores produtores de embriões PIV do mundo, respondendo por cerca de 67 % da produção mundial (Perry, 2016).

Todavia, um dos fatores limitantes na utilização da técnica é a necessidade de manter um grande número de receptoras à disposição para receber os embriões produzidos nos laboratórios, o que eleva muito os custos dessa tecnologia. Em 2015 um total aproximado de 379.000 embriões bovinos foram produzidos no Brasil. Destes, cerca de 94% foram embriões produzidos *in vitro* (PIV) e 6% *in vivo* pela transferência de embriões clássica (TE). Deste montante, aproximadamente 78% foram transferidos a fresco (Viana e Figueiredo, 2016), sugerindo que a criopreservação não está sendo empregada comercialmente na produção de embriões, devido, provavelmente, aos resultados insatisfatórios das alternativas disponíveis.

Embora inúmeras pesquisas têm sido conduzidas em escala mundial, a criopreservação de embriões PIV de várias espécies ainda não apresenta resultados satisfatórios. Os resultados mais promissores têm sido obtidos a partir do desenvolvimento dos métodos de vitrificação (Kim *et al.*, 2012; Kuwayama, 2007; Liu *et al.*, 2008; Loutradi *et al.*, 2008; Morato *et al.*, 2008).

Diversos protocolos de vitrificação já foram desenvolvidos desde o primeiro relato da técnica, em que as principais alterações consistiram em aumentar consideravelmente a taxa de resfriamento/aquecimento pela redução no volume da solução de vitrificação (Kuwayama, 2007; Mucci *et al.*, 2006; Vajta *et al.*, 1998). Dentre os protocolos existentes, a vitrificação pelo método *Cryotop*, descrito por Kuwayama *et al.* (2005b), surgiu como uma alternativa para a criopreservação de embriões por minimizar efeitos negativos e melhorar as taxas de sobrevivência.

Sabe-se que o embrião PIV detém características distintas quando comparado ao produzido *in vivo*. Essas diferenças entre embriões PIV e embriões *in vivo* envolvem aspectos morfológicos (Papis *et al.*, 2000) e moleculares que afetam a qualidade e o desenvolvimento embrionário (Abe *et al.*, 2002; Enright *et al.*, 2000), diminuindo a criotolerância e as taxas de prenhez (Abe *et al.*, 2002; Enright *et al.*, 2000; Mundim *et al.*, 2009; Rizos *et al.*, 2002a; Tesfaye *et al.*, 2004). Além das diferenças devido ao sistema onde são produzidos, os embriões ainda sofrem influência do sexo. Estudos tem mostrado que embriões machos e fêmeas são diferentes quanto à velocidade de desenvolvimento (Avery *et al.*, 1992; Avery *et al.*, 1991), ao seu metabolismo, ao padrão de expressão de genes (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010a; Gad *et al.*, 2012c; Machado *et al.*, 2013a), aos padrões epigenéticos (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008) e a resistência a várias condições de estresse (Alomar *et al.*, 2008; Ghys *et al.*, 2016).

Portanto, estudos que visam esclarecer os efeitos que a criopreservação causa nos embriões devem levar em conta também o sexo dos embriões, já que esse pode influenciar na resposta a esse procedimento. Este estudo busca a identificação das mudanças moleculares que ocorrem em consequência da criopreservação em embriões PIV e, se essas mudanças variam de acordo com o touro utilizado para a inseminação e com o sexo do embrião.

1.1. Objetivos

O objetivo geral deste projeto foi avaliar o perfil transcricional de embriões PIV submetidos à vitrificação por *Cryotop* e identificar o efeito do touro e do sexo na resposta a esse procedimento.

Objetivos Específicos

- Avaliar, por microarranjo, o perfil transcricional de embriões bovinos PIV vitrificados pelo método *Cryotop*;
- Validar os resultados do microarranjo pela quantificação da expressão de genes selecionados por qPCR;
- Caracterizar a resposta de embriões macho e fêmea à vitrificação por *Cryotop*.

1.2. Hipótese

O método de vitrificação por *Cryotop* não afeta demasiadamente o perfil transcricional de embriões bovinos PIV.

A seleção morfológica dos melhores embriões PIV para a criopreservação é tendenciosa para seleção de embriões machos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O desenvolvimento embrionário inicial é um dos períodos mais críticos no desenvolvimento do mamífero. Esta fase inicial envolve diversas mudanças morfológicas e bioquímicas, muitas ainda desconhecidas, relacionadas à genômica e aos processos fisiológicos (Gad *et al.*, 2012c; Niemann e Wrenzycki, 2000). Existem evidências de que os embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo* (Abe *et al.*, 2002; Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007; De La Torre-Sanchez *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2000; Mucci *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2002c; Sudano *et al.*, 2012) e que essa criotolerância reduzida pode estar associada ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões (Abe *et al.*, 2002; Mucci *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2002b; Sudano *et al.*, 2011).

Portanto, estratégias que superem esses problemas buscando resultados melhores e mais estáveis para criopreservação de embriões PIV, têm sido propostas enfocando, principalmente, duas áreas. A primeira se refere às alterações nos métodos de criopreservação, como por exemplo, alteração na concentração e tipo de crioprotetor, e alteração nos tempos e temperaturas de resfriamento (Block *et al.*, 2009; Inaba *et al.*, 2011; Kuwayama, 2007; Kuwayama *et al.*, 2005b; Liu *et al.*, 2008; Loutradi *et al.*, 2008; Taniguchi *et al.*, 2007; Vajta *et al.*, 1998; Vajta e Kuwayama, 2006). A outra é a indução de modificações nas células do embrião de forma que se tornem mais criotolerantes, como por exemplo, alterações nas condições de cultivo para minimizar a influência negativa no alto conteúdo de lipídeos (Abe *et al.*, 2002; Paschoal *et al.*, 2014; Rizos *et al.*, 2002b; Sanches *et al.*, 2013; Seidel, 2006; Sudano *et al.*, 2011; Sudano *et al.*, 2012).

Agregado a esses fatores, adquirir conhecimento mais abrangentes sobre o funcionamento fisiológico, ultraestrutural e molecular das diferentes fases do desenvolvimento embrionário é imprescindível para que sejam aclaradas exigências inerentes a cada etapa, e se obtenha resultados mais eficientes e estáveis com as técnicas de criopreservação.

2.1. Diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e produzidos *in vivo*

O desenvolvimento embrionário inicial é um dos períodos mais críticos no desenvolvimento do mamífero. Esta fase inicial envolve diversas mudanças morfológicas e bioquímicas, muitas ainda desconhecidas, relacionadas à genômica e aos processos fisiológicos (Gad *et al.*, 2012c; Niemann e Wrenzycki, 2000). Existem evidências de que os embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo* (Abe *et al.*, 2002; Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007; De La Torre-Sanchez *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2000; Mucci *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2002c; Sudano *et al.*, 2012) e que essa criotolerância reduzida pode estar associada ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões (Abe *et al.*, 2002; Mucci *et al.*, 2006; Rizos *et al.*, 2003; Rizos *et al.*, 2002b; Sudano *et al.*, 2011).

Portanto, estratégias que superem esses problemas buscando resultados melhores e mais estáveis para criopreservação de embriões PIV, têm sido propostas enfocando, principalmente, duas áreas. A primeira se refere às alterações nos métodos de criopreservação, como por exemplo, alteração na concentração e tipo de crioprotetor, e alteração nos tempos e temperaturas de resfriamento (Block *et al.*, 2009; Inaba *et al.*, 2011; Kuwayama, 2007; Kuwayama *et al.*, 2005b; Liu *et al.*, 2008; Loutradi *et al.*, 2008; Taniguchi *et al.*, 2007; Vajta *et al.*, 1998; Vajta e Kuwayama, 2006). A outra é a indução de modificações nas células do embrião de forma que se tornem mais criotolerantes, como por exemplo, alterações nas condições de cultivo para minimizar a influência negativa no alto conteúdo de lipídeos (Abe *et al.*, 2002; Paschoal *et al.*, 2014; Rizos *et al.*, 2002b; Sanches *et al.*, 2013; Seidel, 2006; Sudano *et al.*, 2011; Sudano *et al.*, 2012).

Agregado a esses fatores, adquirir conhecimento mais abrangentes sobre o funcionamento fisiológico, ultraestrutural e molecular das diferentes fases do desenvolvimento embrionário é imprescindível para que sejam aclaradas exigências

inerentes a cada etapa, e se obtenha resultados mais eficientes e estáveis com as técnicas de criopreservação.

2.2. Fatores que afetam a criopreservação

O objetivo da criobiologia é a preservação das funções celulares após conservação em baixas temperaturas. Para alcançar isto, é necessário eliminar duas causas principais de morte celular associada com a criopreservação – a formação de cristais e as concentrações letais de solutos, enquanto se mantém a capacidade funcional das organelas intracelulares (Edgar e Gook, 2012).

Todos os embriões sofrem consideráveis injúrias morfológicas e funcionais durante a criopreservação, mas a extensão dos danos assim como as diferenças nas taxas de sobrevivência e desenvolvimento pós-criopreservação podem variar de acordo com fatores como a espécie, o tipo de embrião, o método de congelamento, a idade e o estágio de desenvolvimento, o ambiente de cultivo, o sexo, dentre outros. Neste sentido, esforços têm sido concentrados e estudos realizados em torno de todos esses fatores. Entretanto, as inúmeras variáveis diferentes e existentes entre os trabalhos tornam as comparações bastante restritas.

2.2.1. Métodos de criopreservação

Atualmente, dois métodos são utilizados para a criopreservação de embriões: congelamento lento ou clássico, e vitrificação. A principal questão sobre eles permanece em qual dos métodos satisfaz melhor o princípio fundamental que é o de minimizar danos durante o armazenamento na criopreservação.

O congelamento clássico é utilizado em bovinos, principalmente, para a criopreservação de embriões produzidos *in vivo*. Esse método tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, mas isso permite a formação de cristais de gelo, que em maior ou menor escala resultarão em lesões às membranas e organelas. De forma prática e resumida, envolve equilíbrio das estruturas em uma ou duas soluções de desidratação, por um período de até 10 minutos antes de serem envasadas em palhetas plásticas (volume de até 0,25 mL), as quais são seladas em ambos os lados. As palhetas são então alocadas em suporte, dentro de um equipamento programável para congelamento que reduz lentamente a temperatura (aproximadamente 0,3 a 0,5 °C/

minuto) até atingir -30 à -35 °C. Durante esta fase de resfriamento, a indução da cristalização (*seeding*) é manual entre as temperaturas -5 e -8 °C. Quando alcançam -30 °C, a temperatura diminui rapidamente para -150 °C antes de serem armazenadas em nitrogênio líquido (Edgar e Gook, 2012; Kuleshova e Lopata, 2002). O rápido descongelamento é seguido de reidratação em concentrações decrescentes de crioprotetores permeáveis, normalmente na presença inicial de concentrações maiores de crioprotetores não permeáveis (Edgar e Gook, 2012).

Na vitrificação se utiliza altas concentrações de crioprotetores, que formam uma solução viscosa, e durante o resfriamento fazem com que a água da célula se solidifique em estado vítreo, sem se expandir, inibindo a formação de cristais de gelo (Rall e Fahy, 1985; Vajta e Nagy, 2006). Entretanto, a toxicidade dos crioprotetores é tanta, que as células só podem ser expostas a essa solução por um período muito curto de tempo e/ou um volume mínimo de solução (Edgar e Gook, 2012; Kuwayama *et al.*, 2005a). Desde que esse método foi desenvolvido, o objetivo dos diferentes protocolos e modelos propostos visam à redução na concentração e volume dos crioprotetores e no aumento da curva de congelamento. Com base nisso, diferentes dispositivos de suporte foram desenvolvidos para reduzir o volume e permitir o contato rápido com nitrogênio líquido, incluindo grades de cobre de microscopia eletrônica (Martino *et al.*, 1996), *open pulled straw* – OPS (Vajta *et al.*, 1998), *CryoLoop* (Lane *et al.*, 1999), micro-gotas (Papis *et al.*, 2000), superfície sólida (Dinnyes *et al.*, 2000), grades de nylon (Matsumoto *et al.*, 2001), sistema *hemi-straw* (Vanderzwalmen *et al.*, 2003) e *Cryotop* (Kuwayama *et al.*, 2005b).

Apesar de o congelamento clássico continuar sendo mais utilizado para embriões *in vivo*, a técnica OPS desenvolvida por Vajta *et al.* (1998) provocou um grande impacto no uso da vitrificação, sendo até meados de 2010 a técnica mais utilizada para embriões PIV de várias espécies de mamíferos. Apesar de alguns autores não encontrarem diferenças entre a vitrificação em palheta de 0,25 mL e o congelamento clássico quanto à eclosão pós-criopreservação em bovinos (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007; Sanches *et al.*, 2016), a maioria relata resultados melhores com a vitrificação em embriões bovinos PIV (Block *et al.*, 2009; Leme, 2008; Siqueira Filho *et al.*, 2011; Vajta *et al.*, 1998).

Já a vitrificação pelo método de *Cryotop* (Kuwayama *et al.*, 2005b), tem recebido especial atenção em várias espécies, mas principalmente em humanos. Esse consiste de uma haste de polipropileno na qual os embriões são alocados junto a

volumes mínimos de solução de crioprotetor. O método tem-se mostrado como melhor alternativa para vitrificação de ovócitos (Cobo *et al.*, 2008; Kuleshova e Lopata, 2002; Kuwayama *et al.*, 2005b; Morato *et al.*, 2008; Spricigo *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2010), apesar dos baixos índices obtidos. Com relação à criopreservação de embriões, os relatos comparando esse método com outros procedimentos têm tomado lugar nas pesquisas, mas muitas vezes são de difícil comparação. Inaba *et al.* (2011) compararam embriões *in vivo* e PIV criopreservados com congelamento clássico, vitrificação em palheta e em vitrificação por *Cryotop*, e observaram que a taxa de eclosão às 48 horas foi maior na técnica *Cryotop* do que nos outros métodos. Entretanto, nem o método nem o tipo de embrião afetou a taxa de prenhez. Resultados anteriores, comparando a técnica de vitrificação por *Cryotop* ao congelamento clássico. utilizou embriões em estágio de blastocisto expandido (BX), mostrando taxas de eclosão às 48 horas maiores em embriões vitrificados do que nos submetidos ao congelamento clássico (Diógenes *et al.*, 2012).

A comparação entre os métodos de congelamento clássico e vitrificação tem sido realizada principalmente em relação à morfologia, tais como número de células, re-expansão e eclosão. O grupo de Stinshoff *et al.* (2011) comparando a vitrificação e a criopreservação lenta não encontraram diferenças entre estes métodos no que se refere à re-expansão, eclosão e número de células mortas. Entretanto, mostraram claramente que a criopreservação em ambos os métodos afetou a qualidade dos embriões em nível molecular, causando alterações na expressão de alguns genes. Por sua vez, a alteração foi menor nos embriões vitrificados do que nos submetidos ao congelamento clássico.

2.2.2. Estágio / Qualidade do embrião

Tem sido sugerido que a sensibilidade ao resfriamento depende do estágio de desenvolvimento e das condições de cultivo, bem como da presença de lipídeos no estágio inicial de desenvolvimento. A criopreservação de embriões bovinos nos primeiros estágios de desenvolvimento pré-implantacional (mórula inicial ou compacta) mostram menor taxa de recuperação após o descongelamento em relação aos estágios mais adiantados, como blastocistos (Tominaga, 2004), diferentemente do que acontece com embriões humanos (Kuleshova e Lopata, 2002).

De acordo com Dinnyes *et al.* (2006), a sobrevivência de embriões criopreservados é fortemente correlacionada à idade, ao estágio de desenvolvimento e à qualidade morfológica dos mesmos. Apesar disso, a predição para criotolerância baseada nessas características é instável, pois muitos embriões classificados como bons por técnicos experientes, seguindo critérios pré-estabelecidos para boa qualidade, mostraram características de estágios degenerativos sob microscopia eletrônica em 30% dos casos (Aguilar *et al.*, 2002).

Não existe um consenso de qual o melhor estágio de desenvolvimento a ser criopreservado (Saragusty e Arav, 2011). Entretanto, resultados têm mostrado que o momento da primeira clivagem após a inseminação tem maior potencial ao desenvolvimento e influenciam a taxa de blastocistos, o número total de células e a sobrevivência dos blastocistos bovinos submetidos à vitrificação (Carrocera *et al.*, 2016; Grisart *et al.*, 1994; Holm *et al.*, 1998; Van Soom *et al.*, 1992). Soma-se a isso, diversos estudos com embriões bovinos sugerem que os primeiros embriões a alcançar o estágio de duas células e/ou os que atingem estágio mais avançado no mesmo dia de cultivo, isto é, os que se desenvolvem mais rápido ou apresentam maior diâmetro são de melhor qualidade e mais propensos a sobreviver à criopreservação (Carrocera *et al.*, 2016; George *et al.*, 2008; Saha *et al.*, 1996).

Quando blastocistos (BL) e BX de D6,5 e D7,5 foram cultivados na presença de soro fetal bovino (SFB) e/ou albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF) como suplementos proteicos na maturação *in vitro* (MIV) e no cultivo *in vitro* (CIV), foi observado que embriões BX mostraram melhores taxas de re-expansão e eclosão, comparados aos do estágio de BL, independente do tratamento utilizado (Leme, 2008), quando vitrificados pelo método de OPS (do inglês, *Open Pulled Straw*). Da mesma forma, outro grupo de pesquisa (Morato *et al.*, 2010) avaliando a taxa de eclosão após a vitrificação com *Cryotop* de embriões PIV de D7 e D8 nos estágios de blastocisto inicial, expandido e eclodido, observaram que os mais avançados no desenvolvimento tiveram melhor taxa de eclosão em relação aos menos desenvolvidos. Outro estudo (Florentino *et al.*, 2013) mostrou que embriões transferidos em D7, com estágio mais avançado de desenvolvimento (BX e Blastocisto em eclosão [BE]) apresentaram maior índice de prenhez, quando comparados aos estágios embrionários iniciais. Além disso, BX transferidos em D6 apresentaram taxas de prenhez superiores aos transferidos em D7, que por sua vez obtiveram taxas melhores aos BX transferidos em D8 (Zucolloto *et al.*, 2003). Esses resultados confirmam que a qualidade se refere

não só à aparência morfológica e ao estágio de desenvolvimento, mas também à idade em que este atinge determinado estágio.

2.2.3. Sexo / Qualidade do embrião

Embriões bovinos macho e fêmea mostram diferenças contrastantes não apenas no cromossomo complementar, mas também nas atividades transcricionais (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010a; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010b; Peippo *et al.*, 2001) e epigenéticas (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010a; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010b; Peippo *et al.*, 2001). Alterações no ambiente de desenvolvimento embrionário podem causar efeitos a longo prazo, que se estendem para a vida pós-natal (Hansen *et al.*, 2010). Os fatores que levam à predileção de um ou outro cromossomo de origem masculina no momento da fecundação são variados (Alomar *et al.*, 2008; Avery *et al.*, 1992; Avery *et al.*, 1991; Enright *et al.*, 2000; Gutierrez-Adan *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 2010; Lonergan *et al.*, 1999; Parrish *et al.*, 1995; Rizos *et al.*, 2008a; Thornhill e Burgoyne, 1993).

Dentre os fatores que têm sido relatados como influenciadores da proporção macho:fêmea em embriões bovinos, estão o nível de testosterona do fluido folicular, tempo de inseminação, estágio de maturação do ovócito no momento da inseminação. Cita-se ainda que no momento da ovulação, o ovócito já está fisiologicamente suscetível a receber o espermatozoide X ou Y (Hylan *et al.*, 2009). Alterações fisiológicas que interferem na proporção entre gêneros têm sido associadas a diversos fatores ambientais e intrínsecos como o clima, práticas de reprodução, saúde materna e histórico reprodutivo, ou mesmo o sexo da prole anterior. Existem muitas evidências de que hormônios maternos têm papel importante no controle da razão entre sexo (Garcia-Herreros *et al.*, 2010; Grant *et al.*, 2008). O hormônio mais frequentemente relacionado na alteração deste balanço é a testosterona, que em altas concentrações no fluido folicular tem sido correlacionada ao nascimento de machos em ratos e ovinos. Sugere-se também que essa associação de gênero da prole com a testosterona pode desencadear a dominância materna ou o estresse do ambiente. Em conjunto, estas observações sugerem que hormônios esteroides *in vitro* podem causar impacto na razão entre sexos (Garcia-Herreros *et al.*, 2010; Macaulay *et al.*, 2013).

Em bovinos, atribui-se a diferença da razão entre gêneros dos embriões PIV como uma das possíveis consequências dos sistemas utilizados (Tan *et al.*, 2016; Tarín *et al.*, 2014), podendo ainda ser oriunda dos ovários selecionados, devido influência hormonal fisiológica (Grant *et al.*, 2008; Hylan *et al.*, 2009; Macaulay *et al.*, 2013) para aspiração folicular e seleção ovocitária.

Além disso, diversas considerações no planejamento experimental são necessárias para averiguar quais alterações nos meios PIV irão afetar essa proporção. A utilização de óleo e materiais plásticos nos sistemas de PIVE devem também ser levados em conta, visto que ambos atuam removendo alguma quantidade de hormônios dos meios. A pureza dos suplementos é também um fator relevante, pois em geral os regentes solúveis em água são adicionados diretamente ao meio, mas substâncias hidrofóbicas na maioria das vezes são dissolvidas em agentes orgânicos, como etanol e dimetilsulfóxido (DMSO), para depois serem incorporados ao meio final. Agentes orgânicos já demonstraram anteriormente exercer impactos negativos ao desenvolvimento embrionário (Macaulay *et al.*, 2013).

O sexo do embrião influencia a cinética do seu desenvolvimento (Alomar *et al.*, 2008; Avery *et al.*, 1992; Avery *et al.*, 1991; Kochhar *et al.*, 2003), seu metabolismo e a resistência a várias condições de estresse, sendo que embriões machos são considerados mais resistentes que os embriões fêmeas (Alomar *et al.*, 2008; Ghys *et al.*, 2016; Rubessa *et al.*, 2011; Tominaga, 2004). Em camundongos e bovinos, embriões machos PIV tendem a se desenvolver mais rápido do que embriões fêmeas (Alomar *et al.*, 2008; Kochhar *et al.*, 2003; Peippo *et al.*, 2001). O dimorfismo sexual na transcrição embrionária é afetado pelo metabolismo de carboidratos e aminoácidos, sendo que embriões fêmeas mostram metabolismo mais lento (Rubessa *et al.*, 2011).

Como mencionado, as condições de cultivo também podem influenciar o desenvolvimento de embriões dependendo do seu gênero. Por exemplo, glicose pode acelerar o desenvolvimento de embriões machos e retardar o de embriões fêmeas (Bredbacka e Bredbacka, 1996; Peippo *et al.*, 2001; Rubessa *et al.*, 2011), enquanto que condições de estresse estão associadas à morte de mais embriões fêmeas do que machos (Ghys *et al.*, 2016; King *et al.*, 1992). Machado *et al.* (2012), que cultivaram embriões no sistema PHD (*post hatching development*) até D14, observaram que a porcentagem de machos que cresceram no sistema foi maior ($p < 0,001$) no grupo de embriões qualidade I (95%), mas similar em qualidade 2 (39%) e qualidade 3 (71%). Embriões que não foram utilizados para essa finalidade, em D9 foram sexados e mostraram ser,

em sua maioria, fêmeas (60%). Porém para embriões *in vivo*, não observou-se diferença entre a proporção macho:fêmea ou quanto ao tamanho desses embriões no D14 (Machado *et al.*, 2013b).

Apesar de blastocistos macho e fêmea possuírem o mesmo DNA autossômico, a transcrição ou tradução específica do gênero, acontecem. As diferenças relacionadas ao sexo podem ser exacerbadas na PIV quando comparadas aos embriões *in vivo*, uma vez que a inativação do cromossomo X parece ser prejudicada por alguma condição presente quando *in vitro* (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010a; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010b).

Em mamíferos, a expressão de diversos genes, como o Xist de camundongo, o G6PD, ZFX, HPRT e INF-t de bovino e Zfy e Sry de camundongo, é diferente em cada sexo (Kobayashi *et al.*, 2006). Avaliando o gene G6PD em embriões bovinos, uma maior expressão foi encontrada em embriões fêmeas de D15 (Machado *et al.*, 2013a); entretanto, Bermejo-Alvarez *et al.* (2010a), avaliando os mecanismos em nível transcricional ligados ao dimorfismo sexual através do perfil da expressão gênica por microarranjo em embriões pré-implantação PIV, não encontraram diferenças entre a expressão desses seis genes avaliados em blastocistos bovinos, machos e fêmeas, *in vivo* e *in vitro*, mostrando que as condições de cultivo oferecidas não alteraram o dimorfismo sexual.

Porém, existem poucos relatos sobre análise global de expressão de genes em embriões sexados, muito pelo fato da dificuldade técnica em sexar muitos blastocistos de forma rápida e eficiente (Kobayashi *et al.*, 2006). A maioria dos estudos evidenciam poucos genes e em relação à avaliação do transcriptoma quanto a determinação do sexo ainda são escassos, principalmente considerando-se a espécie bovina.

2.3. Efeito do Touro na Produção *in vitro* de embriões

Apesar da PIVE estar bem estabelecida e sendo rotineiramente utilizada, existe uma grande variação com relação às taxas de clivagem e produção de blastocistos. Essas diferenças são determinadas por vários fatores decorrentes das etapas que constituem o sistema, entre eles a variação individual entre reprodutores.

As diferenças existentes entre touros podem ocorrer, tanto na capacidade fecundante como na competência de desenvolvimento embrionário (De Alencar Coelho

et al., 1998), e não podem ser explicadas somente por análises de viabilidade ou morfologia espermáticas convencionais. Essas diferenças podem ser vislumbradas na cinética de desenvolvimento (Ward *et al.*, 2001), na taxa de fecundação (Ward *et al.*, 2003), na taxa de clivagem (Fernandes *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2003) e de blastocisto (Fernandes *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1997) e no desenvolvimento pós-eclosão (Carreira *et al.*, 2012; Samardzija *et al.*, 2006a).

O efeito individual do touro tem sido comprovado em diversos estudos (An *et al.*, 2017; Demyda-Peyras *et al.*, 2015; Flowers, 2013; Palma, 2001; Parrish, 2014), sendo que os relatos de Palma (2001) mostraram uma variação de produção de blastocistos de 10 a 57% quando compararam 40 e 60 touros, em dois experimentos.

Vários fatores podem ser responsáveis pela variação observada entre touros na PIVE. Dentre eles, a concentração de heparina e a concentração de espermatozoides na dose inseminante têm sido relatadas influenciando positiva ou negativamente dependendo de cada reprodutor. O uso de sêmen congelado, tão comum na PIV, apresenta esses dois pontos críticos de ajuste para maximizar os resultados de fertilidade de um dado touro: ou altera-se a concentração de heparina e/ou a dose inseminante, o necessário para melhorar a penetração espermática e minimizar a poliespermia (Parrish, 2014).

Considerando que a heparina induz a capacitação do espermatozoide bovino (Parrish, 2014), e que a resposta a esse estímulo depende de receptores na membrana plasmática do espermatozoide, é esperado que haja uma variação entre reprodutores de acordo com a concentração de heparina. De fato, Barcelo-Fimbres *et al.* (2011) demonstraram que há touros que têm ótimas taxas de produção de blastocistos com baixa concentração de heparina e diferentes concentrações de espermatozoides na dose inseminante. An *et al.* (2017), testaram diferentes concentrações (0 a 100 µg/mL) de heparina em sêmen bovino sexado e não sexado para quatro touros, mostrando que alguns animais responderam com melhores taxas de clivagem e blastocistos com doses menores, outros com doses maiores e uns que não tiveram diferença nas taxas independentemente da concentração de heparina utilizada.

Com relação à concentração espermática, Demyda-Peyras *et al.* (2015) mostraram que concentrações muito elevadas de espermatozoides na dose inseminante (10 milhões /mL), diminuíram a taxa de clivagem e também o número de embriões PIV sem alterações cromossômicas. Outro fator que mostra diferença entre touros é o padrão de congelamento para o sêmen sexado, em que a concentração de espermatozoides por

palheta congelada é bastante reduzida. Devido a isso, alguns autores atribuem a baixa eficiência de sêmen sexado ao processo de separação dos espermatozoides, por citometria de fluxo. O processo alterou as características morfológicas das células, mas não comprometeu a fecundação ou o desenvolvimento embrionário (Carvalho *et al.*, 2010). Xu *et al.* (2006) relatam que a citometria de fluxo afetou a FIV de espermatozoides sexados para alguns dos touros testados, entretanto não foi um fator significativo para todos.

Mesmo quando algumas variáveis (como a concentração espermática e de heparina) são padronizadas, os problemas de morfologia podem aparecer por outros motivos. Fernandes *et al.* (2008) fizeram uma relação entre as características das células espermáticas e a FIV de touros da raça Nelore, que tiveram degeneração testicular induzida por insulação escrotal, um método clássico para avaliar para o estudo da variação da qualidade espermática. As análises foram realizadas 7, 14 e 21 dias após o procedimento. A incidência de defeitos de cabeça, vacúolos nucleares e anormalidade de cromatina aumentaram nos touros dos grupos 14 e 21 dias após a remoção do adereço para induzir a insulação escrotal, e também houve diminuição das taxas de clivagem e, principalmente, as taxas de produção de embriões nestes mesmos grupos, comparadas aos tratamentos controle e o de 7 dias após o término da insulação.

As características como membrana plasmática intacta, presença de proteínas na membrana, cromatina normal ou danificada medem o desempenho relacionado à morfologia do espermatozoide. Há outros traços, tais como ligação espermática e fecundação *in vitro*, que aferem propriedades funcionais devido à combinação de muitas características individuais (Flowers, 2013).

Estas diferenças de origem paterna em resposta à inseminação heterospérmica podem ser visualizadas como falhas de espermatozoides competentemente férteis e apontam para o envolvimento de outros fatores que interagem com os espermatozoides durante a fecundação. Um desses fatores é a presença de proteínas do plasma seminal (Flowers, 2013). As proteínas do plasma seminal têm mostrado influenciar muitos processos importantes associados à fecundação, incluindo a regulação da função uterina após a monta (Rozeboom *et al.*, 1998), ovulação (Waberski, 1997), capacitação no oviduto (Petrunikina *et al.*, 2001) e interações ovócito-espermatozoide (Caballero *et al.*, 2008).

Acrescido a isto, sabe-se que outro fator que afeta a produção de blastocistos na PIV é o método de seleção espermática (Abraham *et al.*, 2016; Parrish,

2014; Samardzija *et al.*, 2006a), pois a preparação do sêmen é capaz de aumentar significativamente a sua qualidade em relação à motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais (Samardzija *et al.*, 2006a). A seleção morfológica, dependendo do método, pode eliminar a maioria dos defeitos de cauda e de peça intermediária (Abraham *et al.*, 2016; Alomar *et al.*, 2008; Avery e Greve, 1995; Dode *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2009; Parrish, 2014; Parrish *et al.*, 1995; Samardzija *et al.*, 2006a).

Diversos métodos estão disponíveis para a seleção espermática, incluindo *swim up*, gradientes de densidade e lavado por centrifugação. Embora exista diferença entre esses métodos em relação às taxas de fecundação ou produção de blastocistos, gradientes de densidade (*Percoll*, *PureSperm* e *BoviPure*) são os mais utilizados na PIVE de bovinos (Abraham *et al.*, 2016; Avery e Greve, 1995; Machado *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2003; Parrish *et al.*, 1995; Samardzija *et al.*, 2006a). Apesar de amplamente utilizado, o *Percoll* apresenta efeito tóxico para as células, e por isso alternativas como o *BoviPure* e o *PureSperm*, têm sido propostas como substitutos a ele (Mendes *et al.*, 2003; Samardzija *et al.*, 2006a).

Em estudos pioneiros, Parrish *et al.* (1995) e Somfai *et al.* (2002) não encontraram diferença de característica morfológicas entre os métodos *swim up* e *Percoll*, embora concentração espermática e motilidade inferiores tenham sido notadas no método de *swim up*. Quanto as taxas de clivagem, Cesari *et al.* (2006) não encontraram diferença entre os protocolos, mas as taxas de blastocistos foram maiores quando o *Percoll* foi utilizado. Quando confrontados os métodos de lavagem e *Percoll*, Demyda-Peyras *et al.* (2015) obtiveram maiores taxas de clivagem embrionária com o *Percoll*. Mendes *et al.* (2003), corroboram com os achados de que os métodos de seleção espermática por gradiente, produzem melhores taxas de clivagem e blastócitos. Comparando-se os principais protocolos de seleção por gradiente, não foi encontrado diferença entre os parâmetros de avaliação espermática. Para Samardzija *et al.* (2006b), as taxas de clivagem e blastocistos em D7 foi maior para o método *BoviPure*, mas o número de embriões eclodidos não diferiu entre os protocolos.

Independentemente do método utilizado, os melhores resultados de fecundação são obtidos em períodos de co-incubação entre ovócitos e espermatozoides diversos. Para bovinos, em condições *in vitro*, a penetração espermática ocorre entre 5-12 horas (Dode *et al.*, 2002; Hyttel *et al.*, 1988; Xu e Greve, 1988). Como mencionado por Puglisi *et al.* (2004), as diferenças de velocidade da penetração espermática estão

relacionadas à capacitação espermática, reação acrossomal e ligação à zona pelúcida. Quanto à cinética de desenvolvimento, a comparação entre os estudos em bovinos se torna difícil devido não só a escassez de avaliações desse parâmetro, mas também aos distintos métodos e sistemas adotados pelos diferentes autores. Entretanto, Alomar *et al.* (2008) comparando 4 touros e observando o desenvolvimento embrionário com auxílio do *time-lapse*, mostraram que não houve diferença entre os touros no desenvolvimento entre a clivagem e o estágio de blastocisto. Da mesma forma, Carvalho *et al.* (2010) utilizando sêmen sexado de 4 touros, e Barcelo-Fimbres e Seidel (2007), utilizando meios enriquecidos para melhorar a qualidade do embrião, também não encontraram diferença entre touros na cinética de desenvolvimento embrionário.

Em relação à proporção de embriões macho e fêmea, pouco se sabe sobre o possível impacto do touro na distribuição de sexo após a FIV, mas existe um consenso de que embriões PIV são na sua maioria machos (Darwish *et al.*, 2009; Lonergan *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2013a; Xu *et al.*, 1992), e a diferença se torna mais evidente a medida que o embrião cresce (Machado *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2013b), quando avaliados em D14 e D15. Os fatores que levam à predileção de um ou outro cromossomo de origem masculina no momento da fecundação são variados (Alomar *et al.*, 2008; Avery *et al.*, 1992; Avery *et al.*, 1991; Burgoyne, 1993; Enright *et al.*, 2000; Gutierrez-Adan *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 2010; Lonergan *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2013a; Parrish *et al.*, 1995; Rizos *et al.*, 2008a).

O uso de espermatozoides que passaram por estresse térmico ou radiações gama resultam claramente em menores taxas de blastocistos e maiores índices de apoptose após a FIV (Walters *et al.*, 2005a; Walters *et al.*, 2005b). O desenvolvimento embrionário normal depende da manutenção da população de células normais e saudáveis dentro de cada embrião. O efeito de espermatozoides normais qualitativamente na apoptose embrionária, bem como a função exata desse mecanismo no embrião permanece não elucidado completamente (Vandaele *et al.*, 2006). No desenvolvimento embrionário, essa influência ocorre antes da clivagem até o estágio de 2 células, anterior até mesmo da expressão do genoma embrionário. (Walters *et al.*, 2005b).

Ao penetrar o ovócito, a cromatina espermática é submetida a um remodelamento extenso, resultando na reorganização do genoma paterno dentro do pró-núcleo masculino. Por isso, qualquer forma de anormalidade na cromatina espermática ou dano ao DNA pode resultar em infertilidade masculina ou levar à falha na

concepção, abortos, malformações e doenças genéticas (Evenson, 1999; Sakkas *et al.*, 1999; Walters *et al.*, 2005a). A integridade do DNA é essencial para a transmissão acurada da informação genética, sendo que as causas de danos ao DNA espermático são variadas, como apoptose, metabolismo celular alterado e estresse oxidativo (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2008; Walters *et al.*, 2005b), fragmentação do DNA, compactação anormal da cromatina e defeitos epigenéticos (Tavalaee *et al.*, 2009). Em mamíferos, a metilação correta do DNA para reprogramação e manutenção do *imprinting* genômico durante a gametogênese são essenciais para o desenvolvimento embrionário (Newell-Price *et al.*, 2000). Estudos em humanos e animais sugerem que mecanismos epigenéticos podem servir na transmissão de características fenotípicas induzidas pelo ambiente de pais para os descendentes. Tais características têm sido associadas com expressão de genes alterada na primeira, segunda e terceira geração (Siklenka *et al.*, 2015).

Uma das causas de perda embrionária por efeito do touro é a indução de anormalidades cromossômicas devido a espermatozoides defeituosos. Dessa forma, touros com cromatina normal, estável têm maior probabilidade de gerar descendentes do que touros com esse déficit (Walters *et al.*, 2005b). É importante ressaltar que mesmo quando um espermatozoide com algum dano de DNA é utilizado, a descondensação nuclear, a formação de pró-núcleos e inclusive, o desenvolvimento embrionário normalmente podem ocorrer. De fato, relatos utilizando camundongos como modelo, indicaram que a célula espermática com DNA danificado pode fecundar um ovócito e produzir embriões de boa qualidade no período inicial, pois o ovócito tem capacidade de reparar parte dos danos, desde que a população de espermatozoides com DNA prejudicado não ultrapasse 8% (Ahmadi e Ng, 1999). Em bovinos, déficit na compactação da cromatina parecem estar associados ao aumento da dimensão da cabeça do espermatozoide, e quando presente até 16% numa amostra, essa menor compactação não afetou embriões PIV (Kipper *et al.*, 2017). No entanto, à medida que os danos ao DNA aumentam, o sucesso de desenvolvimento e/ou levar uma prenhez à termo diminui. Uma alternativa interessante para evitar o efeito do touro, seria o uso de *pools* de sêmen de vários touros, ao invés de apenas um (Ahmadi e Ng, 1999; Kipper *et al.*, 2017).

A transmissão materna e paterna de tais efeitos tem sido relatada como alteradores da metilação do DNA em células germinativas. No espermatozoide, a metilação do DNA em promotores de genes em que elementos repetitivos são

frequentemente metilados é incomum. A maioria dos estudos relatam apenas alterações mínimas na metilação de DNA em espermatozoides em regiões enriquecidas com CpG que tem sido associada com a transmissão de características induzidas ambientalmente. A herança epigenética paterna transgeracional pode, no entanto, envolver alterações no padrão de histonas, RNA e /ou outros componentes espermáticos. A função das histonas espermáticas e suas alterações no desenvolvimento embrionário e herança epigenética são desconhecidas (Siklenka *et al.*, 2015). Poucos são os estudos que avaliam as alterações no padrão de metilação das células espermáticas devido a fatores ambientais e seus efeitos na produção de embriões. Carvalho *et al.* (2012) avaliaram a metilação do DNA dos genes *imprinted* IGF2 e IGF2R de espermatozoides submetidos ao processo de sexagem e não encontraram diferença para a produção de blastocistos em D7 (Carvalho *et al.*, 2010). Esses autores assumiram que o estresse causado pelo processo de sexagem das células espermáticas não afetou o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, mas não descartaram a possibilidade de que esse estresse poderia causar danos tardios no embrião, como após a implantação.

Alguns estudos têm mostrado que defeitos moleculares correlacionados com a falha na fecundação podem ocorrer em espermatozoides morfologicamente normais. Atualmente sabe-se que espermatozoides provêm proteínas e RNAs que são essenciais para o desenvolvimento subsequente. Os microRNAs (miRNAs) são uma classe nova de reguladores pós-transcricionais. Estes RNAs não codificam proteínas, entretanto funcionam como moduladores da expressão gênica (Yadav e Kotaja, 2014). Suas funções conhecidas, e estabilidade intrínseca fazem deles fortes candidatos para a regulação da expressão de genes em gametas e embriões (Tscherner *et al.*, 2014).

Muitas evidências têm mostrado que eles são expressos de uma forma específica para a célula ou o estágio durante a espermatogênese. Determinados miRNAs têm sido identificados como mediadores da diferenciação de espermatogônias, embora poucos trabalhos relatam as funções dos microRNAs na espermatogênese e fertilidade (Chen *et al.*, 2017). Em mamíferos, os espermatozoides transmitem RNA mensageiro com funções desconhecidas durante a fecundação. Apesar disso implicar em herança epigenética, seu desempenho na fecundação e/ou desenvolvimento embrionário ainda é desconhecido (Liu *et al.*, 2012).

Alguns miRNAs específicos têm sido explorados como potenciais biomarcadores para infertilidade do macho (Yadav e Kotaja, 2014). Outros levam a uma alteração na progressão meiótica, ao aumento significativo da apoptose em

espermátocitos, um número reduzido de espermátides ovais e defeitos morfológicos em espermatozoides (Chen *et al.*, 2017). Os perfis dos pequenos RNAs de espermatozoides podem representar um parâmetro útil que é correlacionado com a fertilidade do macho, de modo que o status de alta ou baixa fertilidade de touros têm mostrado diferentes assinaturas de miRNAs (Tscherner *et al.*, 2014).

A maioria dos miRNAs desaparecem durante a espermiogênese. O miRNA-34 está presente no espermatozoide e em zigotos de camundongos, mas não em ovócitos e embriões nos estágios após uma célula (Liu *et al.*, 2012). Em bovinos, todos os membros da família miRNA-34 estão presentes no espermatozoide, enquanto somente o miRNA-34a e -34c são encontrados em ovócitos e embriões com duas células. O miRNA-34c mostrou variação entre diferentes touros e está bastante expresso durante a maturação ovocitária e no embrião. O transcrito primário do miRNA-34b/c, bicistron, é abundante em tecidos testiculares e ovarianos, mas indetectável em ovócitos e espermatozoide maturo (Tscherner *et al.*, 2014).

Sobre a fecundação, em camundongos, o miRNA-34c é transmitido do espermatozoide para o zigoto, e reduz a expressão de Bcl-2 e p27, permitindo a entrada na fase S e primeira divisão da clivagem. Estes autores identificaram 16 miRNAs zigóticos que sugerem ser importantes para o desenvolvimento embrionário inicial, devido a um teste em que a inserção de um inibidor de miRNA-34c no zigoto bloqueou a síntese de DNA e suprimiu a primeira divisão da clivagem, sugerindo que este miRNA é necessário para o início da clivagem (Liu *et al.*, 2012).

As anotações dos miRNAs e a elucidação dos mecanismos que os regulam irão esclarecer as causas de esterilidade e infertilidade masculina, juntamente com as principais funções na espermatogênese e fertilidade (Chen *et al.*, 2017).

3 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, n. 1, p. 57-66, Jan 2002.
- Abraham, M. C.; Johannisson, A.; Morrell, J. M. Effect of sperm preparation on development of bovine blastocyst *in vitro*. **Zygote**, v. 24, n. 6, p. 825-830, 2016.
- Aguilar, M. M.; Galina, C. S.; Merchant, H.; Montiel, F.; Canseco, R.; Marquez, Y. C. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. **Reprod Domest Anim**, v. 37, n. 6, p. 341-6, Dec 2002.
- Ahmadi, A.; Ng, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **J Exp Zool**, v. 284, n. 6, p. 696-704, Nov 01 1999.
- Alomar, M.; Tasiaux, H.; Remacle, S.; George, F.; Paul, D.; Donnay, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal reproduction science**, v. 107, n. 1-2, p. 48-61, Aug 2008.
- An, L. Y.; Chaubal, S. A.; Liu, Y.; Chen, Y.; Nedambale, T. L.; Xu, J.; Xue, F.; Moreno, J. F.; Tao, S.; Presicce, G. A.; Du, F. Significant heparin effect on bovine embryo development during sexed *in vitro* fertilization. **J Reprod Dev**, v. 63, n. 2, p. 175-183, Apr 21 2017.
- Avery, B.; Greve, T. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for *in vitro* insemination. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 871-8, Oct 15 1995.
- Avery, B.; Jorgensen, C. B.; Madison, V.; Greve, T. Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 32, n. 3, p. 265-70, Jul 1992.
- Avery, B.; Madison, V.; Greve, T. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p. 953-63, May 1991.
- Barcelo-Fimbres, M.; Campos-Chillon, L. F.; Seidel, G. E., Jr. In vitro fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 3, p. 495-502, Jun 2011.

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, n. 11, p. 1395-405, Nov 2007.

Bermejo-Alvarez, P.; Lonergan, P.; Rath, D.; Gutierrez-Adan, A.; Rizos, D. Developmental kinetics and gene expression in male and female bovine embryos produced *in vitro* with sex-sorted spermatozoa. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 2, p. 426-36, 2010a.

Bermejo-Alvarez, P.; Rizos, D.; Rath, D.; Lonergan, P.; Gutierrez-Adan, A. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced *in vitro*. **Physiological genomics**, v. 32, n. 2, p. 264-72, Jan 17 2008.

Bermejo-Alvarez, P.; Rizos, D.; Rath, D.; Lonergan, P.; Gutierrez-Adan, A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3394-9, Feb 23 2010b.

Block, J.; Bonilla, L.; Hansen, P. J. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1063-71, Apr 15 2009.

Bredbacka, K.; Bredbacka, P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 106, n. 2, p. 169-72, Mar 1996.

Burgoyne, P. S. A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. **Development**, v. 117, n. 1, p. 341-5, Jan 1993.

Caballero, I.; Vazquez, J. M.; Garcia, E. M.; Parrilla, I.; Roca, J.; Calvete, J. J.; Sanz, L.; Martinez, E. A. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1352-5, Nov 2008.

Carreira, J. T.; Mingoti, G. Z.; Rodrigues, L. H.; Silva, C.; Perri, S. H.; Koivisto, M. B. Impact of proximal cytoplasmic droplets on quality traits and in-vitro embryo production efficiency of cryopreserved bull spermatozoa. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 1, Jan 12 2012.

Carrocerá, S.; Caamano, J. N.; Trigal, B.; Martín, D.; Díez, C. Developmental kinetics of *in vitro*-produced bovine embryos: An aid for making decisions. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 822-7, Mar 15 2016.

Carvalho, J. O.; Michalczechen-Lacerda, V. A.; Sartori, R.; Rodrigues, F. C.; Bravim, O.; Franco, M. M.; Dode, M. A. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Molecular reproduction and development**, v. 79, n. 2, p. 77-84, Feb 2012.

Carvalho, J. O.; Sartori, R.; Machado, G. M.; Mourao, G. B.; Dode, M. A. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1521-30, Dec 2010.

Cesari, A.; Kaiser, G. G.; Mucci, N.; Mutto, A.; Vincenti, A.; Fornes, M. W.; Alberio, R. H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1185-93, Sep 15 2006.

- Chen, X.; Li, X.; Guo, J.; Zhang, P.; Zeng, W. The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. **J Anim Sci Biotechnol**, v. 8, p. 35, 2017.
- Clemente, M.; Lopez-Vidriero, I.; O'Gaora, P.; Mehta, J. P.; Forde, N.; Gutierrez-Adan, A.; Lonergan, P.; Rizos, D. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 2, p. 285-95, Aug 2011.
- Cobo, A.; Bellver, J.; Domingo, J.; Perez, S.; Crespo, J.; Pellicer, A.; Remohi, J. New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. **Reprod Biomed Online**, v. 17, n. 1, p. 68-72, Jul 2008.
- Crosier, A. E.; Farin, P. W.; Dykstra, M. J.; Alexander, J. E.; Farin, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1459-65, May 2000.
- 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, n. 5, p. 1375-85, May 2001.
- Darwish, S.; Mahmoud, K.; Scholkamy, T. Preliminary trials for sexing of *in vitro* produced buffalo embryos using multiplex PCR. **Global Veterinaria**, v. 3, n. 3, p. 178-182, 2009.
- de Alencar Coelho, L.; Esper, C. R.; Garcia, J. M.; Vantini, R.; FILHO, I. R. S.; Almeida Jr, I. L. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Braz. j. vet. res. anim. sci**, v. 35, n. 3, p. 120-122, 1998.
- De La Torre-Sanchez, J. F.; Preis, K.; Seidel, G. E., Jr. Metabolic regulation of in-vitro-produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. **Reproduction, fertility, and development**, v. 18, n. 5, p. 585-96, 2006.
- Demyda-Peyras, S.; Dorado, J.; Hidalgo, M.; Moreno-Millan, M. Influence of sperm fertilising concentration, sperm selection method and sperm capacitation procedure on the incidence of numerical chromosomal abnormalities in IVF early bovine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, v. 27, n. 2, p. 351-9, Jan 2015.
- Dinnyes, A.; Dai, Y.; Jiang, S.; Yang, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 2, p. 513-8, Aug 2000.
- Dinnyes, A.; Meng, O.; Polgar, Z.; Boonksol, D.; Somfai, T. Criopreservação de embriões mamíferos. **Acta Sci Vet**, v. 1, p. 171-190, 2006.
- Diógenes, M.; Spricigo, J.; Dode, M. Vitricificação por cryotop vs. congelamento clássico: efeito nas taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV. **XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Foz do Iguaçu, PR, Brasil: SBTE**, 2012.
- Dode, M. A.; Rodovalho, N. C.; Ueno, V. G.; Fernandes, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Animal reproduction science**, v. 69, n. 1-2, p. 15-23, Jan 23 2002.
- Edgar, D. H.; Gook, D. A. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. **Hum Reprod Update**, v. 18, n. 5, p. 536-54, Sep-Oct 2012.

- 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**, v. 54, n. 5, p. 659-73, Sep 15 2000.
- Evenson, D. P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reproduction, fertility, and development**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 1999.
- 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. E53-62, 2004.
- Farin, P. W.; Crosier, A. E.; Farin, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 151-70, Jan 01 2001.
- Fernandes, C. E.; Dode, M. A.; Pereira, D.; Silva, A. E. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with *in vitro* fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1560-8, Dec 2008.
- Fernandez-Gonzalez, R.; Moreira, P. N.; Perez-Crespo, M.; Sanchez-Martin, M.; Ramirez, M. A.; Pericuesta, E.; Bilbao, A.; Bermejo-Alvarez, P.; de Dios Hourcade, J.; de Fonseca, F. R.; Gutierrez-Adan, A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 4, p. 761-72, Apr 2008.
- Florentino, C.; Mariani, A.; Souza, J.; Dias, F.; Santos, H.; Arrivabene, M.; Neves, W.; Souza, J.; Cavalcante, T.; Wischral, A. Pregnancy rates bovine recipients inoovulated with *in vitro* produced IVP embryos in the Legal Amazon. **Journal of Animal Science Advances**, v. 3, n. 4, p. 1, 2013.
- Flowers, W. L. Triennial Reproduction Symposium: sperm characteristics that limit success of fertilization. **Journal of animal science**, v. 91, n. 7, p. 3022-9, Jul 2013.
- Gad, A.; Hoelker, M.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Cinar, U.; Rings, F.; Held, E.; Dufort, I.; Sirard, M. A.; Schellander, K.; Tesfaye, D. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative *in vivo* and *in vitro* culture conditions. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 4, p. 100, Oct 2012a.
- Gad, A.; Schellander, K.; Hoelker, M.; Tesfaye, D. Transcriptome profile of early mammalian embryos in response to culture environment. **Animal reproduction science**, v. 134, n. 1-2, p. 76-83, Sep 2012b.
- Garcia-Herrerros, M.; Bermejo-Alvarez, P.; Rizos, D.; Gutierrez-Adan, A.; Fahey, A. G.; Lonergan, P. Intrafollicular testosterone concentration and sex ratio in individually cultured bovine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 3, p. 533-8, 2010.
- Gardner, D. K.; Pool, T. B.; Lane, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. **Semin Reprod Med**, v. 18, n. 2, p. 205-18, 2000.
- 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, n. 5, p. 612-23, Mar 15 2008.
- Ghys, E.; Dallemagne, M.; De Troy, D.; Sauvegarde, C.; Errachid, A.; Donnay, I. Female bovine blastocysts are more prone to apoptosis than male ones. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 591-600, Mar 01 2016.

Grant, V. J.; Irwin, R. J.; Standley, N. T.; Shelling, A. N.; Chamley, L. W. Sex of bovine embryos may be related to mothers' preovulatory follicular testosterone. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 5, p. 812-5, May 2008.

Grisart, B.; Massip, A.; Dessy, F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. **Journal of reproduction and fertility**, v. 101, n. 2, p. 257-64, Jul 1994.

Gutierrez-Adan, A.; Behboodi, E.; Andersen, G. B.; Medrano, J. F.; Murray, J. D. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured *in vitro* versus in the sheep oviduct. **Theriogenology**, v. 46, n. 3, p. 515-25, Aug 1996.

Hansen, P. J.; Block, J.; Loureiro, B.; Bonilla, L.; Hendricks, K. E. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 1, p. 59-66, 2010.

Holm, P.; Callesen, H. In vivo versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reproduction, nutrition, development**, v. 38, n. 6, p. 579-94, Nov-Dec 1998.

Holm, P.; Shukri, N. N.; Vajta, G.; Booth, P.; Bendixen, C.; Callesen, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1285-99, Dec 1998.

Hylan, D.; Giraldo, A. M.; Carter, J. A.; Gentry, G. T., Jr.; Bondioli, K. R.; Godke, R. A. Sex ratio of bovine embryos and calves originating from the left and right ovaries. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 5, p. 933-8, Nov 2009.

Hyttel, P.; Xu, K. P.; Greve, T. Ultrastructural abnormalities of *in vitro* fertilization of *in vitro* matured bovine oocytes. **Anat Embryol (Berl)**, v. 178, n. 1, p. 47-52, 1988.

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. **The Journal of reproduction and development**, v. 57, n. 4, p. 437-43, Sep 2011.

Iwasaki, Y.; Kinoshita, M.; Ikeda, K.; Takamiya, K.; Shiojima, T. [Trophic effect of angiotensin II, vasopressin and oxytocin on the ventral spinal cord of rat embryo]. **Rinsho Shinkeigaku**, v. 30, n. 10, p. 1137-9, Oct 1990.

Jiang, Z.; Sun, J.; Dong, H.; Luo, O.; Zheng, X.; Obergfell, C.; Tang, Y.; Bi, J.; O'Neill, R.; Ruan, Y.; Chen, J.; Tian, X. C. Transcriptional profiles of bovine *in vivo* pre-implantation development. **BMC Genomics**, v. 15, p. 756, Sep 04 2014.

Kim, Y. M.; Uhm, S. J.; Gupta, M. K.; Yang, J. S.; Lim, J. G.; Das, Z. C.; Heo, Y. T.; Chung, H. J.; Kong, I. K.; Kim, N. H.; Lee, H. T.; Ko, D. H. Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 1085-93, Sep 15 2012.

King, W. A.; Picard, L.; Bousquet, D.; Goff, A. K. Sex-dependent loss of bisected bovine morulae after culture and freezing. **Journal of reproduction and fertility**, v. 96, n. 2, p. 453-9, Nov 1992.

Kipper, B. H.; Trevizan, J. T.; Carreira, J. T.; Carvalho, I. R.; Mingoti, G. Z.; Beletti, M. E.; Perri, S. H.; Franciscato, D. A.; Pierucci, J. C.; Koivisto, M. B. Sperm morphometry and

chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. **Theriogenology**, v. 87, p. 154-160, Jan 01 2017.

Kobayashi, S.; Isotani, A.; Mise, N.; Yamamoto, M.; Fujihara, Y.; Kaseda, K.; Nakanishi, T.; Ikawa, M.; Hamada, H.; Abe, K.; Okabe, M. Comparison of gene expression in male and female mouse blastocysts revealed imprinting of the X-linked gene, *Rhox5/Pem*, at preimplantation stages. **Curr Biol**, v. 16, n. 2, p. 166-72, Jan 24 2006.

Kochhar, H. S.; Kochhar, K. P.; Basrur, P. K.; King, W. A. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. **Animal reproduction science**, v. 77, n. 1-2, p. 33-49, May 15 2003.

Kuleshova, L. L.; Lopata, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertil Steril**, v. 78, n. 3, p. 449-54, Sep 2002.

Kuwayama, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73-80, Jan 1 2007.

Kuwayama, M.; Vajta, G.; Ieda, S.; Kato, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 5, p. 608-14, Nov 2005a.

Kuwayama, M.; Vajta, G.; Kato, O.; Leibo, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 3, p. 300-8, Sep 2005b.

Lane, M.; Schoolcraft, W. B.; Gardner, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and sterility**, v. 72, n. 6, p. 1073-8, Dec 1999.

Leme, L. O. **Efeito de diferentes fontes protéicas na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2008. 82 (Master of Science). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

Liu, W.-M.; Pang, R. T. K.; Chiu, P. C. N.; Wong, B. P. C.; Lao, K.; Lee, K.-F.; Yeung, W. S. B. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 2, p. 490-494, 12/27 2012.

Liu, Y.; Du, Y.; Lin, L.; Li, J.; Kragh, P. M.; Kuwayama, M.; Bolund, L.; Yang, H.; Vajta, G. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of *in vitro* matured pig oocytes. **Cryo letters**, v. 29, n. 4, p. 315-20, Jul-Aug 2008.

Lonergan, P.; Fair, T.; Corcoran, D.; Evans, A. C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 137-52, Jan 07 2006.

Lonergan, P.; Khatir, H.; Piumi, F.; Rieger, D.; Humblot, P.; Boland, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of reproduction and fertility**, v. 117, n. 1, p. 159-67, Sep 1999.

- Loutradi, K. E.; Kolibianakis, E. M.; Venetis, C. A.; Papanikolaou, E. G.; Pados, G.; Bontis, I.; Tarlatzis, B. C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 1, p. 186-93, Jul 2008.
- Macaulay, A. D.; Hamilton, C. K.; King, W. A.; Bartlewski, P. M. Influence of physiological concentrations of androgens on the developmental competence and sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos. **Reprod Biol**, v. 13, n. 1, p. 41-50, Mar 2013.
- Machado, G. M.; Caixeta, E. S.; Lucci, C. M.; Rumpf, R.; Franco, M. M.; Dode, M. A. Post-hatching development of bovine embryos *in vitro*: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, v. 20, n. 2, p. 123-34, May 2012.
- Machado, G. M.; Carvalho, J. O.; Filho, E. S.; Caixeta, E. S.; Franco, M. M.; Rumpf, R.; Dode, M. A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-97, May 2009.
- Machado, G. M.; Ferreira, A. R.; Guardieiro, M. M.; Bastos, M. R.; Carvalho, J. O.; Lucci, C. M.; Diesel, T. O.; Sartori, R.; Rumpf, R.; Franco, M. M.; Dode, M. A. Morphology, sex ratio and gene expression of day 14 *in vivo* and *in vitro* bovine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 4, p. 600-8, 2013a.
- Machado, G. M.; Ferreira, A. R.; Pivato, I.; Fidelis, A.; Spricigo, J. F.; Paulini, F.; Lucci, C. M.; Franco, M. M.; Dode, M. A. Post-hatching development of *in vitro* bovine embryos from day 7 to 14 *in vivo* versus *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 80, n. 11, p. 936-47, Nov 2013b.
- Mamo, S.; Carter, F.; Lonergan, P.; Leal, C. L.; Al Naib, A.; McGettigan, P.; Mehta, J. P.; Evans, A. C.; Fair, T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v. 12, p. 151, 2011.
- Martino, A.; Songsasen, N.; Leibo, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 5, p. 1059-69, May 1996.
- Matsumoto, H.; Jiang, J. Y.; Tanaka, T.; Sasada, H.; Sato, E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, n. 2, p. 139-44, Mar 2001.
- Mendes, J. O., Jr.; Burns, P. D.; De La Torre-Sanchez, J. F.; Seidel, G. E., Jr. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, n. 2, p. 331-40, Jul 2003.
- Moore, K.; Rodriguez-Sallaberry, C. J.; Kramer, J. M.; Johnson, S.; Wroclawska, E.; Goicoa, S.; Niasari-Naslaji, A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. **Theriogenology**, v. 68, n. 9, p. 1316-25, Dec 2007.
- Morato, R.; Izquierdo, D.; Paramio, M. T.; Mogas, T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, v. 57, n. 2, p. 137-41, Oct 2008.
- Morato, R.; Izquierdo, D.; Paramio, M. T.; Mogas, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 7, p. 1141-7, 2010.

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**, v. 65, n. 8, p. 1551-62, May 2006.

Mundim, T. C.; Ramos, A. F.; Sartori, R.; Dode, M. A.; Melo, E. O.; Gomes, L. F.; Rumpf, R.; Franco, M. M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 8, n. 4, p. 1398-407, 2009.

Newell-Price, J.; Clark, A. J.; King, P. DNA methylation and silencing of gene expression. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 4, p. 142-8, May-Jun 2000.

Niemann, H.; Wrenzycki, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 21-34, Jan 1 2000.

Palma, G. A. Producción *in vitro* de embriones bovinos - Factores que los afectan los resultados - Semen. In: AGROPECUARIA, I. N. D. T. (Ed.). **Biotecnología de la Reproducción**. 1st. Argentina: INTA, 2001. cap. 13, p.257-260.

Papis, K.; Shimizu, M.; Izaike, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 651-8, Sep 15 2000.

Parrish, J. J. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67-73, Jan 01 2014.

Parrish, J. J.; Krogenaes, A.; Susko-Parrish, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-69, Oct 15 1995.

Paschoal, D. M.; Sudano, M. J.; Guastali, M. D.; Dias Maziero, R. R.; Crocomo, L. F.; Ona Magalhaes, L. C.; da Silva Rascado, T.; Martins, A.; da Cruz Landim-Alvarenga, F. Forskolin effect on the cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 146-57, May 2014.

Peippo, J.; Kurkilahti, M.; Bredbacka, P. Developmental kinetics of *in vitro* produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v. 9, n. 2, p. 105-13, May 2001.

Perry, G. **2015 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS**. IETS Data Retrieval Committee. http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_2015_V2: IETS: 16 pages p. 2016.

Petrunkina, A. M.; Harrison, R. A.; Hebel, M.; Weitze, K. F.; Topfer-Petersen, E. Role of quinine-sensitive ion channels in volume regulation in boar and bull spermatozoa. **Reproduction**, v. 122, n. 2, p. 327-36, Aug 2001.

Puglisi, R.; Balduzzi, D.; Galli, A. In vitro sperm penetration speed and its relationship with *in vivo* bull fertility. **Reprod Domest Anim**, v. 39, n. 6, p. 424-8, Dec 2004.

Rall, W. F.; Fahy, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. **Nature**, v. 313, n. 6003, p. 573-5, Feb 14-20 1985.

Rizos, D.; Bermejo-Alvarez, P.; Gutierrez-Adan, A.; Lonergan, P. Effect of duration of oocyte maturation on the kinetics of cleavage, embryo yield and sex ratio in cattle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 20, n. 6, p. 734-40, 2008.

Rizos, D.; Fair, T.; Papadopoulos, S.; Boland, M. P.; Lonergan, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 62, n. 3, p. 320-7, Jul 2002a.

Rizos, D.; Gutierrez-Adan, A.; Perez-Garnelo, S.; De La Fuente, J.; Boland, M. P.; Lonergan, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-43, Jan 2003.

Rizos, D.; Hassiakos, D.; Grigori-Kostaraki, P.; Sarandakou, A.; Botsis, D.; Salamalekis, E. Maternal serum leptin concentration during the second trimester of pregnancy: association with fetal chromosomal abnormalities. **Prenatal diagnosis**, v. 22, n. 3, p. 221-5, Mar 2002b.

Rizos, D.; Lonergan, P.; Boland, M. P.; Arroyo-Garcia, R.; Pintado, B.; de la Fuente, J.; Gutierrez-Adan, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 589-95, Mar 2002c.

Rizos, D.; Ward, F.; Duffy, P.; Boland, M. P.; Lonergan, 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, n. 2, p. 234-48, Feb 2002d.

Rozeboom, K. J.; Troedsson, M. H.; Crabo, B. G. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. **Journal of reproduction and fertility**, v. 114, n. 2, p. 195-9, Nov 1998.

Rubessa, M.; Boccia, L.; Campanile, G.; Longobardi, V.; Albarella, S.; Tateo, A.; Zicarelli, L.; Gasparrini, B. Effect of energy source during culture on *in vitro* embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1347-55, Oct 15 2011.

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, n. 2, p. 331-43, Jul 15 1996.

Sakkas, D.; Mariethoz, E.; Manicardi, G.; Bizzaro, D.; Bianchi, P. G.; Bianchi, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Rev Reprod**, v. 4, n. 1, p. 31-7, Jan 1999.

Samardzija, M.; Karadjole, M.; Getz, I.; Makek, Z.; Cergolj, M.; Dobranic, T. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 4, p. 58, Nov 13 2006a.

Samardzija, M.; Karadjole, M.; Matkovic, M.; Cergolj, M.; Getz, I.; Dobranic, T.; Tomaskovic, A.; Petric, J.; Surina, J.; Grizelj, J.; Karadjole, T. A comparison of BoviPure and Percoll on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal reproduction science**, v. 91, n. 3-4, p. 237-47, Feb 2006b.

Sanches, B. V.; Lunardelli, P. A.; Tannura, J. H.; Cardoso, B. L.; Colombo Pereira, M. H.; Gaitkoski, D.; Basso, A. C.; Arnold, D. R.; Seneda, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147-51, Apr 1 2016.

Sanches, B. V.; Marinho, L. S.; Filho, B. D.; Pontes, J. H.; Basso, A. C.; Meirinhos, M. L.; Silva-Santos, K. C.; Ferreira, C. R.; Seneda, M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 372-7, Sep 01 2013.

Saragusty, J.; Arav, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 1-19, Jan 2011.

Seidel, G. E., Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 228-35, Jan 7 2006.

Siklenka, K.; Erkek, S.; Godmann, M.; Lambrot, R.; McGraw, S.; Lafleur, C.; Cohen, T.; Xia, J.; Suderman, M.; Hallett, M.; Trasler, J.; Peters, A. H.; Kimmins, S. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. **Science**, v. 350, n. 6261, p. aab2006, Nov 06 2015.

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, n. 4, p. 585-90, 2011.

Somfai, T.; Bodo, S.; Nagy, S.; Papp, A. B.; Ivancsics, J.; Baranyai, B.; Gocza, E.; Kovacs, A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v. 37, n. 5, p. 285-90, Oct 2002.

Spicigo, J. F.; Morais, K.; Ferreira, A. R.; Machado, G. M.; Gomes, A. C.; Rumpf, R.; Franco, M. M.; Dode, M. A. Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. **Cryobiology**, v. 69, n. 2, p. 256-65, Oct 2014.

Stinshoff, H.; Wilkening, S.; Hanstedt, A.; Brüning, K.; Wrenzycki, C. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1433-1441, 2011.

Sudano, M. J.; Paschoal, D. M.; da Silva Rascado, T.; Crocomo, L. F.; Magalhaes, L. C.; Junior, A. M.; Machado, R.; da Cruz Landim-Alvarenga, F. Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 124-31, May 2014.

Sudano, M. J.; Paschoal, D. M.; Rascado Tda, S.; Magalhaes, L. C.; Crocomo, L. F.; de Lima-Neto, J. F.; Landim-Alvarenga Fda, C. Lipid content and apoptosis of *in vitro*-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211-20, Apr 15 2011.

Sudano, M. J.; Santos, V. G.; Tata, A.; Ferreira, C. R.; Paschoal, D. M.; Machado, R.; Buratini, J.; Eberlin, M. N.; Landim-Alvarenga, F. D. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 130, 2012.

Tan, K.; An, L.; Miao, K.; Ren, L.; Hou, Z.; Tao, L.; Zhang, Z.; Wang, X.; Xia, W.; Liu, J.; Wang, Z.; Xi, G.; Gao, S.; Sui, L.; Zhu, D. S.; Wang, S.; Wu, Z.; Bach, I.; Chen, D. B.; Tian, J. Impaired imprinted X chromosome inactivation is responsible for the skewed sex ratio following *in vitro* fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 12, p. 3197-202, Mar 22 2016.

- Taniguchi, M.; Ikeda, A.; Arikawa, E.; Wongsrikeao, P.; Agung, B.; Naoi, H.; Nagai, T.; Otoi, T. Effect of cryoprotectant composition on *in vitro* viability of *in vitro* fertilized and cloned bovine embryos following vitrification and in-straw dilution. **J Reprod Dev**, v. 53, n. 4, p. 963-9, Aug 2007.
- Tarazona, A. M.; Rodriguez, J. I.; Restrepo, L. F.; Olivera-Angel, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. **Reprod Domest Anim**, v. 41, n. 1, p. 5-11, Feb 2006.
- Tarín, J. J.; García-Pérez, M. A.; Hermenegildo, C.; Cano, A. Changes in sex ratio from fertilization to birth in assisted-reproductive-treatment cycles. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 56, 2014.
- Tavalae, M.; Razavi, S.; Nasr-Esfahani, M. H. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. **Fertil Steril**, v. 91, n. 4, p. 1119-26, Apr 2009.
- Tesfaye, D.; Ponsuksili, S.; Wimmers, K.; Gilles, M.; Schellander, K. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 39, n. 6, p. 396-404, Dec 2004.
- Thornhill, A. R.; Burgoyne, P. S. A paternally imprinted X chromosome retards the development of the early mouse embryo. **Development**, v. 118, n. 1, p. 171-4, May 1993.
- Tominaga, K. Cryopreservation and sexing of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos for their practical use. **Journal Reprod Dev**, v. 50, n. 1, p. 29-38, Feb 2004.
- Tominaga, K.; Hamada, Y. Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine *in vitro* produced blastocysts. **Theriogenology**, v. 61, n. 6, p. 1181-91, Apr 15 2004.
- Tscherner, A.; Gilchrist, G.; Smith, N.; Blondin, P.; Gillis, D.; LaMarre, J. MicroRNA-34 family expression in bovine gametes and preimplantation embryos. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 85, Sep 02 2014.
- Vajta, G.; Holm, P.; Kuwayama, M.; Booth, P. J.; Jacobsen, H.; Greve, T.; Callesen, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 51, n. 1, p. 53-8, Sep 1998.
- Vajta, G.; Kuwayama, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236-44, Jan 7 2006.
- Vajta, G.; Nagy, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v. 12, n. 6, p. 779-96, 2006.
- Van Soom, A.; Van Vlaenderen, I.; Mahmoudzadeh, A. R.; Deluyker, H.; de Kruif, A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v. 38, n. 5, p. 905-19, Nov 1992.
- Vandaele, L.; Mateusen, B.; Maes, D.; de Kruif, A.; Van Soom, A. Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility? **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1691-703, Jun 2006.
- Vanderzwalmen, P.; Bertin, G.; Debauche, C.; Standaert, V.; Bollen, N.; van Roosendaal, E.; Vandervorst, M.; Schoysman, R.; Zech, N. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-

Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Hum Reprod**, v. 18, n. 7, p. 1504-11, Jul 2003.

Viana, J. H. M.; Figueiredo, A. C. S. Produção de Embriões Bovinos em 2014 e 2015: Reflexos de um período de turbulências. **Jornal O Embrião**, v. 58, p. 6-10, 2nd/2016 2016.

Viana, J. H. M.; Siqueira, L. G. B.; Palhão, M. P.; Camargo, L. S. A. **Use of *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production**. 24th Brazilian Embryo Technologies Society Annual Meeting. VETERINARIAE, A. S. Porto de Galinhas/PE, Brazil. 38: s661-s674 p. 2010.

Waberski, D. Effects of semen components on ovulation and fertilization. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 52, p. 105-9, 1997.

Walters, A. H.; Eyestone, W. E.; Saacke, R. G.; Pearson, R. E.; Gwazdauskas, F. C. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1925-37, Apr 15 2005a.

Walters, A. H.; Saacke, R. G.; Pearson, R. E.; Gwazdauskas, F. C. The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1404-21, Oct 01 2005b.

Ward, F.; Rizos, D.; Boland, M. P.; Lonergan, P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. **Theriogenology**, v. 59, n. 7, p. 1575-84, Apr 01 2003.

Ward, F.; Rizos, D.; Corridan, D.; Quinn, K.; Boland, M.; Lonergan, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Molecular reproduction and development**, v. 60, n. 1, p. 47-55, Sep 2001.

Xu, J.; Guo, Z.; Su, L.; Nedambale, T. L.; Zhang, J.; Schenk, J.; Moreno, J. F.; Dinnyes, A.; Ji, W.; Tian, X. C.; Yang, X.; Du, F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 7, p. 2510-8, Jul 2006.

Xu, K. P.; Greve, T. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 82, n. 1, p. 127-34, Jan 1988.

Xu, K. P.; Yadav, B. R.; King, W. A.; Betteridge, K. J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 31, n. 4, p. 249-52, Apr 1992.

Yadav, R. P.; Kotaja, N. Small RNAs in spermatogenesis. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 498-508, Jan 25 2014.

Zhang, B. R.; Larsson, B.; Lundeheim, N.; Rodriguez-Martinez, H. Relationship between embryo development *in vitro* and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 221-31, Jul 15 1997.

Zhou, X. L.; Al Naib, A.; Sun, D. W.; Lonergan, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 66-72, Aug 2010.

Zucolloto, J.; Oliveira, M.; Pereira, D. C.; Rumpf, R.; Dode, M. A. N. Influence of the growth rate and stage of development of bovine embryos produced *in vitro* on the pregnancy rate. In: VET, A. S., XVII Reunião Anual da SBTE, 2003, Beberibe, Ceará. Acta Sci Vet. p.630.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA VITRIFICAÇÃO NO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* USANDO O MÉTODO *CRYOTOP*

**Ligiane de Oliveira Leme ^a, Isabelle Dufort ^b, José Felipe WarmLing Spricigo ^a,
Thiago Felipe Braga ^a, Marc-André Sirard ^b, Maurício Machaim Franco ^c,
Margot Alves Nunes Dode ^{a,c}**

^a School of Agriculture and Veterinary Medicine, University of Brasília, Brasília,
Federal District, Brazil

^b Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Faculté des Sciences de
l'Agriculture et de l'Alimentation, Département des Sciences Animales, Pavillon INAF,
Université Laval, Québec City, Quebec, Canada

^c Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Laboratory of Animal Reproduction,
Brasília, Federal District, Brazil

Artigo publicado na revista *Theriogenology*, 2016 Mar 1;85(4):724-33.e1.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.10.016. Epub 2015 Oct 22.

RESUMO

O presente estudo analisou as mudanças na expressão de genes induzidas pela técnica de vitrificação por *Cryotop* em blastocistos bovinos, usando lâminas de microarranjo Agilent EmbryoGENE. Embriões produzidos *in vitro* foram vitrificados e comparados com embriões não vitrificados (controle). Após a vitrificação, os embriões foram desvitrificados e cultivados por 4 horas adicionais. Embriões sobreviventes foram utilizados para análise de microarranjo e quantificação em reação de cadeia polimerase (qPCR). As taxas de sobrevivência foram maiores ($P < 0,05$) nos embriões do grupo controle (100%) do que nos embriões vitrificados (87%). A análise de expressão global de genes mostrou que apenas 43 dos 21.139 genes foram diferentemente expressos para os embriões vitrificados comparados aos embriões controle, com um *fold change* muito pequeno ($P < 0,05$). Dos 10 genes que foram avaliados pela qPCR, apenas o gene *FOS*-like antigen 1 (*FOSLI*) mostrou expressão diferencial ($P < 0,05$) em ambos os métodos do microarranjo e reação em qPCR, e foi super-expresso em embriões vitrificados. A maior consequência da vitrificação parece ser a ativação da via de apoptose em algumas células. De fato, o *FOSLI* faz parte do complexo do fator de transcrição da AP-1 e está relacionado com diversos processos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e apoptose. Assim, estes resultados sugerem que um aumento limitado da taxa de apoptose foi a única resposta detectável dos embriões ao estresse da vitrificação.

Palavras-chave: *Cryotop*, Vitrificação, Bovino, Embrião, Transcriptoma, Expressão Gênica, Microarranjo.

ABSTRACT

The present study analyzed the changes in gene expression induced by *Cryotop* vitrification technique in bovine blastocysts stage embryos, using Agilent EmbryoGENE microarray slides. Bovine *in vitro*-produced embryos were vitrified and compared with nonvitrified (control) embryos. After vitrification, embryos were warmed and cultured for an additional 4 hours. Survived embryos were used for microarray analysis and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) quantification. Survival rates were higher ($P < 0.05$) in the control embryos (100%) than in the vitrified embryos (87%). Global gene expression analysis revealed that only 43 out of 21,139 genes exhibited significantly altered expression in the vitrified embryos compared to the control embryos, with a very limited fold change ($P < 0.05$). A total of 10 genes were assessed by qPCR. Only the *FOS*-like antigen 1 (*FOSL1*) gene presented differential expression ($P < 0.05$) according to both the array and qPCR methods, and it was over-expressed in vitrified embryos. Although, the major consequence of vitrification seems to be the activation of the apoptosis pathway in some cells. Indeed, *FOSL1* is part of the AP-1 transcription factor complex and is implicated in a variety of cellular processes, including proliferation, differentiation and apoptosis. Therefore, our results suggest that a limited increase in the rate of apoptosis was the only detectable response of the embryos to vitrification stress.

Key words: *Cryotop*, Vitrification, Cattle, Embryo, Transcriptome, Gene Expression, Microarray.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, um progresso significativo tem sido feito para melhoria dos sistemas de produção *in vitro* (PIV). Entretanto, embriões PIV ainda são mais sensíveis à criopreservação do que os embriões produzidos *in vivo* (Aksu *et al.*, 2012; Sudano *et al.*, 2014a). Este problema permanece sendo o fator limitante para o amplo uso da tecnologia PIV na indústria pecuária (Bruyere *et al.*, 2012; Sudano *et al.*, 2014b).

Melhorar a capacidade do sucesso de embriões criopreservados antes de transferi-los a uma receptora é crucial para resolver problemas de logística associados à transferência de embriões frescos (Aksu *et al.*, 2012), especialmente em programas de produção de embriões em larga escala comercial, em que a disponibilidade e o manejo de receptoras pode ser desafiador.

Atualmente, dois métodos de criopreservação estão sendo empregados para a preservação de embriões – o congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento vem sendo gradualmente substituído pela vitrificação para evitar os efeitos de injúria no resfriamento e formação de cristais de gelo, reduzindo assim danos nas membrana e organelas (Vajta e Nagy, 2006).

Entretanto, devido à alta concentração de agentes crioprotetores na solução de vitrificação, embriões vitrificados são expostos a alto nível de estresse tóxico (Vajta *et al.*, 1998). Para superar este problema, diversas modificações do método de vitrificação usando diferentes dispositivos tem sido empregado para reduzir o volume da solução e aumentar as taxas de resfriamento (Kuwayama *et al.*, 2005a; Lane *et al.*, 1999; Martino *et al.*, 1996; Papis *et al.*, 2000; Vajta *et al.*, 1998). Dessa forma, o desenvolvimento do sistema *Cryotop* (Kuwayama *et al.*, 2005b) marcou um importante

avanço na vitrificação. Este método, que é considerado um procedimento de resfriamento de mínimo volume, consiste em colocar os embriões na superfície de uma haste de polipropileno muito fina usando um volume muito pequeno ($<0,01 \mu\text{L}$) de solução de vitrificação e imediatamente serem colocados em nitrogênio líquido. A quantidade reduzida do meio de vitrificação ao redor dos embriões permite que eles passem rapidamente através da zona crítica de temperatura na presença do agente crioprotetor. Estas mudanças são os principais fatores responsáveis pelos melhores resultados obtidos dentro deste contexto para diversas espécies. De fato, é o método mais utilizado no presente para criopreservação de ovócitos e embriões humanos na rotina diária (Cobo *et al.*, 2010; Parmegiani *et al.*, 2011; Rienzi *et al.*, 2010; Sole *et al.*, 2013).

Está claro que qualquer método de criopreservação pode afetar o perfil molecular de diferentes espécies, e há evidências de que a vitrificação cause menos danos do que outros métodos (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007; Gupta *et al.*, 2010; Inaba *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Kuwayama, 2007; Larman *et al.*, 2011; Martino *et al.*, 1996; Nicacio *et al.*, 2012; Park *et al.*, 1999; Stinshoff *et al.*, 2011; Vajta *et al.*, 1998; Vajta e Kuwayama, 2006). Portanto, pode-se assumir que diferentes métodos de vitrificação que respondem diferentemente à preservação, podem ter impacto distintos à nível molecular.

Avaliação dos níveis de transcritos de genes específicos que podem ser afetados pela criopreservação provê informações importantes, mas limitadas com relação às alterações no perfil molecular. Todavia, para avaliar melhor a resposta embrionária ao estresse da criopreservação, pesquisas com métodos de alto rendimento como o microarranjo e o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) são necessários (Cagnone e Sirard, 2014; Malone e Oliver, 2011).

Algumas publicações investigaram o efeito da criopreservação em embriões bovinos PIV usando estas técnicas de alto rendimento (Chitwood *et al.*, 2013; Gad *et al.*, 2012a; Gad *et al.*, 2012b; Larman *et al.*, 2011; Mamo *et al.*, 2011). Aksu *et al.* (2012) compararam a expressão global de genes de embriões bovinos PIV frescos e vitrificados usando a palheta francesa de 0,25 mL, encontrando uma diferença marcante na expressão de genes devido à vitrificação. Também, Sudano *et al.* (2014a) fizeram um estudo comparando embriões PIV *Bos indicus* e *Bos taurus*, usando a técnica de vitrificação em dois passos, relatando que os transcriptomas de ambas as subespécies foram significativamente afetados pela vitrificação. Em contraste, em coelhos, nenhuma

diferença na expressão de genes foi detectada entre embriões congelados e vitrificados (estágio de mórula), mas a vitrificação resultou em maior implantação e nascimentos do que o congelamento lento (Saenz-De-Juano *et al.*, 2014). Contudo, poucos estudos têm relatado o padrão de expressão global de genes em blastocistos (BL) usando uma técnica de volume reduzido (*Cryoloop*) (Larman *et al.*, 2011).

Assim sendo, efeitos potenciais do uso de uma técnica de volume mínimo em embriões bovinos no perfil transcricional não foram avaliados. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito da vitrificação por *Cryotop* na expressão de genes em embriões bovinos através da análise por microarranjo e qPCR.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A menos que seja indicado, os reagentes utilizados foram comprados da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). As hastes do método *Cryotop* foram compradas da Vitringá (Maringá, PR, Brasil).

2.1. Local dos experimentos

Os experimentos relativos à PIV de embriões, criopreservação e quantificação de genes por qPCR foram realizados nos laboratórios da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. O microarranjo foi realizado na Université Laval, Quebec, Canadá.

2.2. Produção *in vitro* de embriões bovinos

Os embriões foram produzidos a partir de ovócitos oriundos de ovários de abatedouro, transportados ao laboratório em solução salina (NaCl, 0,9%), suplementada com amicacina (0,075 mg/mL) a 35 - 38 °C. Foram aspirados folículos de tamanho entre 3 e 8 milímetros com o auxílio de seringa e agulha hipodérmica. Apenas complexos *cumulus*-ovócitos (COCs) com homogeneidade do citoplasma e pelo menos três camadas com integridade das células dos *cumulus*, foram utilizados. Após a seleção, os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de 200 µL do meio de maturação, sob óleo de silicone. Os COCs foram incubados por 22 a 24 horas a 38,8 °C com atmosfera de 5% de CO₂. O meio de maturação consistia de TCM 199 com sais de

Earl's (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Gibco®), 12 UI/mL de hormônio luteinizante (LH), 0,01 UI/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 0,1 mg/mL de L-glutamina, 0,1 µg/mL de cisteamina, e 0,0755 mg/mL de sulfato de amicacina. Os ovócitos maturados foram transferidos então para gotas de 200 µL de meios de fecundação, que consistia do meio Tyrode's albumina lactato piruvato (TALP - (Parrish *et al.*, 1995), suplementado com 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina. Doses de sêmen congelado de um touro *Bos indicus*, previamente testado e selecionado foi utilizado na concentração final de 1×10^6 espermatozoides /mL. Os espermatozoides móveis foram obtidos através da técnica de gradiente (90%:45%) de Percoll (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) em microtubos (Machado *et al.*, 2009). Ovócitos maturados e espermatozoides permaneceram co-incubados por 18 horas a 38,8 °C com atmosfera de 5% de CO₂, sendo o dia da inseminação considerado do dia 0. Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram transferidos então para gotas de 200 µL o meio de cultivo embrionário Fluido Sintético de Oviduto (SOF) (Holm *et al.*, 1999), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de *sodium tri citrato*, 2,77 mM de myo-inositol e 5% SFB (Gibco®) e mantidos em cultivo a 38,8 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Entre D6 e D6,5 (144 a 156 horas *pi*), BL foram classificados (grau I) de acordo com critérios estabelecidos pela International Embryo Transfer Society (IETS) e distribuídos igualmente em dois grupos: Controle (C) e Vitricados (V).

2.3. Vitricação dos embriões

A vitricação dos embriões foi realizada como descrito previamente (Kuwayama, 2007; Kuwayama *et al.*, 2005b), com pequenas modificações. Uma solução de manutenção (SM), foi utilizada para manipulação dos embriões durante a vitricação e desvitricação, composta de TCM-199 com HEPES (GIBCO®/Life Technologies) suplementado com 20% SFB. Os embriões foram submetidos a 3 banhos sequenciais em solução de equilíbrio (SV1), constituída de SM acrescido de 7,5% etileno glicol (EG) e 7,5% de dimetil-sulfóxido (DMSO), permanecendo em cada gota (banho) por 3 minutos; o tempo total de exposição à SV1 ficou entre 9 e 15 minutos. Após o equilíbrio os embriões foram transferidos para a solução de vitricação (SV2), composta por SM suplementado com 15% EG, 15% DMSO e 0,5 M de sacarose; nesta

solução os embriões passaram por 4 banhos sequenciais, em um tempo total de 45 - 60 segundos. As estruturas foram então colocadas nas hastes *Cryotop* de vitrificação com auxílio de uma micro-pipeta de vidro com diâmetro aproximado de 150 μm . Imediatamente após a deposição das estruturas nas hastes, o excesso de solução foi retirado, deixando somente uma fina camada (aproximadamente 0,1 μL) sobre as estruturas. Então, a haste foi mergulhada diretamente, em posição vertical, no nitrogênio líquido (N_2L). Os embriões do grupo V, permaneceram pelo menos 30 minutos em N_2L , antes do procedimento de desvitrificação. Para a desvitrificação, a haste foi retirada do N_2L com o auxílio de uma pinça e a extremidade contendo os embriões era mergulhada na solução de desvitrificação 1 (DV1), composta por SM adicionado de 1 M de sacarose, pré-aquecida a 37 °C. Os embriões permaneceram na DV1 por 1 minuto, e posteriormente foram transferidos para uma solução menos concentrada (DV 2) composta por SM acrescido de 0,5 M de sacarose, durante 3 minutos. Finalmente, foram lavados em 2 gotas de SM, permanecendo 5 minutos em cada. Os embriões foram recolocados em meio SOF, permanecendo por 4 horas adicionais na incubadora.

Embriões do grupo C foram mantidos na bancada em SM, a 37 °C, enquanto o grupo V foi submetido ao processo de vitrificação/desvitrificação. Ao final do período adicional de cultivo, os embriões foram avaliados quanto à re-expansão e aqueles considerados com aspecto morfológico normal, foram colocados em RNA later e armazenados a -20 °C até a extração de RNA.

2.4. Determinação de genes diferencialmente expressos por microarranjo

Quatro réplicas do C e V foram realizadas, com 10 blastocistos cada. O RNA total de cada réplica foi extraído e purificado usando o Kit PicoPure RNA Isolation (Life Technologies), incluindo a digestão com DNase I na purificação com coluna (Qiagen). A qualidade e concentração do RNA extraído foram analisadas com um Bioanalyser (Agilent). Todas as amostras tinham boa qualidade, com número de integridade de RNA >8,5.

Para o microarranjo, o RNA purificado foi amplificado (aRNA) por transcrição *in vitro* com T7 RNA, usando o Kit de amplificação RiboAmp HS Plus RNA (Life Technologies) e marcados com Cy3 e Cy5 usando o Kit ULS Fluorescent Labeling de arranjos da Agilent (Kreatech). O aRNA marcado (825 ng / réplica) foi hibridizado em lâminas de microarranjo da EmbryoGENE fabricadas pela Agilent

(GEO #GPL13226), em um delineamento de alternância de corantes, usando o Kit Gene Expression Hybridization (Agilent). Após 17 horas de hibridização a 65° C, as lâminas de microarranjo foram lavadas por 3 minutos em solução *Expression Wash Buffer I* (temperatura ambiente), 3 minutos em solução *Expression Wash Buffer II* (42 °C), 10 segundos em acetonitrilo 100% (temperatura ambiente) e 30 segundos em Solução de Estabilização e Secagem (temperatura ambiente) (Agilent). As lâminas foram lidas com o auxílio do *PowerScanner* (Tecan) e a leitura dos dados foi feita no programa Array-pro 6.3 (MediaCybernetics). Arquivos maiores foram analisados com o FlexArray, que é um programa de análise estatística de dados para expressão de genes em microarranjo (Genome Quebec, Montreal, Canada; <http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray>) - (Makarenkov *et al.*, 2007; Miron *et al.*, 2006). Os dados de intensidade de fluorescência foram corrigidos pela subtração simples do *background*, normalizado dentro do arranjo usando o Loess e entre cada arranjo usando o Quantile. Comparações estatísticas entre o grupo C e o grupo V foram realizadas com o programa Limma, que atribui a cada sonda a probabilidade da diferença do *fold-change* entre V e C. Foram consideradas diferencialmente expressas as sondas com o *fold-change* > 1,5 e o valor de P < 0,05.

2.5. Análise Funcional da expressão diferencial de genes

O programa *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Ingenuity Systems; <http://www.ingenuity.com>) foi utilizado para identificar as funções dos transcritos diferencialmente expressos e estabelecer interações entre os genes diferencialmente expressos (DEGs) dentro da base de dados, com outras moléculas da base de dados do IPA, para esclarecer o que está direcionando sua transcrição. Além do mais, o IPA for usado também para gerar vias canônicas e as vias de interações dos genes (networks) que são enriquecidos significativamente com os DEGs identificados entre embriões V e C.

2.6. Validação dos resultados do microarranjo pela PCR em Tempo Real (qPCR)

Nove genes (*FOS*-like antigen 1 – *FOSL1*, Heat shock 70kDa protein 5 – *HSPA5*, Heat shock 27kDa protein 1 – *HSPB1*, Keratin 8 – *KRT8*, Thioredoxin interacting protein – *TXNIP*, *CD38* molecule – *CD38*, Solute carrier family 1 member 4

– *SLC1A4*, Pregnancy-associated glycoprotein 2 – *PAG2*, DNA mismatch repair protein MSH, mutS homolog 6 – *MSH6*) dos 43 DEGs foram selecionados de acordo com sua função para serem avaliados pela qPCR. A qPCR foi realizado em um 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA) usando réplicas biológicas independentes. Os embriões para quantificação dos genes foram produzidos com a mesma metodologia descrita anteriormente, coletando amostras para formar 4 *pools* de 30 embriões para cada tratamento. O RNA total foi isolado usando o Kit RNeasy Plus Micro (Quiagen[®], Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante (com pequenas modificações). O volume total de RNA das amostras foi incubado diretamente com 1 U DNase I (Invitrogen[®]/Life Technologies, New York, USA) a 37 °C por 30 minutos. A síntese de cDNA foi realizada usando SuperScriptIII (200 U / μ L, Invitrogen[®]) e *primer* (do inglês, oligonucleotídeo iniciador) Oligo-dT (0,5 μ g / μ L, Invitrogen[®]) em um volume final de 28 μ L. As reações foram realizadas a 65 °C por 5 minutos e 42 °C por 60 minutos, seguido pela inativação da enzima a 70 °C por 15 minutos.

A análise da qPCR foi realizada usando *Fast Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram otimizadas para promover eficiência de amplificação máxima para cada gene (90 – 100%) 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* (do inglês, fragmento amplificado) em gel de agarose. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L usando cDNA correspondente a 0,8 embrião. As condições dos ciclos do PCR foram 95 °C por 5 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e então anelamento a 60 °C por 1 minuto. O nome, a sequência e concentração do *primer*, tamanho do *amplicon* e temperatura de anelamento de cada gene estão listadas na Tabela 2.1.

O nível de expressão dos três genes constitutivos, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), β -Actin (*ACTB*) e Peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*) foram submetidos ao programa de análise GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), que indicou o *GAPDH* como o gene mais estável. Este gene foi usado como referência para normalização dos dados. A expressão relativa de cada gene foi calculada usando o método de $\Delta\Delta$ Ct com correção da eficiência pelo método Pfaffl (2001).

Tabela 2.1: Informações sobre os *primers* específicos usados para análise da amplificação dos fragmentos dos genes pela qPCR.

Genes	Sequências de Primer	Tamanho Amplicon (pb)	Concentração Primer (nM)	GeneBank Núm. Acesso /referência
<i>GAPDH</i>	F: GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA R: CCC TCC ACG ATG CCA AAG T	118	300	NM_001034034.2
<i>SLC1A4</i>	F: GTC TCT GGT TAG CGG CAT TAG R: ATG TGA GTG TGT GTC CTT ACC	116	300	NM_001081577.1
<i>KRT8</i>	F: GGT TCT GGA GAC CAA ATG GAA R: CCG ACG GAG GTT GTT AAT GTA G	97	300	NM_001033610.1
<i>CD38</i>	F: CTACAGATGCCGTGGTTATG R: GGC TGT TGG AAG GAT TAG AG	92	300	NM_175798.3
<i>HSPA5</i>	F: CGT GGC CAC TAA TGG AGA TAC R: CTC TGT TGT CCT TCC GAA CAT	119	300	NM_001075148.1
<i>HSPB1</i>	F: CTG GAC GTC AAC CAC TTC R: GGA CAG AGA GGA GGA GAC	180	300	NM_001025569.1
<i>PAG2</i>	F: GAA CAC AAA CAA GCC AGA G R: TTG GGC CGT AGA TCA TTG	208	200	NM_176614
<i>TXNIP</i>	F: CCCAAGGAGGAACCCTAGATAA R: GTC AAC AAC CCT GTC TCC TAA C	181	250	NM_001101875.2
<i>FOSL1</i>	F: GCT TCC TAG TAG AGC CAA AG R: GAA GAG GTG ATG AAG ACC ATA G	200	300	NM_001205985.1
<i>MSH6</i>	F: CCC AGG TGC TTA AAG GTA TG R: GGA CCA TGT CAG AAT CCA AG	186	300	NM_001192737.1

F: primer forward; R: primer reverse

2.7. Análise Estatística

A comparação das taxas de blastocistos, sobrevivência e expansão após 4 horas da desvitrificação foi realizada pelo teste Chi-quadrado. Os dados comparando expressão de genes foram analisados pelo *Test t* ou teste de *Mann-Whitney* para dados com ou sem distribuição normal, respectivamente. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o Programa Prophet, versão 5.0; 1997, considerando valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Durante o experimento, a taxa média de clivagem foi 78% e de BL foi 39,5% na avaliação em D6, após a inseminação. Dos BLs avaliados entre 144 – 156 horas pós-inseminação, 66% encontravam-se neste estágio preferido para vitrificação. A taxa de sobrevivência foi avaliada dentro de 4 horas após a vitrificação/desvitrificação e foi baseada na avaliação morfológica. Os embriões que re-expandiram e/ou evoluíram para o estágio de blastocisto expandido (BX) foram considerados vivos. O grupo V mostrou uma taxa de sobrevivência inferior comparado ao grupo C (Tabela 2.2). Além disso, a porcentagem de embriões que evoluíram para o estágio de BX, foi maior no grupo C em relação ao V ($p < 0,05$).

Tabela 2.2: Taxas de sobrevivência e re-expansão/progressão de blastocistos (BL) vitrificados e não vitrificados (Controle), pelo método *Cryotop* avaliadas às 4 horas de cultivo após a desvitrificação.

Tratamento	Total N (BL)	Re-expansão em BL (%)	Evolução para BX* (%)	Taxa Sobrevivência (%)
CONTROLE	91	50 (54.9) ^a	41 (45.0) ^a	100 ^a
VITRIFICADO	109	64 (58.7) ^a	31 (28.4) ^b	87 ^b

^{a, b} Diferem estatisticamente entre tratamentos ($P < 0.05$).

* BX: Blastocisto Expandido

3.1. Análise do Transcriptoma em larga escala

Análises de microarranjo foram realizadas para comparar o perfil da expressão gênica de BLs PIV, C e V. Do total de 38.519 transcritos incluídos na lâmina de microarranjo, 130 foram diferencialmente expressos, quando se usou valores de corte para $> 1,5$ e $< 0,05$ de *fold change* e valor de p , respectivamente. Aplicando-se a *False Discovery Rate* (FDR), que é uma abordagem mais restrigente, o número de DEGs reduziu para apenas 43, sendo 18 *upregulated* (mais expressos) e 25 *downregulated* (menos expressos) para o grupo V. A Figura 2.1 mostra a distribuição e a localização dos DEGs que tiveram funções avaliadas; a significância é maior considerando a distância de $-\log_{10}$ (valor de p ajustado) quanto mais aumenta o valor de p e/ou valor \log_2 (*fold change*) se afastando de zero.

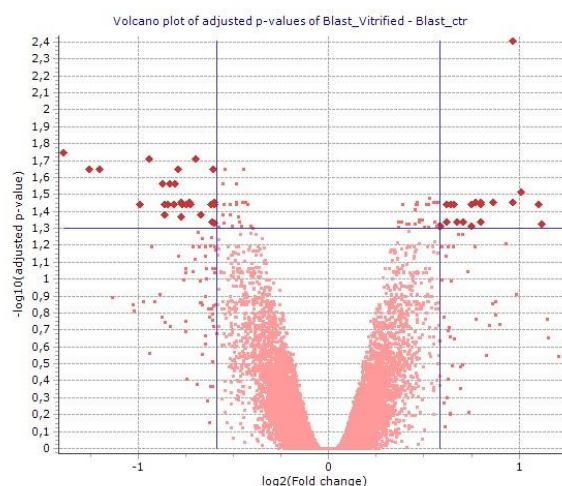


Figura 2.1: Gráfico de Volcano mostrando as mudanças significativas na expressão de genes entre embriões Vitrificados e Controle. Os 43 genes diferencialmente expressos estão representados pelos pontos em vermelho mais intenso.

3.2. Caracterização Funcional

As características funcionais de cada transcrito diferencialmente expresso foram analisadas pelo programa IPA. As análises indicaram as principais funções moleculares e celulares relacionadas às listas dos DEGs, as quais estão envolvidos no metabolismo de carboidratos, drogas e lipídeos, além da produção de energia e bioquímica de pequenas moléculas.

O IPA foi usado também para estabelecer as interações entre os DEGs dentro dos dados e com outras moléculas na base de dados do programa. As vias

moleculares mais importantes geradas pelo programa estão associadas ao desenvolvimento e função do sistema nervoso, câncer e morfologia dos órgãos, também com metabolismo de carboidratos, drogas e lipídeos, além da produção de energia; ciclo celular, replicação e reparo de DNA, transporte molecular; desenvolvimento, crescimento e proliferação celular e movimento; e função e desenvolvimento do sistema hematológico. A classificação ontológica dos DEGs no programa IPA mostrou um pequeno número de moléculas importantes nas principais vias canônicas, dentre elas a sinalização para *ERK5* (*ATF2*, *FOSL1* e *SFN*), Xenobiotic Metabolism (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *HS3ST5*, *HSP90B1*, *PPP2R2B*), Sphingosin-1-phosphate (*PDGFRA*, *RHOQ*, *S1PR1*), Hereditariedade do Câncer de Mama (*GADD45B*, *MSH6*, *SFN*) e *PI3K/AKT* (*HSPB90B1*, *PPP2R2B*, *SFN*). Alguns desses genes que são destacados nessas principais vias canônicas, corroboram com a importância dos mesmos nas vias moleculares e funcionais, pois aparecem em ambas.

Com base nos dados desse estudo, através da análise das principais funções nessas vias, 9 genes (*FOSL1*, *HSPA5*, *HSPB1*, *KRT8*, *TXNIP*, *CD38*, *SLC1A4*, *PAG2*, *MSH6*) foram selecionados para avaliação de qPCR, e um gene constitutivo (*GAPDH*) foi utilizado para normalização

3.3. Validação dos genes pelo qPCR

Dos 9 genes avaliados, o padrão de expressão na qPCR para 5 deles (*SLC1A4*, *HSPA5*, *TXNIP*, *FOSL1* e *MSH6*) foi de acordo com os resultados do microarranjo. Para os outros 4 genes (*KRT8*, *CD38*, *HSPB1* e *PAG2*) o padrão de expressão observado foi contrário (Figura 2.2). Além disso, para a maior parte dos genes estudados, a expressão diferencial detectada nas análises do microarranjo não foi detectado pela qPCR (Figura 2.3). De todos os genes analisados, apenas o *FOSL1* mostrou expressão diferencialmente significativa ($P < 0,05$) para os dois métodos, estando super-expresso em embriões vitrificados (Figura 2.3).

Uma vez que o gene *FOSL1* está presente nas principais vias funcionais e também foi o único DEG em embriões vitrificados detectados pela qPCR, foi selecionado para ser melhor estudado. Na avaliação macro da cadeia de regulação da principal via canônica, a sinalização do *ERK5*, que é ativada por elementos extracelulares como o estresse, a presença do *cFOS* e *FOSL1* (*Fra1*) foi identificada (Figura 2.4).

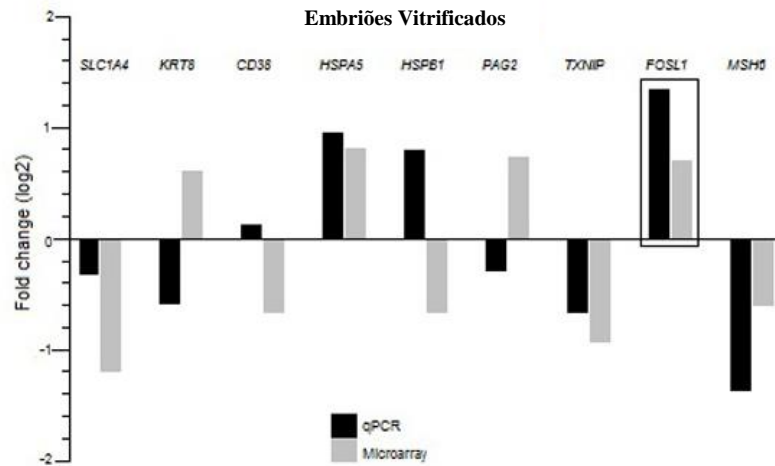


Figura 2.3: Fluxo simétrico de *fold-change* (log₂) de análise de comparação da Validação pelo qPCR e Microarranjo, comparando-se embriões vitrificados. Cinco genes (*SLC1A4*, *HSPA5*, *TXNIP*, *FOSL1* e *MSH6*) tiveram o mesmo padrão de expressão (*up-* ou *downregulated*), e o *FOSL1* (marcado com retângulo) apresentou expressão diferencial para os dois métodos.

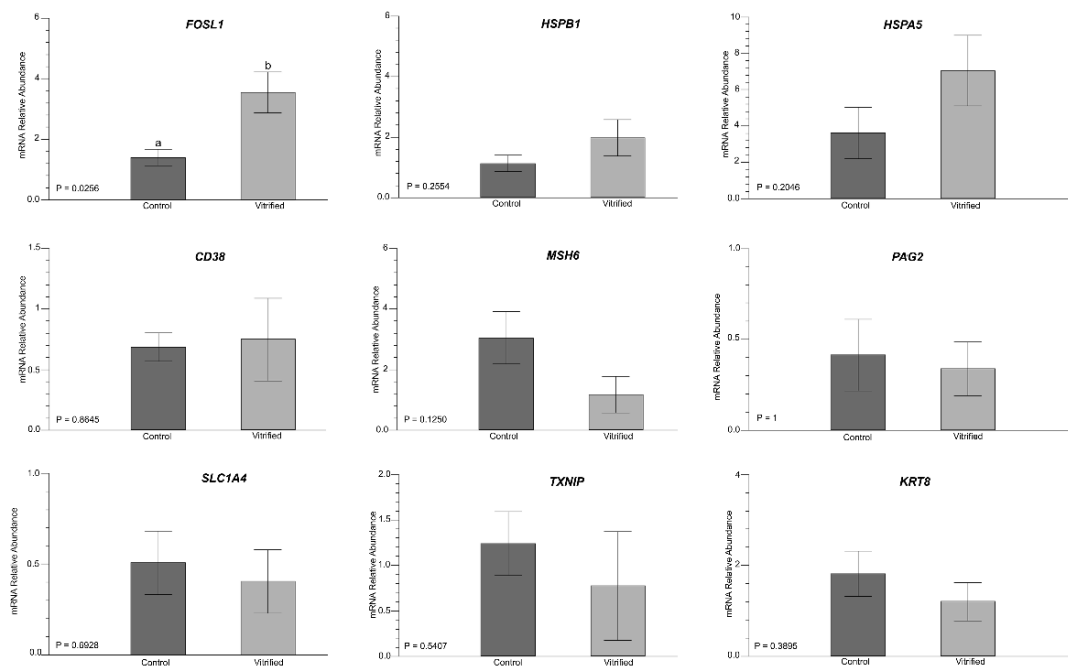


Figura 2.2: Quantidade relativa de mRNA dos genes *FOSL1*, *SLC1A4*, *KRT8*, *CD38*, *HSPA5*, *HSPB1*, *TXNIP*, *PAG2* e *MSH6* analisados pelo qPCR em blastocistos bovinos de tratamentos Controle e Vitroficados. Média ± Erro padrão das médias de quatro réplicas biológicas. Dados (Média ± SEM) foram normalizados usando a fórmula $\Delta\Delta CT$ (Pfaffl, 2001), usando-se o *GAPDH* como controle endógeno. Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$ (Teste-t).

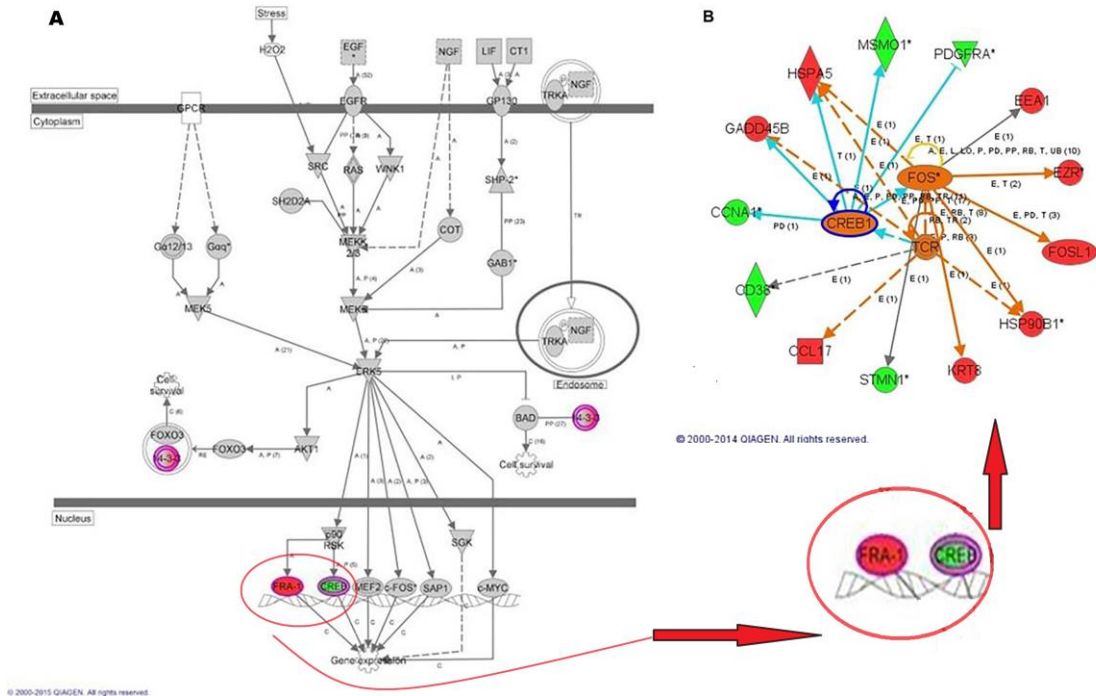


Figura 2.4: Análise de interação das vias do *Ingenuity*. Macro-análise (A) e Micro-análise (B) de genes envolvidos na resposta ao estresse e resposta celular compartilham a via, que foi diferencialmente expresso entre os tratamentos de blastocistos, como apresentado. A via mostra nós (genes ou produtos de genes) e linhas (a correlações biológicas entre os nós). A coloração dos nós indica aumento (vermelho) ou diminuição (verde) do *fold-change* em embriões Vitrificados comparados ao Controle. A correlação entre as moléculas é indicada por traço sólido (direta) ou pontilhado (indireta), e a mesma cor indica nós compartilhados entre as vias.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, buscou-se identificar, pela metodologia de microarranjo, o efeito da vitrificação pelo método *Cryotop* no perfil da expressão de genes em embriões bovinos. Existem diversas razões para ter escolhido este processo de vitrificação, incluindo que é um método com volume mínimo amplamente utilizado para embriões humanos e apresenta resultados encorajadores (Cobo *et al.*, 2012; Kuwayama, 2007; Liu *et al.*, 2008; Loutradi *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2014). Em bovinos existem evidências claras que o volume mínimo durante a vitrificação pode minimizar danos, aumentar taxas de sobrevivência e eclosão quando comparados à vitrificação em palhetas convencionais de 0,25 mL (Inaba *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2006) ou à criopreservação pelo congelamento clássico (Inaba *et al.*, 2011; Nicacio *et al.*, 2012; Stinshoff *et al.*, 2011).

Considerando que encontramos uma alta taxa de sobrevivência de blastocistos vitrificados (87%, tabela 2.2) após 4 horas da desvitrificação, assumiu-se que os resultados são consistentes com o conceito de que a vitrificação com *Cryotop* causa danos mínimos aos embriões. Estes resultados de sobrevivência embrionária observados para os embriões vitrificados foram apoiados por resultados do microarranjo e da qPCR, nos quais um número pequeno de genes foram afetados. Uma das razões pela qual o *Cryotop* causa menos danos é a redução do volume da solução de vitrificação para <0,1 µL, que promove um aumento na taxa de resfriamento e, especialmente, na de desvitrificação (até 20.000 °C/min), permitindo uma transição rápida pela zona perigosa de temperatura, correspondente à sensibilidade ao resfriamento (Kuwayama, 2007; Liu *et al.*, 2008). Além disso, no método *Cryotop*, bem

como em outros procedimentos de vitrificação, a formação de cristais de gelo é inibida pela indução do estado vítreo (Kuwayama, 2007).

Apesar de haver inúmeros estudos comparando o efeito de métodos de criopreservação nos aspectos morfológicos e funcionais de embriões bovinos, poucos têm relatado o perfil gênico de embriões bovinos vitrificados (Asgari *et al.*, 2012; Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007; Dinnyes *et al.*, 1999; Enright *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2012; Morato *et al.*, 2010; Nedambale *et al.*, 2004; Nedambale *et al.*, 2006; Nicacio *et al.*, 2012; Park *et al.*, 1999; Pugh *et al.*, 2000; Stinshoff *et al.*, 2011; Sudano *et al.*, 2014a; Sudano *et al.*, 2014b). A maioria dos trabalhos usam principalmente volumes maiores (palheta de 0,25 mL) de solução de vitrificação (Aksu *et al.*, 2012; Sudano *et al.*, 2014a). Pelo nosso conhecimento, este trabalho apresenta pela primeira vez, o efeito da vitrificação por *Cryotop* no perfil de expressão gênica de embriões bovinos. Entretanto, um estudo usando embriões de camundongos (Larman *et al.*, 2011), mostrou que a vitrificação por volume mínimo (*cryoloop*) não causou alteração estatística na expressão de genes, avaliados pelo método de microarranjo, enquanto o congelamento clássico induziu mudanças significativas no transcriptoma, em que vários DEGs foram identificados. Estes resultados reafirmam que o método de vitrificação com volume mínimo diminui danos causados pela criopreservação.

Similarmente aos resultados deste trabalho, alguns estudos encontraram que menos de 30% dos genes selecionados mantiveram a diferença significativa após a análise do microarranjo quando realizada a quantificação por qPCR (Cagnone e Sirard, 2014; Dode *et al.*, 2006; Fair *et al.*, 2004). Desconhece-se o porquê apenas um gene foi confirmado pela qPCR, mas tem-se que considerar que são duas ferramentas distintas. O microarranjo é baseado na hibridização e a qPCR é gerado pela amplificação exponencial. Além disso, é importante dizer que o microarranjo é mais propenso à erros comparado a qPCR devido aos milhares de genes que são analisados simultaneamente após um procedimento de diversas etapas (Uyar *et al.*, 2013). No entanto, é possível que os genes selecionados para a qPCR, por ser uma técnica mais sensível, não detectou a alteração na expressão. Estes resultados apoiam afirmações anteriores de que a informação obtida por microarranjo requer uma confirmação da expressão diferencial por uma técnica mais acurada, como a qPCR (Uyar *et al.*, 2013).

Comparando os perfis de expressão de genes de blastocistos PIV (C e V) usando a plataforma de microarranjo EmbryoGENE, encontramos 130 DEGs com diferença de 1,5 *fold-change*. Quando o FDR foi aplicado como um fator de ajuste mais

rígido, o número de DEGs identificados caiu para apenas 43. Considerando que a maior amplitude de *fold-change* foi 2,61 e que este chip contém aproximadamente 21.139 genes referência conhecidos do total de 38.519 sondas, concluímos que o perfil transcriptômico foi pouco afetado. Estudos utilizando a mesma ferramenta são bastante escassos e a diferença entre os métodos, espécies, tipo e volume do crioprotetor usado torna a comparação com outros resultados extremamente difícil. Não obstante, olhando para os resultados de outros relatos de análises do transcriptoma de embriões bovino, é possível encontrar um número maior de DEGs quando diferentes condições são comparadas. Como exemplo, 532 DEGs foram encontrados entre embriões *in vivo* e *in vitro* (Sudano *et al.*, 2014a) e 962 DEGs foram detectados comparando embriões PIV frescos e vitrificados em D7 (Aksu *et al.*, 2012). Entretanto, em camundongos, Larman *et al.* (2011), encontraram apenas 115 DEGs comparando embriões frescos e congelados pelo método clássico, e nenhum DEG comparando embriões frescos e vitrificados (*cryoloop*). Por isso, consideramos que os poucos DEGs deparados em nesse estudo, pode ser devido à alta eficiência do protocolo de vitrificação, à boa qualidade dos embriões usados que tornou-os mais crioresistentes ou mesmo devido ao curto período de tempo dado aos embriões para recuperação após a desvitrificação (4 horas), enquanto que em grande parte dos estudos cultivava-se por pelo menos 12 horas (Aksu *et al.*, 2012; Larman *et al.*, 2011; Sudano *et al.*, 2014a; Sudano *et al.*, 2012). Embora seja possível que estas 4 horas não foram suficientes para os embriões expressarem as possíveis injúrias, alteração na expressão de genes podem normalmente ser detectadas dentro deste espaço de tempo.

Com o intuito de validar os achados do microarranjo, a expressão dos nove genes foi quantificada pela qPCR. Os genes selecionados estavam inclusos na lista dos 43 DEGs, e envolvidos no controle de proliferação diferenciação e apoptose, bem como no controle de respostas ao estresse. Têm também papel importante nos diversos eventos essenciais como a organogênese, resposta imune e controle de funções cognitivas (IPA, <http://www.ingenuity.com>). Destes nove genes estudados apenas um foi validado pela qPCR ($P < 0,05$), através de amostras biológicas coletadas separadamente das que foram utilizadas para o microarranjo. As menores diferenças dos efeitos da vitrificação por *Cryotop* detectadas em ambos os métodos, sugerem que nosso sistema PIV produziu embriões de alta qualidade e que o procedimento de vitrificação foi muito eficiente.

A validação do microarranjo pela qPCR revelou que o gene *FOSL1* está super-expresso em embriões vitrificados. As proteínas codificadas por este gene fazem parte do complexo do fator ativador de transcrição da proteína-1 (*AP-1*) e estão envolvidos em vários processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (Young e Colburn, 2006). O *FOSL1* tem sido relatado como um regulador chave da placentação e como regulador do fenótipo de invasão do trofoblasto. É essencial como micro-regulador da via de sinalização *PI3K/AKT*, responsável pelo desenvolvimento de linhagens do trofoblasto em estabelecer a ligação materno-fetal em humanos (Kent *et al.*, 2011). Desde de que sua função é bem caracterizada, o *FOSL1* pode ter um papel conservador na regulação da invasão do trofoblasto em espécies que possuem placentação hemocorial. Estas ações do *FOSL1* ainda são consistentes com seu papel proeminente na regulação da invasão de células cancerígenas.

Em contraste com esta atividade de proliferação, o *FOSL1* é também sinalizado pelo estresse. De fato, a super-expressão em linhagens de cultivo celular tem sido mostrada devido ao aumento da apoptose (Hamdi *et al.*, 2008; Shirsat e Shaikh, 2003) e a exposição UV também induz esse aumento.

Uma das principais vias geradas pelo programa IPA mostrou que a ação da proteína *ERK* ativa diretamente os complexos *cFOS* e *CREB*. A sinalização do *ERK5*, por meio de estresse extracelular, afeta diretamente complexos de proteínas nucleares como o *FOSL1* (*FRA-1*), *CREB* e *c-FOS* (Figura 2.4A), que por sua vez, promoverá alteração da expressão de diversos genes. Na Figura 2.4B, vê-se que o complexo *FOS* atinge diretamente a expressão dos genes *FOSL1* e *KRT8*, e indiretamente o gene *HSPA5*. O complexo *CREB1*, além de se autorregular, pode também interferir no complexo *FOS* e outros genes, incluindo o *HSPA5*. Adicionalmente, o complexo de resposta tumoral celular, aparece em resposta ao estímulo pelo estresse e correlaciona estas duas principais proteínas (*FOS* e *CREB1*) desta via. O complexo de resposta tumoral celular influencia estas proteínas e conseqüentemente altera a expressão gênica de outras moléculas importantes, como o *CD38* e o *HSPA5*. O método de vitrificação é um procedimento extremamente estressante; por isso é possível que o aumento da expressão do *FOSL1* seja devido à morte celular pelo mecanismo de apoptose ou devido à reação do embrião tentando proteger-se contra o estresse.

Concluindo, este estudo fornece um esboço do efeito da vitrificação no perfil molecular de embriões bovinos PIV. Um número pequeno de DEGs associados

com a resposta à vitrificação foi detectado nas análises do microarranjo. O fator de transcrição *FOSL1* foi super-expresso em embriões vitrificados, sugerindo que a via apoptótica está envolvida na resposta do embrião à criopreservação. O aumento de transcritos de mRNA para este gene pode tanto indicar que o embrião está se protegendo do estresse, como que a apoptose foi induzida por algum dano celular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksu, D. A.; Agca, C.; Aksu, S.; Bagis, H.; Akkoc, T.; Caputcu, A. T.; Arat, S.; Taskin, A. C.; Kizil, S. H.; Karasahin, T.; Akyol, N.; Satilmis, M.; Sagirkaya, H.; Ustuner, B.; Nur, Z.; Agca, Y. Gene expression profiles of vitrified *in vitro*- and *in vivo*-derived bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 79, n. 9, p. 613-25, Sep 2012.

Asgari, V.; Hosseini, S. M.; Forouzanfar, M.; Hajian, M.; Nasr-Esfahani, M. H. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 278-83, Dec 2012.

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, n. 11, p. 1395-405, Nov 2007.

Bruyere, P.; Baudot, A.; Guyader-Joly, C.; Guerin, P.; Louis, G.; Buff, S. Improved cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1294-302, Oct 1 2012.

Cagnone, G.; Sirard, M.-A. The impact of exposure to serum lipids during *in vitro* culture on the transcriptome of bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 712-722.e3, 2014.

Chitwood, J. L.; Rincon, G.; Kaiser, G. G.; Medrano, J. F.; Ross, P. J. RNA-seq analysis of single bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 14, p. 350-350, 2013.

Cobo, A.; de los Santos, M. J.; Castello, D.; Gamiz, P.; Campos, P.; Remohi, J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 5, p. 1138-46 e1, Nov 2012.

Cobo, A.; Meseguer, M.; Remohi, J.; Pellicer, A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. **Hum Reprod**, v. 25, n. 9, p. 2239-46, Sep 2010.

Dinnyes, A.; Lonergan, P.; Fair, T.; Boland, M. P.; Yang, X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of *in vitro*-produced bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 53, n. 3, p. 318-24, Jul 1999.

Dode, M. A.; Dufort, I.; Massicotte, L.; Sirard, M. A. Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 73, n. 3, p. 288-97, Mar 2006.

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**, v. 54, n. 5, p. 659-73, Sep 15 2000.

Fair, T.; Gutierrez-Adan, A.; Murphy, M.; Rizos, D.; Martin, F.; Boland, M. P.; Lonergan, P. Search for the bovine homolog of the murine *ped* gene and characterization of its messenger RNA expression during bovine preimplantation development. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 2, p. 488-94, Feb 2004.

Gad, A.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Holker, M.; Cinar, M. U.; Rings, F.; Dufort, I.; Sirard, M. A.; Schellander, K.; Tesfaye, D. 211 *in vitro* culture conditions affect gene expression pattern of bovine blastocyst in a stage-specific manner. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 1, p. 254, Dec 2012a.

Gad, A.; Hoelker, M.; Besenfelder, U.; Havlicek, V.; Cinar, U.; Rings, F.; Held, E.; Dufort, I.; Sirard, M. A.; Schellander, K.; Tesfaye, D. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative *in vivo* and *in vitro* culture conditions. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 4, p. 100, Oct 2012b.

Gupta, M. K.; Uhm, S. J.; Lee, H. T. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and *in vitro* development of oocytes vitrified before or after *in vitro* fertilization. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 8, p. 2602-7, May 15 2010.

Hamdi, M.; Popeijus, H. E.; Carlotti, F.; Janssen, J. M.; van der Burgt, C.; Cornelissen-Steijger, P.; van de Water, B.; Hoeben, R. C.; Matsuo, K.; van Dam, H. ATF3 and Fra1 have opposite functions in JNK- and ERK-dependent DNA damage responses. **DNA repair**, v. 7, n. 3, p. 487-96, Mar 1 2008.

Holm, P.; Booth, P. J.; Schmidt, M. H.; Greve, T.; Callesen, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 683-700, 1999.

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. **The Journal of reproduction and development**, v. 57, n. 4, p. 437-43, Sep 2011.

Kent, L. N.; Rumi, M. A.; Kubota, K.; Lee, D. S.; Soares, M. J. FOSL1 is integral to establishing the maternal-fetal interface. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 23, p. 4801-13, Dec 2011.

Kim, Y. M.; Uhm, S. J.; Gupta, M. K.; Yang, J. S.; Lim, J. G.; Das, Z. C.; Heo, Y. T.; Chung, H. J.; Kong, I. K.; Kim, N. H.; Lee, H. T.; Ko, D. H. Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 1085-93, Sep 15 2012.

Kuwayama, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73-80, Jan 1 2007.

- Kuwayama, M.; Vajta, G.; Ieda, S.; Kato, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 5, p. 608-14, Nov 2005a.
- Kuwayama, M.; Vajta, G.; Kato, O.; Leibo, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 3, p. 300-8, Sep 2005b.
- Lane, M.; Schoolcraft, W. B.; Gardner, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and sterility**, v. 72, n. 6, p. 1073-8, Dec 1999.
- Larman, M. G.; Katz-Jaffe, M. G.; McCallie, B.; Filipovits, J. A.; Gardner, D. K. Analysis of global gene expression following mouse blastocyst cryopreservation. **Hum Reprod**, v. 26, n. 10, p. 2672-80, Oct 2011.
- Liu, Y.; Du, Y.; Lin, L.; Li, J.; Kragh, P. M.; Kuwayama, M.; Bolund, L.; Yang, H.; Vajta, G. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of *in vitro* matured pig oocytes. **Cryo letters**, v. 29, n. 4, p. 315-20, Jul-Aug 2008.
- Loutradi, K. E.; Kolibianakis, E. M.; Venetis, C. A.; Papanikolaou, E. G.; Pados, G.; Bontis, I.; Tarlatzis, B. C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 1, p. 186-93, Jul 2008.
- Machado, G. M.; Carvalho, J. O.; Filho, E. S.; Caixeta, E. S.; Franco, M. M.; Rumpf, R.; Dode, M. A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-97, May 2009.
- Makarenkov, V.; Zentilli, P.; Kevorkov, D.; Gagarin, A.; Malo, N.; Nadon, R. An efficient method for the detection and elimination of systematic error in high-throughput screening. **Bioinformatics**, v. 23, n. 13, p. 1648-57, Jul 1 2007.
- Malone, J. H.; Oliver, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC biology**, v. 9, p. 34, 2011.
- Mamo, S.; Carter, F.; Lonergan, P.; Leal, C. L.; Al Naib, A.; McGettigan, P.; Mehta, J. P.; Evans, A. C.; Fair, T. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and *in vitro* matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v. 12, p. 151, 2011.
- Martino, A.; Songsasen, N.; Leibo, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 5, p. 1059-69, May 1996.
- Miron, M.; Woody, O. Z.; Marcil, A.; Murie, C.; Sladek, R.; Nadon, R. A methodology for global validation of microarray experiments. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 333, 2006.
- Morato, R.; Izquierdo, D.; Paramio, M. T.; Mogas, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 7, p. 1141-7, 2010.
- Nedambale, T. L.; Dinnyes, A.; Yang, X.; Tian, X. C. Bovine blastocyst development *in vitro*: timing, sex, and viability following vitrification. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1671-6, Nov 2004.

- Nedambale, T. L.; Du, F.; Yang, X.; Tian, X. C. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with beta-mercaptoethanol. **Animal reproduction science**, v. 93, n. 1-2, p. 61-75, Jun 2006.
- Nicacio, A. C.; Simoes, R.; de Paula-Lopes, F. F.; de Barros, F. R.; Peres, M. A.; Assumpcao, M. E.; Visintin, J. A. Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of *in vitro* produced bovine embryos. **Zygote**, v. 20, n. 2, p. 117-22, May 2012.
- Papis, K.; Shimizu, M.; Izaike, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 651-8, Sep 15 2000.
- Park, S. P.; Kim, E. Y.; Kim, D. I.; Park, N. H.; Won, Y. S.; Yoon, S. H.; Chung, K. S.; Lim, J. H. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. **Hum Reprod**, v. 14, n. 11, p. 2838-43, Nov 1999.
- Park, S. Y.; Kim, E. Y.; Cui, X. S.; Tae, J. C.; Lee, W. D.; Kim, N. H.; Park, S. P.; Lim, J. H. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**, v. 14, n. 2, p. 125-31, May 2006.
- Parmegiani, L.; Cognigni, G. E.; Bernardi, S.; Cuomo, S.; Ciampaglia, W.; Infante, F. E.; Tabarelli de Fatis, C.; Arnone, A.; Maccarini, A. M.; Filicori, M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**, v. 23, n. 4, p. 505-12, Oct 2011.
- Parrish, J. J.; Krogenaes, A.; Susko-Parrish, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-69, Oct 15 1995.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.
- Pugh, P. A.; Tervit, H. R.; Niemann, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. **Animal reproduction science**, v. 58, n. 1-2, p. 9-22, Feb 28 2000.
- Rienzi, L.; Romano, S.; Albricci, L.; Maggiulli, R.; Capalbo, A.; Baroni, E.; Colamaria, S.; Sapienza, F.; Ubaldi, F. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. **Hum Reprod**, v. 25, n. 1, p. 66-73, Jan 2010.
- Roy, T. K.; Brandi, S.; Tappe, N. M.; Bradley, C. K.; Vom, E.; Henderson, C.; Lewis, C.; Battista, K.; Hobbs, B.; Hobbs, S.; Syer, J.; Lanyon, S. R.; Dopheide, S. M.; Peura, T. T.; McArthur, S. J.; Bowman, M. C.; Stojanov, T. Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields *in vitro* outcomes equivalent to the manual Cryotop method. **Hum Reprod**, v. 29, n. 11, p. 2431-8, Nov 2014.
- Saenz-de-Juano, M. D.; Marco-Jimenez, F.; Viudes-de-Castro, M. P.; Lavara, R.; Vicente, J. S. Direct comparison of the effects of slow freezing and vitrification on late blastocyst gene expression, development, implantation and offspring of rabbit morulae. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 49, n. 3, p. 505-11, Jun 2014.
- Shirsat, N. V.; Shaikh, S. A. Overexpression of the immediate early gene fra-1 inhibits proliferation, induces apoptosis, and reduces tumourigenicity of c6 glioma cells. **Experimental Cell Research**, v. 291, n. 1, p. 91-100, 2003.

Sole, M.; Santalo, J.; Boada, M.; Clua, E.; Rodriguez, I.; Martinez, F.; Coroleu, B.; Barri, P. N.; Veiga, A. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. **Hum Reprod**, v. 28, n. 8, p. 2087-92, Aug 2013.

Stinshoff, H.; Wilkening, S.; Hanstedt, A.; Brüning, K.; Wrenzycki, C. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1433-1441, 2011.

Sudano, M. J.; Caixeta, E. S.; Paschoal, D. M.; Martins, A., Jr.; Machado, R.; Buratini, J.; Landim-Alvarenga, F. D. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, n. 8, p. 1129-41, Oct 2014a.

Sudano, M. J.; Paschoal, D. M.; da Silva Rascado, T.; Crocomo, L. F.; Magalhaes, L. C.; Junior, A. M.; Machado, R.; da Cruz Landim-Alvarenga, F. Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 124-31, May 2014b.

Sudano, M. J.; Santos, V. G.; Tata, A.; Ferreira, C. R.; Paschoal, D. M.; Machado, R.; Buratini, J.; Eberlin, M. N.; Landim-Alvarenga, F. D. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus In Vitro*- and *In Vivo*-Produced Blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 130, 2012.

Uyar, A.; Torrealday, S.; Seli, E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 4, p. 979-97, Mar 15 2013.

Vajta, G.; Holm, P.; Kuwayama, M.; Booth, P. J.; Jacobsen, H.; Greve, T.; Callesen, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 51, n. 1, p. 53-8, Sep 1998.

Vajta, G.; Kuwayama, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236-44, Jan 7 2006.

Vajta, G.; Nagy, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v. 12, n. 6, p. 779-96, 2006.

Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002.

Young, M. R.; Colburn, N. H. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. **Gene**, v. 379, p. 1-11, Sep 1 2006.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO SEXO NA CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Ligiane de Oliveira Leme ^a, Margot Alves Nunes Dode ^{a,b}

^a Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília / DF – Brasil

^b Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília / DF – Brasil

RESUMO

EFEITO DO SEXO NA CRIOTOLERÂNCIA DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Sabe-se que embriões macho e fêmea são diferentes entre si morfofisiológica, molecular e estruturalmente. Essas diferenças se referem não só à aparência morfológica e ao estágio de desenvolvimento, mas também à idade ou velocidade em que atingem determinado estágio. Existe um consenso de que embriões produzidos *in vitro* (PIV) machos desenvolvem-se mais rapidamente do que as fêmeas, e que são mais tolerantes a estresses diversos. Essas diferenças podem induzir uma predileção no sexo dos embriões quando a criopreservação é preconizada. O objetivo deste experimento foi avaliar se o sexo afeta a resposta dos embriões à vitrificação. Para isso foram utilizados 5 touros e comparou-se além da produção de embriões, a resposta à criopreservação dos embriões produzidos, pelo método *Cryotop*. Inicialmente, embriões em estágio de blastocisto foram vitrificados (144 a 156 horas pós-inseminação), para avaliação da criotolerância relativa aos touros; enquanto que embriões em estágio de blastocisto expandido foram removidos do cultivo no D6, D7 e D8, e sexados, para avaliação da cinética de desenvolvimento. Na segunda etapa, embriões em estágio de blastocisto expandido foram vitrificados (168 horas pós-inseminação). Todos os embriões (re-expandidos, evoluídos para o estágio de blastocisto eclodido e degenerados), de ambos tratamentos, com 24 horas de cultivo pós-vitrificação foram usados para sexagem. Os resultados sugerem que a escolha do touro, apesar de não interferir na cinética de desenvolvimento embrionário, afeta a produção de blastocistos e também a resposta à criopreservação. E ainda, que os touros

que produzem embriões mais crioresistentes nem sempre são os que produzem maior taxa de embriões PIV. Além disso, embriões macho e fêmea têm a mesma capacidade de resposta à vitrificação por *Cryotop*.

Palavras-chave: Cinética embrionária; Sexagem; Efeito Touro; Vitrificação; *Cryotop*.

ABSTRACT

EFFECT OF SEX ON CRIOTOLERANCE OF BOVINE *IN VITRO* PRODUCED EMBRYOS

It is known that male and female embryos are morphophysiological, molecular and structurally different. These differences refer not only to the morphological appearance and developmental stage, but also to age or speed at which they reach a certain stage. There is a consensus that *in vitro* produced (IVP) male embryos develop faster than females, and that they are more tolerant to external stresses. These differences may induce an embryo sex predilection, when performing cryopreservation. The objective of this experiment was to evaluate if sex respond differently to cryopreservation. For this, five bulls were taken and embryos cryopreservation by *Cryotop* method was compared in addition to embryo production. Initially, blastocyst stage embryos were vitrified (144 to 156 hours post-insemination), to evaluate the cryotolerance relative to the bulls; while expanded blastocyst stage embryos were removed from culture at D6, D7 and D8, then sexed for developmental kinetics evaluation. As a second part, expanded blastocyst stage embryos were vitrified (168 hours post-insemination). All embryos (re-expanded, hatched blastocyst stage e, and degenerated) of both treatments, with 24 hours post-vitrification culture were used for sexing. The results suggest that sire's choice, although not interfering in embryonic development kinetics, affects the blastocysts rates and also cryopreservation response. Besides, bulls producing more cryoresistent embryos are not always the ones that

produce the highest IVP embryo rate. In addition, male and female embryos have the same *Cryotop* vitrification response.

Key words: Embryo kinetic; Sexing; Bovine embryo; Sire's influence; Vitrification. *Cryotop*.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* é um dos diversos métodos bem estabelecidos de biotécnicas de reprodução assistida utilizada globalmente em várias espécies, em particular para a indústria pecuária, e a criopreservação é uma parte importante para o comércio de embriões.

Na espécie bovina, variações individuais entre touros bem como entre ejaculados ou partidas de sêmen congelado de um mesmo indivíduo são relatadas tanto para fecundação *in vivo* como para as condições *in vitro*. O início e a duração da fase de replicação de DNA são afetados por diversos fatores de origem paterna e a duração desta fase está correlacionada ao potencial de desenvolvimento embrionário subsequente. Contudo, existem muitos fatores conflitantes e desconhecidos para o completo entendimento do efeito do macho no desenvolvimento embrionário inicial (Alomar *et al.*, 2008). De fato, não se pode ignorar a influência paterna e materna de acordo com as variáveis em que são submetidos tanto os ovócitos, como o sêmen.

Tem sido relatado que o sêmen, de modo geral, possui uma proporção de espermatozoides Y:X com razão Mendeliana, isto é igual a 1 (Tarín *et al.*, 2014). Uma das características da programação do desenvolvimento embrionário é que o fenótipo pós-natal varia entre descendentes machos e fêmeas. Alterações no ambiente de desenvolvimento embrionário podem causar efeitos a longo prazo, que se estendem para a vida pós-natal (Hansen *et al.*, 2010). Logo, os fatores que levam à predileção de um ou outro cromossomo de origem masculina no momento da fecundação são variados (Alomar *et al.*, 2008; Avery *et al.*, 1992; Avery *et al.*, 1991; Enright *et al.*, 2000;

Gutierrez-Adan *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 2010; Lonergan *et al.*, 1999; Parrish *et al.*, 1995; Rizos *et al.*, 2008a).

Ao final da fecundação do ovócito, os períodos seguintes de clivagem embrionária e formação de blastocisto dependerão das condições de cultivo *in vitro* (Holm *et al.*, 1999; Rizos *et al.*, 2008b). Burgoyne (1993) relata que em camundongos o cromossomo Y carrega um fator que acelera a taxa de desenvolvimento pré-implantação. A predileção do sexo devido às condições de cultivo podem ocorrer após o estágio de mórula (Gutierrez-Adan *et al.*, 1996) e pouco se sabe sobre o possível impacto do touro na distribuição de sexo após a FIV e o impacto pelo estresse, como a criopreservação.

Embora inúmeras pesquisas estejam sendo conduzidas em escala mundial, a criopreservação de embriões PIV de várias espécies ainda não apresenta resultados satisfatórios. Somente 5% dos embriões PIV transferidos na América do Sul são criopreservados (Blondin, 2015), e no Brasil apenas 4% dos embriões *in vivo* e 13,5% de embriões produzidos *in vitro* oriundos de OPU (Perry, 2016) são submetidos à esta biotécnica. Os resultados mais promissores têm sido obtidos a partir do desenvolvimento dos métodos de vitrificação (Kim *et al.*, 2012; Kuwayama, 2007; Liu *et al.*, 2008; Loutradi *et al.*, 2008; Morato *et al.*, 2010), principalmente o método *Cryotop* (Kuwayama *et al.*, 2005b), que minimiza os efeitos negativos e melhora as taxas de sobrevivência.

Sabe-se que o embrião PIV detém características distintas quando comparado ao produzido *in vivo*, sendo que essas envolvem aspectos morfológicos (Papis *et al.*, 2000) e moleculares que afetam a qualidade e o desenvolvimento embrionário (Abe *et al.*, 2002; Enright *et al.*, 2000), diminuindo a criotolerância e as taxas de prenhez (Abe *et al.*, 2002; Clemente *et al.*, 2011; Enright *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2013b; Mundim *et al.*, 2009; Rizos *et al.*, 2008b; Rizos *et al.*, 2002b; Sudano *et al.*, 2012; Tesfaye *et al.*, 2004).

Em se tratando de qualidade dos embriões e criopreservação, relatos que apresentam as melhores taxas de gestação de embriões PIV criopreservados obtidas até o presente utilizam para criopreservação apenas embriões de D7 no estágio de blastocisto expandido e de “excelente” qualidade (Marinho *et al.*, 2015; Sanches *et al.*, 2016). Assim sendo, a seleção morfológica de embriões é parte dos protocolos de criopreservação, sendo a velocidade de desenvolvimento um fator decisivo no momento de indicar quais são os embriões de melhor qualidade e quais devem ser

criopreservados. Isso porque inúmeros estudos têm mostrado que os embriões que clivam mais cedo e que se desenvolvem mais rápido são de melhor qualidade (George *et al.*, 2008; Saha *et al.*, 1996), apresentando maior taxa de gestação (Florentino *et al.*, 2013; Hasler *et al.*, 1995; Lonergan *et al.*, 1999) e melhor taxa de eclosão após criopreservação (Leme, 2008; Morato *et al.*, 2010). Portanto, a qualidade se refere não só à aparência morfológica e ao estágio de desenvolvimento, mas também à idade ou velocidade em que eles atingem determinado estágio.

Por outro lado, também existe um consenso de que embriões PIV machos desenvolvem-se mais rapidamente do que as fêmeas, e que existe um desvio na proporção macho:fêmea em embriões *in vitro* avaliados no D7, D11 e D14 (Machado *et al.*, 2013a). E, as condições de cultivo podem resultar em alteração do padrão na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento e comprometer o desenvolvimento embrionário (Salilew-Wondim *et al.*, 2014). A condição de cultivo, como a adição de glicose, por exemplo, pode acelerar o desenvolvimento de embriões machos e diminuir fêmeas (Bredbacka e Bredbacka, 1996; Peippo *et al.*, 2001).

Portanto, é importante esclarecer se a seleção morfológica de embriões de melhor qualidade em D7 para a criopreservação não induziria a predileção no sexo dos embriões. Da mesma forma, é fundamental identificar se o sexo influencia a resposta dos embriões PIV à criopreservação. Esse questionamento foi levantado visto que embriões machos e fêmeas são diferentes não só quanto velocidade de desenvolvimento (Avery *et al.*, 1992; Avery *et al.*, 1991), mas também quanto ao metabolismo, padrão de expressão de genes (Machado *et al.*, 2013b), padrões epigenéticos (Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008) e resposta ao estresse (Alomar *et al.*, 2008; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2010b).

O presente trabalho visa esclarecer se o touro afeta a resposta à criopreservação, se os embriões selecionados para a criopreservação desviam a razão entre gêneros, e se os efeitos que a criopreservação causa nos embriões podem variar de acordo com o sexo.

1.1. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do touro e do sexo de embriões PIV em resposta à vitrificação por *Cryotop*.

Objetivos Específicos

- Caracterizar a resposta de embriões macho e fêmea à vitrificação por *Cryotop*.

1.2. Hipótese

A seleção morfológica dos melhores embriões PIV para a criopreservação é tendenciosa para seleção de embriões machos, e esses respondem diferente de fêmeas à vitrificação

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A menos que indicado, os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). As hastes tipo *Cryotop* foram adquiridas da Vitringá (Maringá, PR, Brasil).

Para atender aos objetivos propostos, foram realizados dois experimentos:

- *Experimento I* – Efeito dos touros na velocidade do desenvolvimento embrionário e resposta à criopreservação.
- *Experimento II* – Efeito do sexo do embrião bovino na sobrevivência à vitrificação.

2.1. Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

2.2. Produção *in vitro* de embriões bovinos

Os embriões foram produzidos a partir de ovócitos oriundos de ovários de abatedouro, transportados ao laboratório em solução salina (NaCl, 0,9%), suplementada com amicacina (250 µg/mL). Foram aspirados folículos de tamanho entre 2 e 8 milímetros com o auxílio de seringa e agulha hipodérmica. A seleção foi feita

considerando a homogeneidade do citoplasma e o número de camadas e a integridade das células dos *cumulus*, sendo que apenas ovócitos de grau I e II foram utilizados.

Após a aspiração e seleção, os ovócitos foram separados em grupos de 25-30 e maturados *in vitro* em meio de maturação (TCM 199 saís de Earl's (Invitrogen®) suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Invitrogen®), 24 UI/mL de hormônio luteinizante (LH), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 1 µg/mL de L-glutamina, 0,1 mM de Cisteamina, 0,2 mM de Piruvato de Sódio e 250 mg/mL de sulfato de amicacina, em gotas de 150 µL cobertas por óleo de silicone e incubados por 22 – 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 38,8 °C.

Para a fecundação *in vitro*, inicialmente foram utilizadas doses de sêmen congelado de cinco touros da raça Nelore, previamente testados e selecionados, valendo-se da mesma partida inicial de cada touro para o estudo. Para o experimento de criotolerância e cinética do desenvolvimento embrionário, os touros foram aleatoriamente escolhidos para as manipulações, até a obtenção do número de embriões necessários para avaliar a diferença entre os touros na criotolerância, sexo do embrião e cinética do desenvolvimento embrionário. Mediante os resultados, o touro que teve a proporção macho:fêmea mais próxima de 50% em D7, além de não apresentar diferença para os tratamentos C e V ($p < 0,05$), foi eleito para a segunda parte do experimento, que envolveu a avaliação da crioresistência relacionada ao sexo.

A técnica para seleção espermática foi o gradiente de Percoll® (400 µL de Percoll 90% e 400 µL de Percoll 45%, centrifugado a 5000g/5min), segundo descrito por Machado *et al.* (2009), tendo a dose inseminante a concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL. As estruturas (ovócitos maturados e espermatozoides) foram co-incubadas em meio TALP (Parrish *et al.*, 1995) suplementado com 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina, por 14 – 16 horas a temperatura de 38,8° C, com atmosfera de 5% de CO₂.

Os possíveis zigotos foram transferidos então para o meio de cultivo embrionário Fluido Sintético de Oviduto (SOF) – (Holm *et al.*, 1999), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais 0,34 mM de *sodium tri citrato*, 2,77 mM de myo-inositol e 5% SFB (Invitrogen®), onde permaneceram até o momento da vitrificação.

Considerando dia 0 (zero) o dia da inseminação, as estruturas foram avaliadas quanto à taxa de clivagem no D2 (48 horas pós-inseminação [*pi*]) e entre D6 e D6,5 (144 a 156 horas *pi*), D7 (168 horas *pi*) e D8 (192 horas *pi*) para taxa de

blastocistos. Os embriões (BL ou BX) criopreservados foram classificados (grau I) de acordo com critérios estabelecidos pela International Embryo Transfer Society (IETS) e distribuídos igualmente em dois grupos: Controle (C) e Vitrificadas (V), dependendo do experimento.

No experimento I, embriões BL em D6 e D6,5 foram utilizados para criopreservação, enquanto os embriões em estágio de BX em D6, D7 e D8 foram armazenados para avaliação do sexo, de acordo com os touros empregados na FIV.

No experimento II, apenas um touro foi usado na PIVE, que apresentou mesma proporção de embriões macho e fêmea, além de não apresentar diferença para os tratamentos C e V ($p < 0,05$) no experimento anterior. Os BX de D7 foram criopreservados e avaliados posteriormente quanto à sobrevivência e ao sexo.

2.3. Vitrificação dos embriões

A vitrificação dos embriões foi realizada como descrito previamente por Kuwayama *et al.* (2005b), com pequenas modificações. Todos os meios utilizados permaneceram em temperatura ambiente, com exceção da solução de desvitrificação 1 (DV1), aquecida a 38,8 °C. Uma solução de manutenção (SM), foi utilizada para manipulação dos embriões durante a vitrificação e desvitrificação, cuja composição é TCM-199 com HEPES (Invitrogen®) suplementado com 20% SFB.

Os embriões foram submetidos a 3 banhos sequenciais em solução de equilíbrio (SV1), constituída de SM acrescido de 7,5% etileno glicol (EG) e 7,5% de dimetil-sulfóxido (DMSO), permanecendo em cada gota (banho) por 3 minutos; o tempo total de exposição à SV1 foi entre 9 e 15 minutos. Após o equilíbrio, os embriões foram transferidos para a solução de vitrificação (SV2), composta por SM suplementado com 15% EG, 15% DMSO e 0,5 M de sacarose; nesta solução os embriões passaram por 4 banhos sequenciais, em um tempo total de 45 - 60 segundos.

As estruturas foram então colocadas nas hastes de vitrificação com auxílio de uma micro-pipeta de vidro com diâmetro aproximado de 150 µm. Imediatamente após a deposição das estruturas nas hastes, o excesso de solução era retirado, deixando somente uma fina camada (aproximadamente 0,1µL) sobre as estruturas. Então, a haste foi mergulhada diretamente, em posição vertical, no nitrogênio

líquido (N₂L). Os embriões do grupo V, permaneceram pelo menos 30 minutos em N₂L, antes do procedimento de desvitrificação.

Para a desvitrificação, a haste foi retirada do N₂L com o auxílio de uma pinça e a extremidade contendo os embriões mergulhada na primeira solução de desvitrificação (DV1), composta por SM acrescido de 1 M de sacarose. Os embriões permaneceram em DV1 por 1 minuto, e posteriormente transferidos para uma solução menos concentrada (DV2) composta por SM acrescido de 0,5 M de sacarose, durante 3 minutos. Finalmente, foram lavados em 2 gotas de SM, permanecendo 5 minutos em cada. Embriões do grupo C foram mantidos na bancada em SM, a 37° C, enquanto o grupo V foi submetido ao processo de vitrificação/desvitrificação. Os embriões foram recolocados em meio SOF, permanecendo por 4 e/ou 24 (dependendo do experimento) horas adicionais na incubadora.

Ao final do período adicional de cultivo, os embriões foram avaliados quanto à re-expansão e/ou eclosão e aqueles considerados com aspecto morfológico compatível à sobrevivência (expandidos ou eclodidos) foram colocados em PBS adicionados de RNA later e armazenados a -80° C até a extração de DNA para sexagem. Os embriões degenerados foram também armazenados, da mesma forma, para sexagem.

2.4. Avaliação do Sexo dos Embriões

A determinação do sexo dos embriões produzidos para os dois experimentos, foi realizada pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), em que foram utilizados dois pares de *primers* (do inglês, oligonucleotídeos iniciadores) distintos (Ludwig®), adaptado do protocolo adotado pelo laboratório e descrito por De Sousa *et al.* (2017). O primeiro par de *primer* é específico para região do cromossomo Y, enquanto o segundo é específico para um gene autossômico bovino. Inicialmente, os embriões foram expostos por 5 min a 50 °C em uma solução de lise, contendo 1X tampão de PCR, e 15 µg de proteinase K (Invitrogen®) em um volume final de 10 µL; posteriormente a proteinase K foi inativada à 95 °C por 5 min. O PCR foi realizado pela adição de mix-PCR contendo 50 nM do par de *primer* autossômico bovino e 75 nM do par de *primers* Y, 200 µM de dNTP, tampão PCR 1X e 1U Taq Polimerase Platinun® (Invitrogen®), com volume final de 30 µL, em cada amostra colocada individualmente em micro tubos. O programa da PCR utilizado consistiu de aquecimento a 94 °C por 2

minutos, 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 57 °C por 40 segundos e 72 °C por 40 segundos, seguido pela extensão final de 72 °C por 3 minutos. A visualização dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (10 mg/mL), sob iluminação ultra-violeta. Para fins de leitura dos resultados: quando dois *amplicons* (do inglês, fragmento amplificado) de 280 e 210 pares de base foram detectados, o embrião foi considerado macho; enquanto da detecção de um *amplicon* de 280 pares de base, o embrião foi considerado fêmea (Figura 3.1).

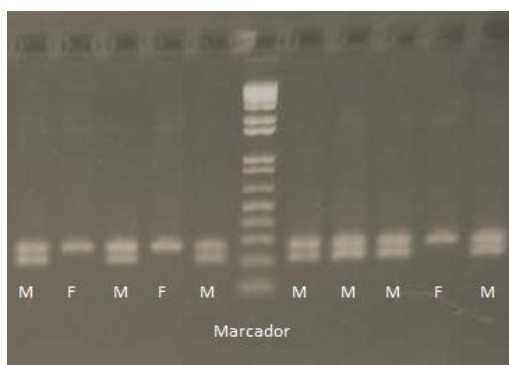


Figura 3.1: Resultados da reação de cadeia polimerase para embriões bovinos individuais, em gel de agarose 1,5%. Embriões machos (M), embriões fêmeas (F), marcador molecular (Marcador).

2.5. Análise Estatística

A comparação das taxas de blastocistos, sobrevivência e expansão após a desvitrificação foi realizada pelo teste de *Tukey*. Os dados comparando os touros foram analisados pelo teste de *Mann-Whitney*. Os dados de frequência do sexo foram analisados pelo teste Q-quadrado e *Mann-Whitney*. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o Programa Prophet, versão 5.0; 1997 e Action Stat Pro, considerando valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Inicialmente, para avaliar o efeito do touro na produção de embriões, foram utilizados cinco reprodutores, denominados aqui por T1, T2, T3, T4 e T5. Considerando $p < 0,05$, a taxa de clivagem foi menor para o T2 em relação aos demais touros (Tabela 3.1). Já para taxa de blastocisto total em D6, o T2 foi diferente do T1, mas não dos demais touros. Em D7, todos os animais tiveram maior taxa de blastocisto total em relação ao T2. Entretanto, em D8, essa diferença de produção de blastocistos do T2 não foi detectada na comparação com T1 e T5. Todavia, no tocante à velocidade de desenvolvimento em D6, observou-se semelhança para todos os animais.

No que se refere à criotolerância, inicialmente foi avaliado se o touro afetaria a resposta à vitrificação. Os dados mostraram que não houve diferença entre touros quando os grupos C ou V foram comparados (Tabela 3.2). Contudo, quando se analisou a resposta de cada touro individualmente pode-se observar que para os touros 2 e 5 a taxa de sobrevivência foi semelhantes entre C e V. Da mesma forma, para esses dois touros os grupos C e V apresentaram porcentagem de embriões que evoluíram para o estágio de BX e porcentagem de embriões degenerados às 24 horas após o aquecimento semelhantes ($P > 0,05$).

Para avaliar o efeito do touro na proporção macho:fêmea, os embriões que atingiram o estágio de BX foram removidos do cultivo nos dias 6, 7 e 8 e utilizados para a sexagem. Quando se desconsiderou o efeito individual do touro, não foi observada diferença na proporção macho:fêmea nos embriões BX de D6 (Tabela 3.3). Entretanto, a presença de mais embriões machos do que embriões fêmeas é evidente quando se analisa BX de D7 e D8. Considerando os touros individualmente, apenas o

T2 e T4 apresentam diferença na proporção de embriões macho:fêmea no D7 de desenvolvimento.

No experimento II foi avaliado o efeito da vitrificação na sobrevivência de embriões bovinos machos e fêmeas. O Touro 5 foi escolhido para PIV. Apenas embriões em estágio de BX foram utilizados para a vitrificação nesta etapa. Os dados de produção de embriões do touro selecionado estão apresentados na Tabela 3.4. As taxas de clivagem e blastocisto em D6 foram similares às obtidas em experimento anterior (Tabela 3.1). Cerca de 62% dos blastocistos em D7 encontravam-se em estágio de BX, nas manipulações realizadas para produção destas estruturas. Destes, 89,8% foram considerados viáveis para vitrificação, isto é: possuíam qualidade I, segundo classificação da IETS.

Na avaliação da taxa de sobrevivência após 24 horas da desvitrificação, não houve diferença entre C e V quando se avaliou o número de embriões degenerados (Tabela 3.4). Neste período, a maioria dos embriões haviam eclodido em ambos os tratamentos, mas o grupo C apresentou mais embriões em estágio de BE em comparação ao V. Ao verificar o sexo desses embriões criopreservados ou não (Tabela 3.5), quanto ao desenvolvimento no período analisado, observou-se que a proporção macho:fêmea foi semelhante.

Tabela 3.1: Taxas de clivagem (D2) e de Blastocistos no dia 6 de desenvolvimento (D6) de 5 touros (T) da raça Nelore utilizados para a produção *in vitro* de embriões.

Touro	N Ovócitos	Clivagem		D6						D7		D8			
		N Total	%	BI	%	BL	%	BX	%	Total	%	Total	%		
T1	1832	1496	81.7% ^a	126	19.7% ^a	428	67.1% ^a	82	12.9% ^a	636	34.7% ^{ab}	719	39.2% ^a	732	40% ^{ab}
T2	616	350	56.8% ^b	43	30.5% ^a	87	61.7% ^a	11	7.8% ^a	141	22.9% ^b	145	23.5% ^b	152	24.7% ^b
T3	1779	1614	90.7% ^a	249	33.2% ^a	460	61.3% ^a	42	5.6% ^a	751	42.2% ^{ab}	851	47.8% ^a	927	52.1% ^a
T4	2172	1789	82.4% ^a	302	30.9% ^a	584	59.7% ^a	92	9.4% ^a	978	45.0% ^a	950	43.7% ^a	1001	46.1% ^a
T5	1056	881	83.4% ^a	138	32.4% ^a	257	60.3% ^a	31	7.3% ^a	426	40.3% ^{ab}	418	39.6% ^a	432	40.9% ^{ab}

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna, representam diferença entre tratamentos: Comparação entre touros, por ANOVA, Teste Tukey ($p < 0,05$).

D7: dia 7 do desenvolvimento embrionário (estimativa, considerando os embriões removidos em D6); D8: dia 8 do desenvolvimento embrionário (estimativa, considerando os embriões removidos em D6 e D7); BI: embriões no estágio de blastocisto inicial; BL: embriões no estágio de blastocisto; BX: embriões no estágio de blastocisto expandido.

Tabela 3.2: Efeito do touro (T) na taxa de sobrevivência e desenvolvimento às 4 e 24 horas após o aquecimento, dos embriões produzidos *in vitro* e vitrificados em estágio de blastocistos (BL) em D6.

Touro	Tratamento	N Total (BL)	Taxa Sobrevivência		Desenvolvimento pós-desvitrificação													
					4h						24h							
					N Total	BL		BX		Degenerados		N Total	BL		BX		Degenerados	
N	%	N	%	N		%	N	%	N	%	N		%					
T1	<i>Controle</i>	237	232	97.9% ^a	142	110	77.5% ^a	31	21.8% ^a	1	0.7% ^a	78	6	7.7% ^{a,B}	67	85.9% ^a	5	6.4% ^a
	<i>Vitrificado</i>	191	162	84.8% ^b	191	136	71.2% ^a	47	24.6% ^{a,A}	8	4.2% ^a	110	26	23.6% ^b	55	50.0% ^b	29	26.4% ^b
T2	<i>Controle</i>	51	50	98.0% ^a	34	33	97.1% ^a	0	0.0% ^a	1	2.9% ^a	17	3	17.6% ^{a,AB}	13	76.5% ^a	1	5.9% ^a
	<i>Vitrificado</i>	31	28	90.3% ^a	31	26	83.9% ^a	0	0.0% ^{a,B}	5	16.1% ^a	17	4	23.5% ^a	10	58.8% ^a	3	17.6% ^a
T3	<i>Controle</i>	256	255	99.6% ^a	175	142	81.1% ^a	33	18.9% ^a	0	0.0% ^a	93	26	28.0% ^{a,A}	66	71.0% ^a	1	1.1% ^a
	<i>Vitrificado</i>	197	170	86.3% ^b	197	148	75.1% ^a	11	5.6% ^{b,B}	38	19.3% ^b	115	50	43.5% ^a	38	33.0% ^b	27	23.5% ^b
T4	<i>Controle</i>	310	309	99.7% ^a	200	149	74.5% ^a	51	25.5% ^a	0	0.0% ^a	101	22	21.8% ^{a,AB}	78	77.2% ^a	1	1.0% ^a
	<i>Vitrificado</i>	267	211	79.0% ^b	267	165	61.8% ^a	28	10.5% ^{b,B}	74	27.7% ^b	166	44	26.5% ^a	66	39.8% ^b	56	33.7% ^b
T5	<i>Controle</i>	121	121	100.0% ^a	80	53	66.3% ^a	27	33.8% ^a	0	0.0% ^a	40	6	15.0% ^{a,AB}	27	67.5% ^a	0	0.0% ^a
	<i>Vitrificado</i>	99	88	88.9% ^a	98	75	76.5% ^a	9	9.2% ^{b,AB}	24	24.5% ^b	55	9	16.4% ^a	35	63.6% ^a	11	20.0% ^a

Letras diferentes na mesma coluna, representam diferença: ^{a, b} Comparação entre tratamentos: Controle e Vitrificado / Touro; ^{A, B} Comparação entre Touros / Tratamento (Controle ou Vitrificado), por ANOVA, Teste Tukey ($p < 0,05$).

BL: embriões no estágio de blastocisto; BX: embriões no estágio de blastocisto expandido.

Tabela 3.3: Efeito do touro (T) no sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro* em estágio de blastocisto expandido (BX) nos dias 6 (D6), 7 (D7) e 8 (D8) de desenvolvimento.

Touro		N Total BX	Macho		Fêmea	
			N	(%)	N	(%)
T1	D6	36	19	(52.8%)	17	(47.2%)
	D7	33	18	(54.5%)	15	(45.5%)
	D8	11	7	(63.6%)	4	(36.4%)
T2	D6	14	8	(57.1%)	6	(42.9%)
	D7	29	20	(69.0%) ^a	9	(31.0%) ^b
	D8	19	13	(68.4%) ^a	6	(31.6%) ^b
T3	D6	19	8	(42.1%)	11	(57.9%)
	D7	43	25	(58.1%)	18	(41.9%)
	D8	42	34	(81.0%) ^a	8	(19.0%) ^b
T4	D6	23	11	(47.8%)	12	(52.2%)
	D7	42	27	(64.3%) ^a	15	(35.7%) ^b
	D8	43	30	(69.8%) ^a	13	(30.2%) ^b
T5	D6	27	18	(66.7%) ^a	9	(33.3%) ^b
	D7	34	15	(44.1%)	19	(55.9%)
	D8	25	17	(68.0%) ^a	8	(32.0%) ^b
Geral (soma dos touros)	D6	119	64	(53.8%)	55	(46.2%)
	D7	181	105	(58.0%) ^a	76	(42.0%) ^b
	D8	140	101	(72.1%) ^a	39	(27.9%) ^b

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha representam diferença: Comparação entre embriões macho e embriões fêmea, por dia de desenvolvimento, pelo teste de Q-quadrado ($p < 0,05$). D7: dia 7 do desenvolvimento embrionário; D8: dia 8 do desenvolvimento embrionário;

Tabela 3.4: Taxa de sobrevivência e desenvolvimento de blastocistos expandidos (BX) em D7, vitrificados pelo método *Cryotop* e avaliados às 24 horas após o aquecimento.

Tratamento	BX (D7) N total	Taxa Sobrevivência N (%)	24 horas após desvitrificação		
			BX N (%)	BE N (%)	Degenerados N (%)
Controle	130	130 (100%) ^a	20 (15,4%) ^a	110 (84,6%) ^a	0 (0,0%) ^a
Vitrificado	231	224 (96,9%) ^a	108 (46,8) ^b	116 (50,2%) ^b	7 (3,0%) ^a

^{a, b} Letras diferentes na mesma coluna, representam diferença: Comparação entre tratamentos: Controle e Vitrificado, pelo Teste t ($p < 0,05$). D7: dia 7 do desenvolvimento embrionário; BX: embriões no estágio de blastocisto expandido; BE: embriões no estágio de blastocisto eclodido.

Tabela 3.5: Frequência do sexo de embriões bovinos criopreservados por *Cryotop* no dia 7 (D7) de desenvolvimento e avaliados 24 horas após o aquecimento conforme o estágio de desenvolvimento.

Tratamento	Estágio Embrião	N Total	Macho		Fêmea	
			N	(%)	N	(%)
Controle	BE	106	46	(43.4%)	60	(56.6%)
	BX	23	11	(47.8%)	12	(52.2%)
	Dg	0	0	(0.0%)	0	(0.0%)
Vitrificado	BE	111	61	(55.0%)	50	(45.0%)
	BX	47	26	(55.3%)	21	(44.7%)
	Dg	7	2	(28.6%)	5	(71.4%)

Comparação entre embriões macho e embriões fêmea, por estágio de desenvolvimento, pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). BX: embriões no estágio de blastocisto expandido; BE: embriões no estágio de blastocisto eclodido; Dg: embriões degenerados.

4. DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi verificar se o sexo dos embriões PIV influencia a resposta dos embriões PIV à criopreservação. Entretanto, como a proporção do sexo dos embriões pode ser afetada por vários fatores, tal como o touro utilizado e no intuito de confirmar como a proporção do gênero responde à velocidade de desenvolvimento embrionário, outros experimentos foram realizados antes de se avaliar se o sexo afeta a resposta à vitrificação. Inicialmente, foi verificado se o touro afeta a cinética de desenvolvimento embrionário. Para isso, os dados de clivagem, cinética do desenvolvimento embrionário em D6 e taxa de produção total de blastocistos em D6, D7 e D8 de cinco touros, foram utilizados.

Conforme já esperado os resultados mostraram diferença na produção total de blastocistos entre alguns touros. Esses dados corroboram os trabalhos de Machado *et al.* (2009) e outros (Alomar *et al.*, 2008; Palma e Sinowatz, 2004; Ward *et al.*, 2001) que relatam a diferença na taxa de clivagem e produção de blastocistos entre os touros em D7 e D8. De fato, variações individuais entre touros bem como entre ejaculados ou partidas de sêmen congelado de um mesmo indivíduo são relatadas tanto para fecundação *in vivo* quanto para as condições *in vitro*. Quanto à cinética de desenvolvimento, nenhuma diferença foi detectada entre os animais envolvidos. A comparação com outros trabalhos em bovinos se torna difícil devido não só a escassez de estudos que avaliem esse parâmetro, mas também aos distintos métodos e sistemas adotados pelos diferentes autores. Entretanto, Alomar *et al.* (2008) comparando 4 touros e observando o desenvolvimento embrionário com auxílio do *time-lapse*, mostraram que não houve diferença entre os touros no desenvolvimento entre a clivagem e o estágio de

blastocisto. Da mesma forma, Carvalho *et al.* (2010) utilizando sêmen sexado de 4 touros, e Barcelo-Fimbres e Seidel (2007), utilizando meios enriquecidos para melhorar a qualidade do embrião também não encontraram diferença entre touros na cinética de desenvolvimento embrionário.

Considerando que um dos objetivos era avaliar o quanto o macho utilizado na PIV afetaria o desenvolvimento embrionário, não se poderia descartar um possível efeito do touro na resistência ao estresse. Portanto, o efeito do touro na criotolerância de embriões PIV também foi avaliado neste estudo. Quando os animais foram comparados individualmente e por tratamento, não foi observada diferença entre embriões C ou V. Todavia, quando os tratamentos foram avaliados entre si por touro, dois animais não tiveram diferença entre C e V, e um deles foi o T2, o único que apresentou menor taxa de blastocisto em relação aos demais touros. Além deste, o T5 também não mostrou diferença entre os tratamentos. Esses resultados indicam que existe um componente paterno na criotolerância dos embriões e que na escolha do touro para a PIV também deve-se levar em consideração esse fator. Até o momento, não se conhece outros estudos em bovinos que relatem o efeito do touro na criotolerância de embriões, sejam esses de origem *in vivo* ou *in vitro*. Sendo assim, não se tem nenhum conhecimento de como o macho afeta a resistência à criopreservação dos embriões. É possível que esse efeito esteja relacionado aos danos que a célula espermática possa ter sofrido durante o processamento do sêmen, visto que a integridade do DNA espermático é de crucial importância para transmissão balanceada da informação genética para futuras gerações (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Algumas evidências sugerem que o espermatozoide com fragmentação de DNA pode levar à falha na concepção, abortos, malformações e doenças genéticas (Evenson, 1999; Kipper *et al.*, 2017; Sakkas *et al.*, 1999; Walters *et al.*, 2005b). As causas de danos ao DNA espermático são variadas, como apoptose, metabolismo celular alterado e estresse oxidativo. É importante ressaltar que mesmo quando um espermatozoide com danos severos de DNA é utilizado, a descondensação nuclear, a formação de pró-núcleos e inclusive, o desenvolvimento embrionário podem ocorrer. Isso é possível, uma vez que os danos de cromatina e desenvolvimento anormal podem não ser percebidos, até os estágios pós-implantacionais (Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2008). Relatos utilizando camundongos como modelo, indicam que a célula espermática com DNA danificado pode fecundar um ovócito e produzir embriões de boa qualidade no período inicial, pois o ovócito tem capacidade de reparar parte dos danos (quando

esse prejuízo não ultrapassa 8%). No entanto, à medida que os danos ao DNA aumentam, o sucesso de desenvolvimento e/ou levar uma prenhez à termo diminui (Ahmadi e Ng, 1999). Enfim, quando se objetiva alcançar a qualidade do embrião deve-se considerar vários parâmetros da qualidade espermática, pois há indícios de que touros que produzem embriões de boa qualidade podem afetar a crioresistência embrionária.

Como um dos objetivos deste estudo foi avaliar o efeito do sexo do embrião à criopreservação, era fundamental identificar se existe um dimorfismo sexual na cinética de desenvolvimento. Isso porque, vários estudos mostram que os blastocistos que se desenvolvem mais rapidamente em condições *in vitro* são de melhor qualidade, e mais capazes de sobreviverem à diferentes condições de estresse, comparados aos que se desenvolvem mais lentamente (Carrocera *et al.*, 2016; Dinnyes *et al.*, 1999; Leme, 2008; Morato *et al.*, 2010; Rizos *et al.*, 2008a; Zucolloto *et al.*, 2003). E, tem sido relatado também que embriões fêmeas são mais tardios do que machos (Gutierrez-Adan *et al.*, 2001; Rubessa *et al.*, 2011; Tominaga, 2004) e tendem a apresentar mais células em apoptose do que embriões machos (Ghys *et al.*, 2016); portanto, menos embriões fêmeas seriam considerados de para a seleção na criopreservação com relação à qualidade.

Neste trabalho, foi avaliado o sexo de embriões que atingiram o estágio de BX em D6, D7 e D8 de desenvolvimento, ou seja, embriões com diferentes velocidades de desenvolvimento. Dos cinco touros utilizados, dois apresentaram maior número de embriões machos em relação às fêmeas em D7; em D8, apenas um touro não apresentou diferença na razão macho:fêmea. Na análise geral, foi observado que no D7 os embriões são predominantemente machos e, o desvio no sexo dos embriões se torna mais acentuado em D8. Resultados anteriores da equipe também mostram um favorecimento de embriões machos para o sistema *in vitro* (Machado *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2013a), e a diferença se torna mais evidente a medida que o embrião cresce (Machado *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2013b), quando avaliados em D14 e D15.

Outros estudos mostram resultados semelhantes aos do presente trabalho com estágios de blastocistos expandidos e eclodidos de embriões avaliados em D7 e D8, indicando que embriões PIV são predominantemente machos (Darwish *et al.*, 2009; Lonergan *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1992). Porém, isto não condiz com os achados de Larson *et al.* (2001) em que mais embriões fêmeas atingiram o estágio de mórula e blastocisto expandido no D6. Esses autores, entretanto, utilizaram um *pool* do sêmen de

seis touros para a fecundação, além da privação parcial ou total de glicose no meio de cultivo, o que tem sido indicado como fator que favorece o desenvolvimento de embriões machos, devido à afinidade do metabolismo do embrião macho para essa fonte de energia (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007; Bredbacka e Bredbacka, 1996; Gardner *et al.*, 2000; Peippo *et al.*, 2001; Rubessa *et al.*, 2011).

Para avaliar se o sexo afeta a resposta à vitrificação foi utilizado apenas um touro para produzir os embriões na fase seguinte. Uma vez que o T5 não apresentou diferença entre a proporção macho:fêmea em D7 e também não diferiu nas taxas de sobrevivência e evolução após a vitrificação, este foi o touro eleito para realizar esse experimento. Nessa etapa, os embriões utilizados para vitrificação foram BX de qualidade I, pois é o estágio de preferência no uso para a vitrificação em âmbito comercial (Sanches *et al.*, 2016; Sanches *et al.*, 2013). Apesar destes embriões terem sido submetidos às mesmas condições de cultivo e vitrificação do experimento anterior, a taxa de evolução foi menor para os embriões do grupo V, embora a taxa de sobrevivência não tenha diferido entre eles. Estes são critérios rotineiramente utilizados como padrão de qualidade embrionária, e conquanto a taxa de eclosão dos embriões V tenha sido inferior aos do grupo C (50,2% e 84,6% – respectivamente), este dado é consideravelmente maior do que os encontrados na literatura (que variam de 13% a 35%), levando em conta embriões BX de D7, 24 horas após o aquecimento (Barcelo-Fimbres e Seidel, 2007; Carrocera *et al.*, 2016; Morato *et al.*, 2010; Nicacio *et al.*, 2012; Sanches *et al.*, 2013; Taniguchi *et al.*, 2007). Além disso, a taxa de sobrevivência é semelhante às relatadas por diversos autores (De Oliveira Leme *et al.*, 2016; De Rosa *et al.*, 2007; Kuwayama *et al.*, 2005a; Loutradi *et al.*, 2008; Nicacio *et al.*, 2012; Papis *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 1996; Sanches *et al.*, 2016; Sanches *et al.*, 2013; Sudano *et al.*, 2014b; Sudano *et al.*, 2012; Taniguchi *et al.*, 2007), independentemente do sistema de PIV utilizado. Esses resultados sugerem que o método *Cryotop* é eficiente para a criopreservação e, conseqüentemente, a recuperação de embriões PIV.

Com relação ao efeito do sexo na vitrificação, os resultados indicam que a criotolerância é semelhante entre os gêneros. Isso porque somente os embriões eclodidos do grupo C, apresentaram maior proporção de fêmeas e nos demais estágios e tratamentos em questão, a proporção macho:fêmea foi semelhante. Todavia, a literatura relata a diferença de recuperação após alguma condição de estresse entre macho e fêmea, como após a biópsia, em que embriões fêmea necessitaram de maior tempo para re-expansão (Tominaga, 2004). Além, disso, Nedambale *et al.* (2004) mostram que

embriões machos além de se desenvolverem mais rapidamente do que fêmeas, sobreviveram em maior número ao estresse da vitrificação, apresentando maiores taxas de eclosão após 48 horas do procedimento. Apesar de que poucos experimentos tenham sido conduzidos com embriões vitrificados e sexados em bovinos (Akiyama *et al.*, 2010), era esperado que houvesse uma diferença entre gêneros na resposta à vitrificação. Nota-se, no entanto, que dos embriões submetidos à criopreservação que degeneraram, a maioria são fêmeas, mas devido ao número muito pequeno, não apresentaram diferença estatística.

É sabido que embriões fêmeas e machos são diferentes quanto ao metabolismo e à expressão de genes desde o início de sua formação. Estas diferenças são afetadas por fatores do ambiente *in vivo* ou *in vitro*. Essas diferenças são mais discrepantes em sistemas PIV cuja suplementação é o SFB (Heras *et al.*, 2016), quando o transcriptoma de embriões macho e fêmea, *in vivo* e *in vitro* foi comparado por sequenciamento de RNA. Segundo Bermejo-Alvarez *et al.* (2010b) cerca de um terço dos genes expressos na espécie bovina são diferentes entre embriões macho e fêmea, enquanto nas condições *in vitro*.

Apesar de todas essas diferenças entre sexos relatadas na literatura, os resultados encontrados neste estudo indicam que ambos os sexos respondem de forma semelhante à vitrificação. Por outro lado, para que se possa confirmar que não existe diferença na crioresistência entre os embriões macho e fêmea, outras análises, tais com as relacionadas a aspectos moleculares e a avaliação da gestação, devem ser realizadas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a escolha do touro, apesar de não interferir na cinética de desenvolvimento embrionário, afeta a produção de blastocistos, a resposta à criopreservação e também a razão macho:fêmea na PIV. Ainda pode-se afirmar que os touros que produzem embriões mais crioresistentes nem sempre são os que produzem maior taxa de embriões PIV. Além disso, embriões macho e fêmea têm a mesma capacidade de resposta à vitrificação por *Cryotop*.

Finalmente, outros estudos com condições e ambientes diferentes e com outras avaliações poderão confirmar a semelhança entre gêneros em relação à crioresistência.

6. 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, n. 1, p. 57-66, Jan 2002.

Ahmadi, A.; Ng, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **J Exp Zool**, v. 284, n. 6, p. 696-704, Nov 01 1999.

Akiyama, K.; Kobayashi, J.; Sato, Y.; Sata, R.; Ohashi, M.; Sasaki, E.; Oda, Y.; Ogawa, Y.; Ueda, S.; Nabenishi, H.; Matoba, S. Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. **Anim Sci J**, v. 81, n. 4, p. 461-6, Aug 01 2010.

Alomar, M.; Tasiaux, H.; Remacle, S.; George, F.; Paul, D.; Donnay, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal reproduction science**, v. 107, n. 1-2, p. 48-61, Aug 2008.

Avery, B.; Jorgensen, C. B.; Madison, V.; Greve, T. Morphological development and sex of bovine *in vitro*-fertilized embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 32, n. 3, p. 265-70, Jul 1992.

Avery, B.; Madison, V.; Greve, T. Sex and development in bovine in-vitro fertilized embryos. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p. 953-63, May 1991.

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, n. 11, p. 1395-405, Nov 2007.

Bermejo-Alvarez, P.; Rizos, D.; Rath, D.; Lonergan, P.; Gutierrez-Adan, A. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced *in vitro*. **Physiological genomics**, v. 32, n. 2, p. 264-72, Jan 17 2008.

Bermejo-Alvarez, P.; Rizos, D.; Rath, D.; Lonergan, P.; Gutierrez-Adan, A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3394-9, Feb 23 2010.

Blondin, P. **Status of embryo production in the world.** 29th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE). VETERINARIAE, A. S. Gramado - RS, Brazil: Animal Reproduction. 12: 356-358 p. 2015.

Bredbacka, K.; Bredbacka, P. Glucose controls sex-related growth rate differences of bovine embryos produced *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 106, n. 2, p. 169-72, Mar 1996.

Burgoyne, P. S. A Y-chromosomal effect on blastocyst cell number in mice. **Development**, v. 117, n. 1, p. 341-5, Jan 1993.

Carrocera, S.; Caamano, J. N.; Trigal, B.; Martin, D.; Diez, C. Developmental kinetics of *in vitro*-produced bovine embryos: An aid for making decisions. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 822-7, Mar 15 2016.

Carvalho, J. O.; Sartori, R.; Machado, G. M.; Mourao, G. B.; Dode, M. A. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1521-30, Dec 2010.

Clemente, M.; Lopez-Vidriero, I.; O'Gaora, P.; Mehta, J. P.; Forde, N.; Gutierrez-Adan, A.; Lonergan, P.; Rizos, D. Transcriptome changes at the initiation of elongation in the bovine conceptus. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 2, p. 285-95, Aug 2011.

Darwish, S.; Mahmoud, K.; Scholkamy, T. Preliminary trials for sexing of *in vitro* produced buffalo embryos using multiplex PCR. **Global Veterinaria**, v. 3, n. 3, p. 178-182, 2009.

de Oliveira Leme, L.; Dufort, I.; Spricigo, J. F.; Braga, T. F.; Sirard, M. A.; Franco, M. M.; Dode, M. A. Effect of vitrification using the Cryotop method on the gene expression profile of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 724-733 e1, Mar 1 2016.

De Rosa, A.; Attanasio, L.; Boccia, L.; Vecchio, D.; Campanile, G.; Gasparrini, B. Cryotop vitrification for *in vitro* produced bovine and buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos at different stages of development. **Italian Journal of Animal Science**, v. 6, n. sup2, p. 747-750, 2007/01/01 2007.

de Sousa, R. V.; da Silva Cardoso, C. R.; Butzke, G.; Dode, M. A.; Rumpf, R.; Franco, M. M. Biopsy of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* does not affect pregnancy rates. **Theriogenology**, v. 90, p. 25-31, Mar 01 2017.

Dinnyes, A.; Lonergan, P.; Fair, T.; Boland, M. P.; Yang, X. Timing of the first cleavage post-insemination affects cryosurvival of *in vitro*-produced bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 53, n. 3, p. 318-24, Jul 1999.

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**, v. 54, n. 5, p. 659-73, Sep 15 2000.

Evenson, D. P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reproduction, fertility, and development**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 1999.

Fernandez-Gonzalez, R.; Moreira, P. N.; Perez-Crespo, M.; Sanchez-Martin, M.; Ramirez, M. A.; Pericuesta, E.; Bilbao, A.; Bermejo-Alvarez, P.; de Dios Hourcade, J.; de Fonseca, F. R.; Gutierrez-Adan, A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-

fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 4, p. 761-72, Apr 2008.

Florentino, C.; Mariani, A.; Souza, J.; Dias, F.; Santos, H.; Arrivabene, M.; Neves, W.; Souza, J.; Cavalcante, T.; Wischral, A. Pregnancy rates bovine recipients inactivated with *in vitro* produced IVP embryos in the Legal Amazon. **Journal of Animal Science Advances**, v. 3, n. 4, p. 1, 2013.

Gardner, D. K.; Pool, T. B.; Lane, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. **Semin Reprod Med**, v. 18, n. 2, p. 205-18, 2000.

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, n. 5, p. 612-23, Mar 15 2008.

Ghys, E.; Dallemagne, M.; De Troy, D.; Sauvegarde, C.; Errachid, A.; Donnay, I. Female bovine blastocysts are more prone to apoptosis than male ones. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 591-600, Mar 01 2016.

Gutierrez-Adan, A.; Behboodi, E.; Andersen, G. B.; Medrano, J. F.; Murray, J. D. Relationship between stage of development and sex of bovine IVM-IVF embryos cultured *in vitro* versus in the sheep oviduct. **Theriogenology**, v. 46, n. 3, p. 515-25, Aug 1996.

Gutierrez-Adan, A.; Lonergan, P.; Rizos, D.; Ward, F. A.; Boland, M. P.; Pintado, B.; de la Fuente, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, n. 5, p. 1117-26, Mar 15 2001.

Hansen, P. J.; Block, J.; Loureiro, B.; Bonilla, L.; Hendricks, K. E. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 1, p. 59-66, 2010.

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.

Heras, S.; De Coninck, D. I.; Van Poucke, M.; Goossens, K.; Bogado Pascottini, O.; Van Nieuwerburgh, F.; Deforce, D.; De Sutter, P.; Leroy, J. L.; Gutierrez-Adan, A.; Peelman, L.; Van Soom, A. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. **BMC Genomics**, v. 17, p. 72, Jan 22 2016.

Holm, P.; Booth, P. J.; Schmidt, M. H.; Greve, T.; Callesen, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 683-700, 1999.

Kim, Y. M.; Uhm, S. J.; Gupta, M. K.; Yang, J. S.; Lim, J. G.; Das, Z. C.; Heo, Y. T.; Chung, H. J.; Kong, I. K.; Kim, N. H.; Lee, H. T.; Ko, D. H. Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 1085-93, Sep 15 2012.

Kipper, B. H.; Trevizan, J. T.; Carreira, J. T.; Carvalho, I. R.; Mingoti, G. Z.; Beletti, M. E.; Perri, S. H.; Franciscato, D. A.; Pierucci, J. C.; Koivisto, M. B. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. **Theriogenology**, v. 87, p. 154-160, Jan 01 2017.

Kuwayama, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73-80, Jan 1 2007.

Kuwayama, M.; Vajta, G.; Ieda, S.; Kato, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 5, p. 608-14, Nov 2005a.

Kuwayama, M.; Vajta, G.; Kato, O.; Leibo, S. P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive biomedicine online**, v. 11, n. 3, p. 300-8, Sep 2005b.

Larson, M. A.; Kimura, K.; Kubisch, H. M.; Roberts, R. M. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN-tau. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9677-82, Aug 14 2001.

Leme, L. O. **Efeito de diferentes fontes protéicas na qualidade e quantidade de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2008. 82 (Master of Science). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

Liu, Y.; Du, Y.; Lin, L.; Li, J.; Kragh, P. M.; Kuwayama, M.; Bolund, L.; Yang, H.; Vajta, G. Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of *in vitro* matured pig oocytes. **Cryo letters**, v. 29, n. 4, p. 315-20, Jul-Aug 2008.

Lonergan, P.; Khatir, H.; Piumi, F.; Rieger, D.; Humblot, P.; Boland, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal of reproduction and fertility**, v. 117, n. 1, p. 159-67, Sep 1999.

Loutradi, K. E.; Kolibianakis, E. M.; Venetis, C. A.; Papanikolaou, E. G.; Pados, G.; Bontis, I.; Tarlatzis, B. C. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 1, p. 186-93, Jul 2008.

Machado, G. M.; Caixeta, E. S.; Lucci, C. M.; Rumpf, R.; Franco, M. M.; Dode, M. A. Post-hatching development of bovine embryos *in vitro*: the effects of tunnel preparation and gender. **Zygote**, v. 20, n. 2, p. 123-34, May 2012.

Machado, G. M.; Carvalho, J. O.; Filho, E. S.; Caixeta, E. S.; Franco, M. M.; Rumpf, R.; Dode, M. A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-97, May 2009.

Machado, G. M.; Ferreira, A. R.; Guardieiro, M. M.; Bastos, M. R.; Carvalho, J. O.; Lucci, C. M.; Diesel, T. O.; Sartori, R.; Rumpf, R.; Franco, M. M.; Dode, M. A. Morphology, sex ratio and gene expression of day 14 *in vivo* and *in vitro* bovine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 4, p. 600-8, 2013a.

Machado, G. M.; Ferreira, A. R.; Pivato, I.; Fidelis, A.; Spricigo, J. F.; Paulini, F.; Lucci, C. M.; Franco, M. M.; Dode, M. A. Post-hatching development of *in vitro* bovine embryos from day 7 to 14 *in vivo* versus *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 80, n. 11, p. 936-47, Nov 2013b.

Marinho, L. S.; Sanches, B. V.; Rosa, C. O.; Tannura, J. H.; Rigo, A. G.; Basso, A. C.; Pontes, J. H.; Seneda, M. M. Pregnancy Rates to Fixed Embryo Transfer of Vitrified IVP *Bos indicus*,

Bos taurus or Bos indicus x Bos taurus Embryos. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 50, n. 5, p. 807-11, Oct 2015.

Morato, R.; Izquierdo, D.; Paramio, M. T.; Mogas, T. Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 7, p. 1141-7, 2010.

Mundim, T. C.; Ramos, A. F.; Sartori, R.; Dode, M. A.; Melo, E. O.; Gomes, L. F.; Rumpf, R.; Franco, M. M. Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced *in vitro*, by natural ovulation, or hormonal superstimulation. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 8, n. 4, p. 1398-407, 2009.

Nedambale, T. L.; Dinnyes, A.; Yang, X.; Tian, X. C. Bovine blastocyst development *in vitro*: timing, sex, and viability following vitrification. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1671-6, Nov 2004.

Nicacio, A. C.; Simoes, R.; de Paula-Lopes, F. F.; de Barros, F. R.; Peres, M. A.; Assumpcao, M. E.; Visintin, J. A. Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of *in vitro* produced bovine embryos. **Zygote**, v. 20, n. 2, p. 117-22, May 2012.

Palma, G. A.; Sinowatz, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 33, n. 5, p. 257-62, Oct 2004.

Papis, K.; Shimizu, M.; Izaike, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 651-8, Sep 15 2000.

Parrish, J. J.; Krogenaes, A.; Susko-Parrish, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-69, Oct 15 1995.

Peippo, J.; Kurkilahti, M.; Bredbacka, P. Developmental kinetics of *in vitro* produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. **Zygote**, v. 9, n. 2, p. 105-13, May 2001.

Perry, G. **2015 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS**. IETS Data Retrieval Committee. http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_2015_V2; IETS: 16 pages p. 2016.

Rizos, D.; Bermejo-Alvarez, P.; Gutierrez-Adan, A.; Lonergan, P. Effect of duration of oocyte maturation on the kinetics of cleavage, embryo yield and sex ratio in cattle. **Reproduction, fertility, and development**, v. 20, n. 6, p. 734-40, 2008a.

Rizos, D.; Clemente, M.; Bermejo-Alvarez, P.; de La Fuente, J.; Lonergan, P.; Gutierrez-Adan, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43 Suppl 4, p. 44-50, Oct 2008b.

Rizos, D.; Lonergan, P.; Boland, M. P.; Arroyo-Garcia, R.; Pintado, B.; de la Fuente, J.; Gutierrez-Adan, A. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 3, p. 589-95, Mar 2002.

Rubessa, M.; Boccia, L.; Campanile, G.; Longobardi, V.; Albarella, S.; Tateo, A.; Zicarelli, L.; Gasparrini, B. Effect of energy source during culture on *in vitro* embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1347-55, Oct 15 2011.

- 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, n. 2, p. 331-43, Jul 15 1996.
- Sakkas, D.; Mariethoz, E.; Manicardi, G.; Bizzaro, D.; Bianchi, P. G.; Bianchi, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Rev Reprod**, v. 4, n. 1, p. 31-7, Jan 1999.
- Salilew-Wondim, D.; Tesfaye, D.; Hoelker, M.; Schellander, K. Embryo transcriptome response to environmental factors: Implication for its survival under suboptimal conditions. **Animal reproduction science**, v. 149, n. 1, p. 30-38, 2014.
- Sanches, B. V.; Lunardelli, P. A.; Tannura, J. H.; Cardoso, B. L.; Colombo Pereira, M. H.; Gaitkoski, D.; Basso, A. C.; Arnold, D. R.; Seneda, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147-51, Apr 1 2016.
- Sanches, B. V.; Marinho, L. S.; Filho, B. D.; Pontes, J. H.; Basso, A. C.; Meirinhos, M. L.; Silva-Santos, K. C.; Ferreira, C. R.; Seneda, M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 372-7, Sep 01 2013.
- Sudano, M. J.; Paschoal, D. M.; da Silva Rascado, T.; Crocomo, L. F.; Magalhaes, L. C.; Junior, A. M.; Machado, R.; da Cruz Landim-Alvarenga, F. Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 124-31, May 2014.
- Sudano, M. J.; Santos, V. G.; Tata, A.; Ferreira, C. R.; Paschoal, D. M.; Machado, R.; Buratini, J.; Eberlin, M. N.; Landim-Alvarenga, F. D. Phosphatidylcholine and Sphingomyelin Profiles Vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* In Vitro- and In Vivo-Produced Blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 87, n. 6, p. 130, 2012.
- Taniguchi, M.; Ikeda, A.; Arikawa, E.; Wongsrikeao, P.; Agung, B.; Naoi, H.; Nagai, T.; Otoi, T. Effect of cryoprotectant composition on *in vitro* viability of *in vitro* fertilized and cloned bovine embryos following vitrification and in-straw dilution. **J Reprod Dev**, v. 53, n. 4, p. 963-9, Aug 2007.
- Tarín, J. J.; García-Pérez, M. A.; Hermenegildo, C.; Cano, A. Changes in sex ratio from fertilization to birth in assisted-reproductive-treatment cycles. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 56, 2014.
- Tesfaye, D.; Ponsuksili, S.; Wimmers, K.; Gilles, M.; Schellander, K. A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 39, n. 6, p. 396-404, Dec 2004.
- Tominaga, K. Cryopreservation and sexing of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos for their practical use. **Journal Reprod Dev**, v. 50, n. 1, p. 29-38, Feb 2004.
- Walters, A. H.; Saacke, R. G.; Pearson, R. E.; Gwazdauskas, F. C. The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1404-21, Oct 01 2005.
- Ward, F.; Rizos, D.; Corridan, D.; Quinn, K.; Boland, M.; Lonergan, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility *in vivo*. **Molecular reproduction and development**, v. 60, n. 1, p. 47-55, Sep 2001.

Xu, K. P.; Yadav, B. R.; King, W. A.; Betteridge, K. J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 31, n. 4, p. 249-52, Apr 1992.

Zucolloto, J.; Oliveira, M.; Pereira, D. C.; Rumpf, R.; Dode, M. A. N. Influence of the growth rate and stage of development of bovine embryos produced *in vitro* on the pregnancy rate. In: VET, A. S., XVII Reunião Anual da SBTE, 2003, Beberibe, Ceará. Acta Sci Vet. p.630.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados, indicam que a vitrificação de embriões bovinos PIV pelo método de *Cryotop*, não apresentaram intensas alterações no perfil transcricional de genes, podendo este ser um procedimento promissor à criopreservação de embriões desta espécie.

Além disso, devido à seleção criteriosa dos embriões que são submetidos à vitrificação, havia a dúvida sobre embriões machos estarem sendo escolhidos, ao invés de embriões fêmeas, por causa da sua velocidade de desenvolvimento e qualidade morfológica no momento da seleção. Com os resultados obtidos viu-se que a escolha do touro, apesar de não interferir na cinética de desenvolvimento embrionário, afeta a produção de blastocistos, a resposta à criopreservação e também a razão macho:fêmea na PIV. Além disso, embriões macho e fêmea têm a mesma capacidade de resposta à vitrificação por *Cryotop*.

No entanto, estudos adicionais, que agreguem informações sobre alterações moleculares bem como a resposta celular relativas a esse processo de estresse intenso, são fundamentais para elucidar a fisiologia do embrião submetido ao método.